**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Prevalência de *Listeria monocytogenes*, coliformes totais e *Escherichia coli* em
leite cru refrigerado e ambiente de ordenha de propriedades leiteiras do
Estado de São Paulo**

Tarsila Mendes de Camargo

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos

**Piracicaba
2010**

Tarsila Mendes de Camargo
Biomédica

**Prevalência de *Listeria monocytogenes*, coliformes totais e *Escherichia coli* em
leite cru refrigerado e ambiente de ordenha de propriedades leiteiras do
Estado de São Paulo**

Orientador:
Prof. Dr. **ERNANI PORTO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos

Piracicaba
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Camargo, Tarsila Mendes de

Prevalência de *Listeria monocytogenes*, coliformes totais e *Escherichia coli* em leite cru refrigerado e ambiente de ordenha de propriedades leiteiras do Estado de São Paulo / Tarsila Mendes de Camargo. - - Piracicaba, 2010.
104 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Coliformes 2. *Escherichia coli* 3. Leite 4. *Listeria* 5. Microbiologia de alimentos 6. Ordenha
Título

CDD 637.1277
C172p

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

“A minha mãe Cida, por tudo que ela me representa”

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e fé para seguir sempre em frente.

Aos meus pais, Caim e Cida pelo carinho e apoio.

A minha mãe Cida, pelo exemplo de profissional dedicada.

A minha vó Helena, pelo exemplo de superação e vida.

Ao meu orientador Ernani Porto pelo exemplo de profissional pesquisador, oportunidade e ensinamentos.

A amiga Giovana pela dedicação, amizade, companheirismo e ajuda durante todo o período de trabalho.

A grande amiga Milla, minha eterna gratidão.

A Denise pelo auxílio nas análises laboratoriais e por todo amor e carinho.

As estagiárias Laura, Claudine, Alessandra, Natália, Livia e Maira pela colaboração na execução deste trabalho.

Ao amigo Rafael pela atenção e paciência, aos amigos Bruno, Mário (Tida), Thalita, Bruna, Marina, Daniele e demais colegas de pós-graduação que tive o prazer de conviver estes anos.

A amiga e pesquisadora Maria Marta, pelas sugestões no trabalho.

As Bibliotecárias Beatriz e Maria Cristina pela atenção e correções no trabalho.

As propriedades leiteiras por participarem gentilmente do trabalho.

A FAPESP pela bolsa de estudos.

A Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Qualidade do leite.....	17
2.1.1 Obtenção higiênica do leite	18
2.1.2 Qualidade da silagem.....	20
2.1.3 Produção de leite no Brasil.....	21
2.1.4 Microbiota inicial do leite	22
2.1.5 Microrganismos contaminantes do leite	23
2.1.6 Microrganismos indicadores coliformes e <i>E. coli</i>	23
2.2 <i>Listeria</i> ssp.....	25
2.2.1 Taxonomia	25
2.2.2 Características morfológicas e bioquímicas	26
2.2.3 Listeriose	27
2.2.4 Mecanismo de infecção	28
2.2.5 Patogenicidade e fatores de virulência	29
2.2.5.1 Internalinas	30
2.2.5.2 Listeriolisina O	31
2.2.5.3 Proteína ActA	32
2.2.5.4 Fosfolipases e outros	32
2.3 Alimentos envolvidos em surtos de Listeriose.....	32
2.4 Métodos de isolamento e tipagem molecular de <i>L. monocytogenes</i>	34
2.5 Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> em leite cru.....	35
3 OBJETIVOS.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Área de estudo	41
4.2 Amostragem	41
4.2.1 Período de coleta das amostras.....	41
4.2.2 Coleta de amostras e dados dos questionários.....	42
4.2.3 Amostras do ambiente de ordenha.....	44
4.3 METODOLOGIA.....	46
4.3.1 Procedimentos Laboratoriais	46
4.3.2 Isolamento de <i>L. monocytogenes</i> em leite cru e ambiente de ordenha.....	47
4.3.3 Isolamento de <i>L. monocytogenes</i> pelo Método de enriquecimento a frio	47
4.3.4 Confirmação das colônias típicas	47
4.3.5 Confirmação bioquímica	47
4.3.6 Enumeração de coliformes totais e <i>E. coli</i>	48
4.3.7 Sorotipagem.....	48
4.3.8 Delineamento experimental e análise estatística	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1 Caracterização das propriedades leiteiras das regiões A, B e C.....	51
5.2 Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i> e enumeração de coliformes totais e <i>E. coli</i>	64
6 CONCLUSÕES	81

