

Ocorrência de *Brucella* em queijo Minas artesanal da microrregião do Serro: um importante problema de saúde pública

Occurrence of Brucella in Minas artisanal cheese of Serro micro-region: an important public health problem

Marcio Roberto Silva^{1*}, André Almeida Santos Duch², Rômulo Tadeu Pace de Assis Lage², Liliane Denize Miranda Menezes², João Batista Ribeiro¹, Guilherme Nunes de Souza¹, Paulo Martins Soares Filho³, Antônio Augusto Fonseca Júnior³, Letícia Scafutto de Faria¹, Ronaldo Rodrigues da Costa⁴

RESUMO

Introdução: O modo de fabricar o queijo Minas artesanal (QMA) na microrregião do Serro foi considerado patrimônio histórico imaterial da humanidade desde 2008. Mesmo produzido a partir de leite cru a sua comercialização foi autorizada. **Objetivos:** Estimar a prevalência de *Brucella* spp. no QMA da microrregião do Serro. **Métodos:** Foram avaliadas as evidências do patógeno (presença de DNA) em queijos de produtores cadastrados pelo Instituto Mineiro de Agricultura e Pecuária (IMA), com tempos de maturação de 4 e 8 dias à temperatura ambiente. **Resultados:** Embora todas as amostras de queijo fossem de bovinos declarados negativos para brucelose por testes sorológicos anuais realizados por veterinários autônomos, os resultados da reação em cadeia da polimerase (PCR) mostraram 17 (30,9%, IC95% 18,7% a 43,1%) de amostras de QMA positivas para *Brucella* spp. entre os 55 analisados. O sequenciamento de DNA demonstrou uma similaridade de 100% com as cepas de campo de *Brucella* ssp. **Conclusões:** Essa positividade no QMA pode ser considerada um risco potencial à saúde pública e sugere uma suposta deficiência do programa local de controle da brucelose no monitoramento dessa população específica de rebanhos leiteiros e que medidas mais fortes de controle e prevenção da brucelose devem ser adotadas em agroindústrias produtoras de leite cru a fim de garantir a segurança do alimento.

Palavras-chave: *Brucella abortus*, Zoonose, Pcr, Queijo Minas Artesanal.

ABSTRACT

Introduction: The way of manufacturing the artisanal Minas cheese (QMA) in the micro-region of Serro was considered an immaterial historical heritage of mankind since 2008. Even produced from raw milk, its commercialization was authorized. **Objectives:** To estimate the prevalence of *Brucella* spp. in the QMA of the Serro micro-region. **Methods:** Evidence of pathogen (presence of DNA) in producer cheeses registered by the Minas Gerais Institute of Agriculture and Livestock (IMA) was evaluated, with maturation times of 4 and 8 days at room temperature. **Results:** Although all the cheese samples were from cattle declared negative for brucellosis by annual serological tests carried out by autonomous veterinarians, the polymerase chain reaction (PCR) results showed 17 (30.9%, 95% CI 18.7% 43.1%) of samples of QMA positive for *Brucella* spp. among the 55 analyzed. DNA sequencing demonstrated a similarity of 100% with the field strains of *Brucella* ssp. **Conclusions:** This positivity in the QMA can be considered a potential risk to public health and suggests a supposed deficiency of the local brucellosis control program in the monitoring of this specific population of dairy herds and that stronger measures of brucellosis control and prevention should be adopted in producing raw milk to ensure food safety.

Keywords: *Brucella abortus*, zoonosis, PCR, Mines cheese artisanal.

1. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil
2. Instituto Mineiro de Agropecuário, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil
3. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil
4. Hospital Regional João Penido, FHEMIG, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil

* **Autor correspondente:** Dr. M. R. Silva, Embrapa Gado de Leite / Av. Eugênio do Nascimento, 610, CEP 36038 330, Dom Bosco, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil
E-mail: marcio-roberto.silva@embrapa.br

INTRODUÇÃO

O queijo Minas artesanal (QMA) fabricado a partir de leite cru é provavelmente o queijo mais tradicional e antigo do Brasil, com origem na colonização portuguesa, quando trouxeram para o Brasil o gado e sua receita.¹⁻³

Duas entre as sete regiões reconhecidas como produtoras de QMA foram consideradas patrimônio histórico imaterial da humanidade a ser preservado desde 2008, pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional.³