REFERÊNCIAS.....	82
ANEXOS	

RESUMO

Prevalência de *Listeria monocytogenes*, coliformes totais e *Escherichia coli* em leite cru refrigerado e ambiente de ordenha de propriedades leiteiras do Estado de São Paulo

A cadeia produtiva do leite pode favorecer a contaminação por *Listeria monocytogenes* bem como outras espécies de *Listeria* sp, e o leite cru pode servir de fonte de contaminação para a indústria e subprodutos. Fatores como saúde do animal, ordenhador, boas práticas de manejo e limpeza adequada de equipamentos e utensílios garantem um leite de melhor qualidade e com baixa contagem de coliformes. A refrigeração do leite é um aspecto importante implementado pela IN 51, na qual o leite cru deve permanecer a 4°C na propriedade leiteira em tanques ou a 7°C em latões, porém a esta temperatura pode ocorrer a proliferação de microrganismos psicotróficos como as espécies de *Listeria* sp. Três Regiões A, B e C com 25 propriedades fornecedoras de leite para cada região foram caracterizadas por meio da aplicação de um questionário e avaliadas quanto à presença de *Listeria monocytogenes*, coliformes totais e *E. coli* em leite cru e avaliadas quanto a presença de *Listeria* sp em ambiente de ordenha. Foram avaliadas 287 amostras de leite cru, 10 Mechas de Moore e 49 amostras ambientais. As análises foram feitas de acordo com protocolo preconizado pelo FDA descrito no Bacteriological Analytical Manual (BAM), com enriquecimento em BLEB e plaqueamento em meios Oxford e ALOA. A confirmação dos isolados foi feita em Kit Api Listeria. Das 75 fazendas estudadas, 77,3% (n=58) apresentaram condições insatisfatórias de produção de leite, higienização de equipamentos e infra-estrutura; 20% (n=15) em condições regulares e apenas 2,7% (n=2) em condições satisfatórias. Quanto à enumeração de coliformes totais, nas regiões A, B e C, as amostras de leite apresentaram 86% (n=85), 75% (n=71) e 72% (n=66) de contagens acima de 10^3 NMP/mL, respectivamente e *E. coli* esteve presente em 66% (região A), 66% (região B) e 49% (região C) das amostras. Das amostras de leite cru em relação à presença de *L. monocytogenes* todas foram negativas. Das mechas de Moore todas foram negativas para *Listeria* sp e as amostras do ambiente de ordenha foram positivas em uma propriedade da região C em dois pontos, sendo eles: ralo e chão de ordenha representando 4,44% das amostras ambientais, sendo os isolados pertencentes à espécie *Listeria innocua*. Nas duas cepas foram feitas a análise por sorotipagem pela Fio Cruz/RJ e o resultado foi de sorotipo 6a e 6b. No ralo de ordenha foram testadas duas colônias sendo encontrados dois sorotipos diferentes 6a e 6b indicando a presença de dois sorotipos em uma mesma amostragem e no piso da sala de ordenha as duas colônias testadas foram do sorotipo 6a. Embora não tenha sido detectada a presença de *L. monocytogenes*, a presença de *L. innocua* nas amostras pode indicar presença presumida de *L. monocytogenes* visto que as mesmas apresentam características fisiológicas semelhantes e podem ocorrer no mesmo ambiente. Quanto à produção do leite, apesar da vigência da IN 51, as regiões estudadas ainda encontram-se, em geral, em condições precárias e são necessárias muitas mudanças para se obter um leite de melhor qualidade.

Palavras-chave: *Listeria* sp; Leite cru; Coliformes; *E. coli*

ABSTRACT

Prevalence of *Listeria monocytogenes*, total coliforms and *Escherichia coli* in raw milk and milking environment from dairy farms of São Paulo State