O QMA representa o principal sustento de vários pequenos produtores do Estado, que produzem aproximadamente 70.000 toneladas deste tipo de queijo por ano.⁴

A fabricação do QMA é historicamente caracterizada pela utilização de leite cru, recém-ordenhado, com o acréscimo de um soro fermento endógeno chamada “pingo”. Usando o leite cru como base em sua fabricação, o QMA pode veicular particularmente patógenos zoonóticos, como *Brucella*. Este patógeno pode ser eliminado no leite de bovinos infectados e permanecer viável em produtos lácteos crus, representando riscos para a saúde dos consumidores. Anualmente, 500 mil novos casos de brucelose humana são registrados em todo mundo⁵ e uma revisão robusta apontou *Brucella* como o quarto patógeno mais envolvido em surtos de doenças transmitidas pelo leite cru e derivados em muitos países desenvolvidos, a maioria deles associados ao queijo fabricado com leite cru.⁶ Essa associação também foi verificada no Brasil.⁷

Para evitar esses riscos microbiológicos dos produtos lácteos crus, tanto o controle sanitário do rebanho quanto a higiene em todo o processo de fabricação devem ser rigorosamente adotados pelos produtores de queijos artesanais para garantir que o produto seja inócuo, pois não dependem da pasteurização como garantia extra no final do processo.

Então, mais recentemente, órgãos nacionais e estaduais de saúde animal e inspeção de alimentos no Brasil cobraram dos produtores de QMA padrões higiênico-sanitários do rebanho para obter leite e produzir queijo de leite cru adequado para consumo direto. Atualmente, o Programa de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), foi estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)⁸, e adotado pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) para monitorar a presença destas doenças em rebanhos de agroindústrias produtoras de queijos artesanais no Estado de Minas Gerais. A brucelose bovina em rebanhos dessas agroindústrias é monitorada por veterinários particulares sob supervisão do IMA nesse Estado.

Apesar da reconhecida tradição e “terroir” do QMA, sua segurança nunca pode ser negligenciada. Entretanto, os autores não conhecem levantamentos randomizados relacionados à prevalência de *Brucella* spp. em queijo de leite cru de agroindústrias produtoras artesanais no Brasil. Portanto, neste estudo foi realizada uma amostragem probabilística para estimar a prevalência de *Brucella* spp. no QMA, identificada por PCR direto e confirmada por sequenciamento de DNA, em importante região produtora do Estado de Minas Gerais, Brasil. Além disso, identificar se as sequências de DNA eram da vacina B19 ou das cepas de campo de *Brucella*. Este estudo é importante para orientar as medidas de monitoramento e controle por parte das agências estaduais e federais, tanto de saúde animal quanto de inspeção de alimentos, especificamente direcionadas às agroindústrias produtoras de QMA.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho e localização do estudo. Este é um estudo transversal para estimar a prevalência de *Brucella* spp. no QMA produzido pelas agroindústrias da região do Serro, Estado de Minas Gerais, Brasil. Os critérios de inclusão foram as agroindústrias registradas no IMA. As agroindústrias selecionadas foram distribuídas em 11 cidades pertencentes à região do Serro, com mais detalhes: Alvorada de Minas, Coluna, Conceição do Mato Dentro, Dom Joaquim, Itambé do Mato Dentro, Matelândia, Paulistas, Rio Vermelho, Sabinópolis, Serra Azul de Minas, Serro.

Planejamento amostral. A amostra da população alvo para estimar o percentual de QMA positivo para *Brucella* spp. foi determinado por sorteio aleatório de 55 (44%) das 125 agroindústrias registradas no IMA. Como todos os queijos foram fabricados a partir de leite de conjunto de cada fazenda, apenas um queijo foi coletado por agroindústria para representá-la.

Monitoramento dos rebanhos para brucelose. Os rebanhos de todas as agroindústrias incluídas são monitorados para brucelose anualmente pelo IMA, por meio do teste de antígeno tamponado em placa, realizado por veterinários particulares habilitados pelo PNCEBT.

Coleta de dados. Cinquenta e cinco produtores de QMA, representando suas próprias agroindústrias, foram entrevistados utilizando um questionário estruturado. Este foi organizado por grupo de conteúdo, com foco nas características socioeconômicas, saúde animal, Boas Práticas Agropecuárias e Boas Práticas de Fabricação para o QMA.