The production chain of milk may promote contamination by *Listeria monocytogenes* and other species of *Listeria* sp and raw milk can serve as a source of contamination for the industry and byproducts. Factors such as animal health, milker, good management practices and proper cleaning of equipment and utensils provide a better quality milk with low coliform counts. The cooling of milk is an important aspect introduced by the IN 51, in which the raw milk should remain at 4 °C in dairy farms in tanks or 7 °C in cans, but at this temperature can occur proliferation of psychrotrophic microorganisms, such as species of *Listeria* sp. Three regions A, B and C with 25 farms which supply milk for each region were characterized by applying a questionnaire and evaluated for the presence of *Listeria monocytogenes*, coliforms and *E. coli* in raw milk and for the presence of *Listeria* sp in the milking environment. We evaluated 287 samples of raw milk, Moore 10 wicks and 49 environmental samples. Analyses were made according to a protocol recommended by the FDA as described in the Bacteriological Analytical Manual (BAM), with enrichment and plating media Bleb Oxford and ALOA. Confirmation of isolates was done in Kit Api Listeria. Of the 75 farms studied, 77.3% (n = 58) showed unsatisfactory conditions of milk production, hygiene equipment and infrastructure, 20% (n = 15) on a regular basis and only 2.7% (n = 2) in satisfactory condition. As for the enumeration of coliforms, in regions A, B and C, milk samples showed 86% (n = 85), 75% (n = 71) and 72% (n = 66) scores above 10³ MPN / mL, respectively, and *E. coli* was present in 66% (region A), 66% (region B) and 49% (region C) of the samples. All the raw milk samples were negative for the presence of *L. monocytogenes*. The fuses Moore were all negative for *Listeria* sp, and the environmental samples were positive for milking on a farm in the region C in two points, namely: the floor drain and milking, which represent 4.44% of environmental samples, and the isolates belong to the species *Listeria innocua*. In the two strains the analysis were made by serotyping, executed by Fio Cruz / RJ, and the results were serotype 6a and 6b. In the drain of milking two colonies were tested, founding two different serotypes, 6a and 6b, indicating the presence of two serotypes in the same sampling and floor in the parlor. The two colonies tested were of serotype 6a. Although not detected the presence of *L. monocytogenes*, the presence of *L. innocua* in samples may indicate presumed presence of *L. monocytogenes* since they have similar physiological characteristics and may occur in the same environment. For milk production, despite the validity of the IN 51, the regions studied are still generally in poor condition and many changes are necessary to achieve a better quality milk.

Keywords: *Listeria* sp; Raw milk; Coliforms; *E. coli*

1 INTRODUÇÃO

A preocupação do consumidor brasileiro em adquirir um alimento seguro, tanto do ponto de vista nutricional quanto microbiológico é crescente, o que leva a indústria de alimentos a representar um papel de suma importância na qualidade dos alimentos.

Inúmeros fatores são atribuídos ao sucesso na qualidade dos alimentos e seus subprodutos, entre eles: matéria-prima de boa qualidade, segurança operacional e microbiológica durante o processamento, manipulação, transporte e armazenamento adequado. Estes são pontos-chaves que formam um conjunto interligado de ações, onde qualquer falha representa risco de contaminação para o alimento e consequentemente ao consumidor. Essas etapas de processamento de alimentos devem ser seguidas rigorosamente, uma complementando a outra, sendo o ponto mais crítico a qualidade da matéria-prima, que desempenhará papel crucial no produto final.

Dentre os alimentos, o leite destaca-se na mesa do consumidor, oferecendo composição rica em nutrientes, muitas vezes sendo o alimento de primeira opção, como no caso de recém-nascidos e crianças, levando a uma maior preocupação com a sua qualidade e segurança pelo grande potencial para o desenvolvimento microbiano.

Neste contexto a Legislação forçou a indústria de laticínios a exigir produtores de leite de melhor qualidade e dentro das normas nacionais implementadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e pela Instrução Normativa 51 (IN 51), visando estabelecer critérios para a produção, identidade e qualidade do leite. Um dos principais objetivos é a refrigeração do leite a 4°C em tanques de expansão e 7° C em latões, com o intuito de limitar o desenvolvimento de microrganismos mesófilos. Porém esta prática deve vir juntamente com a higiene na ordenha, limpeza adequada dos equipamentos e mão de obra qualificada. Essas práticas têm como objetivo garantir um leite de melhor qualidade, e com baixa contagem de coliformes.

De acordo com a IN 51, para o leite tipo “A”, a pasteurização é realizada na própria granja leiteira. Para o leite tipo “B” a refrigeração a 4° C na estocagem e para o cru refrigerado a 7° C, no máximo, ambos armazenados em tanques e pasteurizados em usina (BRASIL, 2002). No Brasil, de modo geral, o leite é obtido em condições higiênico-sanitárias deficientes, apresentando elevados números de microrganismos, (CERQUEIRA et al., 1995). Após a

implantação da IN 51, há poucos relatos na literatura científica sobre as condições de produção e armazenamento de leite cru em propriedades.