Coleta de amostras de queijo. As amostras de queijo ($n = 55$) foram coletadas pela equipe de estudo treinada para realizar sua coleta, armazenamento e transporte, entre junho e dezembro de 2014. Em cada agroindústria sorteada foi coletado um queijo com tempo de maturação entre 4 e 8 dias.

As amostras contendo aproximadamente 900 g foram coletadas em embalagens próprias e mantidas em caixas isotérmicas sob refrigeração (<4 °C) com gelo reciclável durante o envio ao laboratório para análise.

Extração de DNA. Amostras de queijo foram fracionadas em porções menores de 100 g, envasadas em sacos estéreis para amostras sólidas ou líquidas (INLAB), seladas, identificadas, maceradas e homogeneizadas. A extração de DNA da amostra de queijo foi realizada usando o Kit de Alimentos Dneasy Food Mericon (Qiagen, Hilden, Alemanha).

Nested-PCR. O DNA extraído foi submetido à nested-PCR direcionada ao gene *eryD*, que é completo nas linhagens de *Brucella*, mas parcialmente deletado nas cepas vacinais B19 de *Brucella*. Foram utilizados os primers Bru.eryD.469.F (5'-CTTCAACCATTTTGGCCATC-3') e Bru.eryD.469.R (5'-CTTGTCCATCAGGCTTTGCT-3') para amplificar uma sequência alvo de 469 pb na primeira PCR e primers Bru.eryD.363.F (5'-GCC GCT ATT ATG TGG ACT GG -3') e

Bru.eryD.363.R (5'-GAT CGT AGT CGT CCG GGT TA -3') na segunda PCR foram utilizados para amplificar uma sequência alvo de 363 pb. O DNA isolado foi amplificado utilizando a concentração de reagentes e as condições de ciclagem para PCR: tampão MgCl₂ 1,5Mm 1x Go Taq 0,05 U/ μ L, DNTP 10 mM; 95 °C / 5 min; 40x 95 °C / 40 seg, 60 °C / 40 seg, 72 °C / 40 seg; 72 °C / 4 min. Os produtos de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corados com solução segura. As bandas pretendidas foram visualizadas por um transiluminador.

Sequenciamento de DNA. O sequenciamento do produto amplificado foi realizado para avaliar o grau de similaridade com amostras de DNA presentes no GenBank. O sequenciamento foi realizado de acordo com a metodologia de Sanger^{9,10} no equipamento Genetic Analyzer 3500 (Life Technologies, EUA). Os resultados foram analisados no programa BioEdit para montagem dos *contigs* e submetidos ao programa Blast.¹¹

Análises epidemiológicas. A prevalência de QMA positivo para *Brucella* spp. foi determinada com intervalo de confiança de 95% (IC).

Padrões éticos. Os autores afirmam que todos os procedimentos que contribuem para este trabalho estão em conformidade com os padrões éticos dos comitês nacionais de instituições relevantes sobre experimentação humana e com a Declaração de Helsinque de 1975, revisada em 2008. Além disso, este estudo foi inserido na Plataforma Brasil e aprovado por Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estácio de Sá, UNESA, RJ (protocolo 466748/2013).

RESULTADOS

A nested-PCR, região do gene *eryD*, identificou 17 (30,9%, IC 95% 18,7% a 43,1%) QMA positivos para *Brucella* spp. na região do Serro, Minas Gerais, Brasil.

Nove produtos de nested-PCR foram selecionados aleatoriamente e submetidos a sequenciamento de DNA. Essas análises revelaram que todos os produtos de PCR apresentaram similaridade de 100% (todos os 363 pares alinhados) com as sequências de DNA de campo de *Brucella* spp. disponíveis no GenBank.

Houve uma menor similaridade do produto amplificado com o DNA da vacina B19 de *Brucella abortus* (apenas 238 pares alinhados). Este menor alinhamento de produtos sequenciados com *Brucella abortus* B19 depositado no GenBank é devido a uma deleção de parte do gene *eryD* presente na cepa vacinal.

DISCUSSÃO

Todos os rebanhos analisados apresentaram resultados negativos para a brucelose, por meio do teste de antígeno tamponado em placa, realizado por veterinários particulares habilitados pelo PNCEBT. Porém, a nested-PCR, região do gene *eryD*, mostrou QMA positivos para *Brucella* spp. na região do Serro, em Minas Gerais, e sequenciamento de produtos de PCR amplificados demonstraram ser de campo.