Embora a análise de coliformes em alimentos seja muito comum e utilizada em grande escala como indicadores de qualidade microbiológica existem poucos trabalhos no Brasil que avaliaram a presença de coliformes em leite cru (GOTTARDI et al., 2008; MORAES et al., 2005; TEBALDI et al., 2008). Apesar da vigência da IN 51 não existe no Brasil uma legislação que contemple a exigência de coliformes em leite cru.

Apesar dos esforços da IN 51 pelas novas implantações, mesmo em temperaturas de refrigeração, os psicrótrófos se desenvolvem bem e podem se multiplicar comprometendo a qualidade do leite, dentre eles o gênero *Listeria*, com destaque para *Listeria monocytogenes*, um microrganismo patogênico, causador de surtos de alta mortalidade (até 50%), que tolera altos e baixos valores de pH e altas concentrações de sais, sendo de grande interesse em laticínios, implicando no controle de qualidade na indústria, devido a sua dificuldade de eliminação pela capacidade em formar biofilmes e possibilidade de desencadear surtos alimentares graves ao consumidor.

Listeria monocytogenes acomete principalmente pessoas com sistema imune comprometido, crianças, idosos e mulheres grávidas, entretanto pode atingir outros grupos populacionais, manifestando-se como um simples desconforto intestinal ou até mesmo desencadear meningites, septicemias, abortos e morte. Devido às características particulares e marcantes deste microrganismo, é necessário entender sua rota de transmissão, antes vista como uma bactéria de interesse veterinário e que atualmente encontra-se em ampla disseminação, sendo um problema para toda a cadeia produtiva do leite, desde a fazenda, processamento de alimentos e produto final.

Pesquisas realizadas no Brasil (CATAO et al., 2001; LANDGRAF et al., 1999; MOURA et al., 1993), relatam a incidência de *L. monocytogenes* em leite cru, salientando a preocupação sobre as possíveis fontes de contaminação e dados epidemiológicos sobre esse agente. Dessa forma, a cadeia produtiva do leite e o processamento na indústria podem favorecer a contaminação por *L. monocytogenes*, e o leite cru servir de fonte de contaminação.

No Brasil existem poucos relatos na literatura científica sobre as condições de produção e armazenamento do leite. Também existem poucas pesquisas sobre a ocorrência de *Listeria* sp em leite cru, especialmente após a implantação da IN 51.

Dessa maneira o presente estudo é importante para rastrear a origem da fonte de contaminação por *Listeria* sp, principalmente por *L. monocytogenes*, avaliando os fatores de riscos que envolvem a cadeia produtiva do leite em relação a este microrganismo e as condições higiênico-sanitárias do leite produzido pelas regiões analisadas pela contagem de coliformes totais e *E. coli*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Qualidade do leite

O leite é um alimento de grande importância na alimentação humana, devido ao seu elevado valor nutritivo. É fonte de proteínas, lipídeos, carboidratos, minerais e vitaminas, tornando-se também um excelente meio de cultura para o crescimento de vários grupos de microrganismos desejáveis e indesejáveis (SOUZA et al., 1995).

A presença e multiplicação de microrganismos provocam alterações físico-químicas no leite, que limita sua durabilidade e, conseqüentemente, geram problemas econômicos e de saúde pública, necessitando, então, que o produto seja submetido a tratamento térmico, visando à eliminação de contaminantes antes que seja oferecido ao consumo humano (OLIVEIRA, 1999).

A comercialização do leite cru, ou seja, sem passar por qualquer tratamento térmico, é comum em algumas regiões do país, devido à crença popular de que este tipo de leite seja mais rico em nutrientes e, principalmente ao baixo custo, pois ele é consumido principalmente pela população de baixa renda (NASCIMENTO, 1991).

No Brasil, de modo geral, o leite é obtido sob condições higiênico-sanitárias deficientes, apresentando elevados números de microrganismos, o que constitui um risco à saúde da população, principalmente quando consumido sem tratamento térmico (CERQUEIRA et al., 1995).

Em relação ao leite e seus derivados, os cuidados higiênicos para evitar a contaminação devem ser iniciados desde a ordenha e continuados até a obtenção do produto final. Diversos microrganismos patogênicos podem ser encontrados contaminando o leite, dentre eles podem-se destacar *Escherichia coli* e *L. monocytogenes* (RIELD, 1992).

A pasteurização do leite elimina parte da microbiota e um dos principais fatores da sua eficácia é exatamente a qualidade do leite cru, que está intimamente relacionada com o grau de contaminação inicial e com o binômio tempo/temperatura em que o leite permanece desde a ordenha até o processamento (MUTUKURIMA et al., 1996).

A qualidade do leite está associada com a carga microbiana presente e diretamente relacionada com as práticas de obtenção e manuseio pelo produtor, às condições de higiene de ordenha, a sanidade dos animais, ordenhador e a qualidade bacteriológica da água servida no estábulo (HUHN et al., 1980).

O leite contaminado com microrganismos muitas vezes patogênicos, como no caso do gênero *Listeria* e em destaque para *L. monocytogenes*, apresenta risco sério para a saúde pública, e representa papel importante na qualidade do leite e de seus derivados, bem como a produtos a base de leite. Pode provocar alterações indesejáveis nos produtos e afetar a saúde do consumidor, o que torna imprescindível o controle das condições higiênico - sanitárias e microbiológicas dos mesmos (CARVALHO apud KITCHEN, 1981).

No Brasil, em 2002, entrou em vigor a Instrução Normativa 51 na qual, dentre várias medidas a serem adotadas para a obtenção de leite de boa qualidade e seguro, foi implementado o resfriamento do leite cru a 4°C na propriedade e o seu transporte a granel, em caminhões refrigerados, até as indústrias (BRASIL, 2002). O principal objetivo de tais regulamentações é limitar o desenvolvimento de microrganismos mesófilos, grupo em que se encontra a maioria dos microrganismos patogênicos e deteriorantes. Embora a legislação (BRASIL, 2002) estabeleça que a temperatura do leite, em tanque de refrigeração por expansão, deva ser mantida a 4°C, Tebaldi et al., (2008) relatam que levantamentos numa região de Minas Gerais mostraram temperaturas de até 14 °C em leite mantido em tanques de refrigeração.

Durante o armazenamento refrigerado, somente microrganismos psicrotróficos podem crescer no leite cru, como *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, alguns coliformes, *Bacillus* e *Listeria* (RAY, 2000).

A presença de *Listeria monocytogenes* tem sido freqüente em superfícies em sistemas de ordenha, o que indica que a sanitização não é eficiente. Este tipo de procedimento de limpeza em sistemas de ordenha é essencial para se evitar a contaminação do leite (WONG, 1998).

Para assegurar a qualidade do leite e derivados, é fundamental a avaliação das características químicas, organolépticas e microbiológicas do leite cru a ser utilizado como matéria - prima (BRASIL, 1993).

2.1.1 Obtenção higiênica do leite

Os cuidados relacionados à obtenção do leite devem iniciar-se em sua fonte de produção, a ordenha, a qual deve ser um procedimento realizado com cuidado, pois o leite obtido em más condições de higiene torna-se um veículo de microrganismos deteriorantes e patogênicos, oferecendo um produto de qualidade inferior e que representa risco à população. É durante a sua produção, no curral e no estábulo de ordenha, que o leite recebe as maiores contaminações. No

estábulo é preciso que as vacas estejam alojadas em lugar espaçoso, bem arejado, com iluminação e acomodações adequadas (BEHMER, 1985).

Os sistemas de ordenha devem possuir quatro construções, independente do modelo adotado, seja manualmente, balde ao pé ou canalizado. Deve possuir sala de espera, sala de ordenha, sala de leite e sala de máquinas (BRASIL, 2002).

De acordo com a Instrução Normativa 51 (BRASIL, 2002) no que se refere às instalações, currais de espera e manejo são de exigência obrigatória: devem possuir área útil de 2,5m² por animal, permitindo espaços relativamente pequenos por vaca o que auxilia o trabalho do ordenhador no momento de conduzi-las até a ordenha. Deve possuir calçamento no curral de espera, dotado de piso de concreto e canaletas com inclinação suficiente para permitir o escoamento da água e resíduos. Todas as dependências do estábulo devem possuir mangueiras com pressão e rede de esgoto. A sala de leite deve ser ampla e apresentar ventilação, iluminação adequada e preferencialmente azulejada, sendo que o equipamento de refrigeração deve ser localizado neste espaço, onde o leite será armazenado resfriado antes de ser enviado ao laticínio, oferecendo condições adequadas para a transferência do leite refrigerado para o caminhão-tanque.