A alta porcentagem (30,9%) de QMA positivo para *Brucella* spp. e, conseqüentemente, de rebanhos leiteiros positivos no presente estudo é expressivamente superior à prevalência de 6,0% encontrada em uma pesquisa.¹² Essa maior positividade entre os rebanhos do presente estudo pode ser decorrente da aquisição de animais com alta produção de leite, supostamente positivos, sem a cobrança por parte dos produtores de resultados negativos nos testes para a brucelose.

Os resultados do presente estudo corroboram os de Myiashiro et al., que encontraram positividade de 19,27%, utilizando testes de PCR para a detecção de *Brucella* spp. em queijos Minas frescal e em curados dos estados de Minas Gerais e São Paulo, todos vendidos sem inspeção sanitária.¹³ No entanto, o presente estudo encontrou apenas amostras de campo de *Brucella*, enquanto Myiashiro et al. encontraram 81,08% de amostras vacinais de B19 e apenas 18,92% de cepas de campo de *Brucella*.¹³

De acordo com o Decreto Estadual nº 42.645 de 5 de junho de 2002, os rebanhos de agroindústrias produtoras de QMA têm que ser negativos para a brucelose.¹⁴

Embora o teste de PCR e o sequenciamento de DNA utilizados não tenham comprovado a viabilidade de *Brucella* spp. detectada nos queijos estudados, eles atestam a presença desse problema sanitário nos rebanhos estudados e que o Decreto acima não está sendo completamente cumprido para a produção artesanal segura.

Brucella é um grupo de organismos resistentes, que podem sobreviver a períodos prolongados no leite e produtos lácteos e isso é altamente relevante para a transmissão desses patógenos para os seres humanos por produtos alimentícios. Nevoit et al., utilizando uma tecnologia de queijos macios, demonstraram que oito linhagens de *Brucella*, das três principais espécies *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis*, cultivadas *in vitro* e adicionadas ao leite cru, poderiam sobreviver em queijos normalmente acidificados (pH 4,5 no dia 1) por mais de 29 dias.¹⁵

A mesma equipe utilizou leite de vacas infectadas experimentalmente para estudar a sobrevivência de uma amostra virulenta de *Brucella abortus* em queijo tipo Camembert, mantido em câmara a 12 °C no momento da maturação, processados conforme citado anteriormente. Após a acidificação, as contagens diminuíram consistentemente a uma taxa tal que nenhuma *Brucella* pode ser recuperada após o 18º dia, seja por cultura bacteriológica ou por administração experimental oral em camundongos.¹⁶ Essa diferença na sobrevivência pode estar relacionada à resistência de *Brucella*, que pode ser maior para algumas cepas do que para outras.

É possível que outros organismos possam influenciar a sobrevivência de *Brucella* em queijos, já que no queijo elaborado com leite cru e amadurecido a 24 °C, pH 4,0 e aw de 0,89 estirpes sobreviveram até o dia 17 e em queijo elaborado com leite pasteurizado nas mesmas condições, as cepas sobreviveram até os dias 24 a 31 de maturação. Além disso, quando o queijo foi elaborado com leite cru e maturado a 4 °C, a sobrevivência das cepas foi de 17 a 24 dias (pH 5 e aw 0,90). Em relação ao queijo elaborado com leite pasteurizado e maturado na mesma temperatura, as linhagens sobreviveram 31 dias (pH 5 e aw 0,90).¹⁷ Esses tempos de sobrevivência em queijo de leite cru foram muito superiores ao tempo mínimo de maturação de 17 e 22 dias proposto preliminarmente como seguro para o queijo deste estudo (Serro) e outros queijos artesanais do Brasil (Canastra), respectivamente.^{18,19} No entanto, esses períodos basearam-se na sobrevivência de alguns patógenos estabelecidos por lei para serem examinados em alimentos, mas não incluíram *Brucella* spp., *Mycobacterium bovis*, entre outros, que precisam ser pesquisados em estudos futuros de sobrevivência em queijos artesanais do Brasil.

Mesmo o período de maturação de 17 dias estipulado por lei para o queijo artesanal do Serro não é respeitado pelos produtores, cujo queijo é vendido entre apenas 4 e 8 dias após a fabricação. Isso torna essa prática ainda mais arriscada para a saúde pública, porque os baixos tempos de maturação não são suficientes para atingir o pH entre 4,0 e 3,5 necessários para a inativação lenta ou rápida de *Brucella*, de acordo com as recomendações da OMS.²⁰

A legislação do Estado de Minas Gerais não faz referência à busca de *Brucella* diretamente no QMA, apesar da importância dessa doença zoonótica para a saúde pública. Neste estado, o único controle disponível, dirigido a *Brucella* para QMA destinado ao mercado intraestadual é o controle anual do rebanho para brucelose pelo exame dos animais e vacinação de bezerras. Além disso, para as agroindústrias autorizadas a vender QMA fora deste estado, a certificação de “livre de brucelose” é um requisito adicional. Essas certificações são importantes, embora as agroindústrias “livres de brucelose” não sejam isentas para sempre para *Brucella* spp., conforme demonstrado por Soares Filho et al.²¹ Assim, controles adicionais para aumentar a segurança de produtos feitos a partir de leite cru devem ser encorajados, como maturação por período longo, e monitoramento mais frequente da segurança do leite cru usada no processamento de queijos artesanais.

Esse monitoramento da segurança do leite cru poderia tirar proveito de diagnósticos rápidos baseados na detecção direta de DNA específico, como o presente estudo fez, ou na detecção de anticorpos anti-*Brucella*. Monitorar os rebanhos dessas agroindústrias com testes rápidos para detecção de anticorpos no leite cru, como o teste do anel, poderia aumentar a garantia de que os testes de brucelose estão sendo realizados pelos veterinários privados e que os status “monitorados para” ou “livres de” brucelose **são de fato verdadeiros. Por outro lado, a detecção de DNA de *Brucella* spp. diretamente do queijo artesanal foi utilizada por este e outros estudos, mostrando-se complementares aos testes sorológicos tradicionais para *Brucella* spp. em rebanhos.**^{13, 22-24}

Os surtos de brucelose humana transmitidos por alimentos são comuns em todo o mundo.^{25,26} Também no Brasil foi observada a associação significativa ($p < 0,05$) entre as pessoas testadas positivas para brucelose e a ingestão de leite cru ou seus derivados.⁷ Dada a importância de zoonoses como a brucelose, que pode ser diretamente eliminada no leite de vacas infectadas, o IMA e outras entidades de defesa governamental devem tratar agroindústrias artesanais de queijo de leite cru como “de maior risco para o consumidor”. Esta designação não deveria ser entendida como alarmante, mas para disseminar o entendimento de que para alguns patógenos, como *Brucella*, que são diretamente transmitidos de

animais infectados por meio do leite, a erradicação desse patógeno em rebanhos específicos seria a única maneira de garantir a segurança do leite cru e seus derivados, sendo os enfoques exclusivamente focados na ordenha e higiene de fabricação insuficientes para este patógeno em questão.

Os resultados do presente estudo reforçam que o QMA contaminado com *Brucella* spp. pode representar um risco potencial à saúde pública e não pode ser negligenciado pelas autoridades sanitárias e agropecuárias brasileiras, uma vez que esse patógeno tem sido encontrado viável em queijos com o mesmo processo de fabricação e tempo de maturação deste estudo.²⁷ Como a brucelose bovina é uma doença enzoótica em praticamente todos os estados brasileiros, incluindo Minas Gerais, os procedimentos para a erradicação desta doença, seguida pelo monitoramento da doença e sistema de vigilância epidemiológica devem ser adotados pelos produtores de QMA como única forma de garantir produto seguro para consumo humano.^{28,29} Além disso, essas agroindústrias exigem um maior monitoramento pelos inspetores agropecuários sobre o controle sanitário do rebanho e a certificação do status de livre de brucelose, incluindo a vigilância ativa e a detecção do comércio informal de bovinos infectados com *Brucella*.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pela EMBRAPA (SEG 06.11.01.012.00.00 e SEG 02.13.10.007.00.00) e pela FAPEMIG (números de outorgas CVZ-APQ-02746-14 e CVZ-PPM-00526-16).

REFERÊNCIAS

1. Ribeiro JA. A evolução da tecnologia queijeira. Rev Inst Latic Cândido Tostes. 1958; 13:27-30.
2. Reis AR. Caracterização físico-química e identificação dos elementos metálicos dos queijos Minas do Serro e Minas da Serra da Canastra (dissertação). Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Univ Fed Minas Gerais. 1998; 96 pp.
3. Pires MCS. Memória e arte do Queijo do Serro: o saber sobre a mesa. Belo Horizonte: Editora UFMG. 2013; 200 pp.
4. EMATER. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. Queijo Minas Artesanal: tradição e qualidade que revelam Minas. Revista da EMATER – MG 2004; XXII:8-9.

5. Hartigan PJ. Human brucellosis epidemiology and clinical manifestations. Continuing Education. 1997; 50:15-7.
6. Verraes C, et al. A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. Int Dairy J. 2015; 50:32-44.
7. Ramos TRR, et al. Epidemiological aspects of an infection by *Brucella abortus* in risk occupational groups in the microregion of Araguaína, Tocantins. Braz J Infect Dis. 2008; 2:133-8.
8. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Brasil. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Brasília: MAPA/SDA/DAS. 2006; 188 pp.
9. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J Mol Biol. 1975; 94:441-8.
10. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA. 1977; 74:5463-7.
11. Altschul SF, et al. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990; 215:403-10.
12. Gonçalves VSP, et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no estado de Minas Gerais. Arq Bras Med Vet Zootec. 2009; 61:35-45.
13. Miyashiro S, et al. Detection of *Brucella* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the polymerase chain reaction (PCR). Braz J Microbiol. 2007; 38:17-22.
14. Minas Gerais. Decreto nº 42.645, de 05 de Junho de 2002. Aprova o Regulamento da Lei nº 14.185, de 31 Janeiro de 2002, que dispõe sobre o Processo de Produção de Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte: Minas Gerais.
15. Nevot A, et al. Recherches sur les conditions de survie des bactéries pathogènes dans les fromages à pâte molle. Ann Inst Pasteur. 1962; 103:128-34.
16. Plommet M, et al. Survival of *Brucella abortus* in ripened soft cheese made from naturally infected cow's milk. Le Lait. 1988; 68:115-20.
17. Santiago-Rodríguez MR, et al. Survival of *Brucella abortus* aqpx mutant in fresh and ripened cheeses. Foodborne Path Dis. 2015; 12:170-5.

18. Dorés MT. Queijo Minas Artesanal da Canastra maturado à temperatura ambiente e sob refrigeração [tese]. Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Universidade Federal de Viçosa. 2007; 91 pp.
19. Martins JM. Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do Queijo Minas Artesanal da região do Serro [tese]. Viçosa, Minas Gerais, Brasil: Universidade Federal de Viçosa. 2006; 129 pp.
20. Corbel MJ. Brucellosis in humans and animals. Geneva: World Health Organization Library. 2006; 102 pp.
21. Soares Filho PM, et al. Confirmação de infecção por Brucella abortus em um rebanho bovino certificado livre em Minas Gerais: relato de caso. Arq Bras Med Vet Zootec. 2012; 64:1133-6.
22. Ning P, et al. Short communication: evaluation of Brucella infection of cows by PCR detection of Brucella DNA in raw milk. J Dairy Sci. 2012; 95:4863-7.
23. Ota ETS. Detecção de Brucella abortus em produtos lácteos produzidos em Santa Catarina pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real [dissertação]. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil: Universidade Federal de Santa Catarina. 2013; 67 pp.
24. Poulsen KP, et al. Short Report: Brucellosis in Dairy Cattle and Goats in Northern Ecuador. Am J Trop Med Hyg. 2014; 4:712-5.
25. Román JR, et al. Case Report: First Report of Orchitis in Man Caused by Brucella abortus Biovar 1 in Ecuador. Am J Trop Med Hyg. 2012; 3:524-8.
26. Román K, et al. A Foodborne Outbreak of Brucellosis at a Police Station Cafeteria, Lima, Peru. Am J Trop Med Hyg. 2013; 88:552-8.
27. Bezerra SS. Detecção da Brucella spp. em queijos de coalho produzidos com leite cru [tese]. Recife, Pernambuco, Brazil; 2014.
28. Poester FP, Gonçalves VSP, Lage AP. Brucellosis in Brazil. Vet Microbiol. 2002; 90:55-62.
29. Poester F, et al. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: introdução. Arq Bras Med Vet Zootec. 2009; 61(supl. 1):1-5.