Em relação às condições específicas para a obtenção do leite, o teto do animal a ser ordenhado deve ser lavado, seguido de secagem em papel toalha descartável e descarte dos jatos iniciais de leite. As mãos dos ordenhadores devem estar bem limpas. Recomenda-se a desinfecção dos tetos antes com cloro (pré-dipping) e após a ordenha com iodo (pós-dipping) para que o esfíncter mamário volte a fechar e não permita a entrada de microrganismos. Os equipamentos de refrigeração devem ter capacidade mínima de armazenar a produção de acordo com a coleta. Se o armazenamento do leite for em tanque de expansão a temperatura deve ser igual ou inferior a 4°C, se for latão por imersão é permitido a temperatura de refrigeração até 7°C. O tempo entre a ordenha e o recebimento do leite pelo laticínio que vai beneficiá-lo, deve ser no máximo 48h, independente do seu tipo, sendo recomendado não ultrapassar um período de 24h (BRASIL, 2002).

O leite enquanto permanece armazenado nos alvéolos da glândula mamária é isento de microrganismos (MACHADO; CASSOLI, 2002). No entanto, durante a sua retirada no processo de ordenha e armazenamento, pode ocorrer contaminação com vários tipos de microrganismos que comprometem a sua qualidade. O leite quando obtido com altas contagens microbianas, fica

comprometido durante todo o seu processamento, a refrigeração mantém, mas não melhora a qualidade do leite.

2.1.2 Qualidade da silagem

A qualidade da forragem é determinada em grande parte pelo tipo de atividade microbiológica durante a ensilagem e utilização da silagem. Na atividade leiteira, geralmente onde há predomínio de fermentações secundárias, os prejuízos acabam sendo maiores em produção e qualidade do leite. Para a sua conservação é necessário um ambiente anaeróbico onde os agentes vão ser as bactérias lácticas, que irão fermentar os açúcares com produção de ácido láctico. Este processo é de caráter extremamente importante, a manutenção da anaerobiose e a queda de pH irão contribuir para a preservação da forragem, impedindo o crescimento de microrganismos que são inibidos pela fermentação (PAHLOW et al., 2003).

Porém, quando ocorre contato com o oxigênio durante o abastecimento do silo, armazenagem ou remoção, pode ocorrer à proliferação de microrganismos que deterioram a silagem e oferecem risco ao animal e, conseqüentemente, ao consumidor (LINDGREN et al., 1985).

Atualmente, segundo Gomes (2005), existe maior preocupação com relação à inocuidade do alimento produzido, como no caso do leite, um alimento muito difundido na população brasileira e que atinge toda a faixa etária, principalmente crianças em desenvolvimento. Dentro desse contexto, a segurança em relação aos aspectos sanitários, no uso de forragens conservadas, é altamente relevante.

Dessa maneira o produtor tem que ter a devida atenção em relação a esses aspectos, pois além de afetar a qualidade do leite, outros problemas podem surgir aos rebanhos. Microrganismos como *Clostridium* podem estar presentes nas forragens conservadas mesmo em anaerobiose, pois estes microrganismos são anaeróbios estritos representando alto perigo devido à capacidade de produzir toxinas, bem como o desenvolvimento de microrganismos do gênero *Listeria*, chamando atenção para a espécie *L. monocytogenes*, que são anaeróbios facultativos e crescem tanto em presença como ausência de oxigênio (PAHLOW et al., 2003).

Em um trabalho realizado por Poutrel et al., (1993) os autores relatam a relação entre o consumo de silagem de má qualidade e desenvolvimento de doenças como a listeriose.

2.1.3 Produção de leite no Brasil

O Brasil segue atualmente em crescente expansão mundial na produção de leite ao longo dos anos. Segundo relatam dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE, no 1º trimestre de 2010 foram adquiridos pelos estabelecimentos industriais inspecionados 5,2 bilhões de litros de leite, sendo este volume 5,7 % maior do que o registrado no mesmo trimestre de 2009, porém teve queda em sua produção em fevereiro de 2010 e crescimento em março.

A produção de leite está presente em todos os estados brasileiros, sendo a região Sudeste a maior região produtora de leite representando 41,1 % da aquisição de leite nacional. Do total do leite captado 27,4% vem do estado de Minas Gerais, 13,3% do estado do Rio Grande do Sul e Goiás com 11,9%(IBGE, 2010).

Devido à baixa qualidade do leite produzido e obtido no Brasil, dentro de um plano Nacional criou-se a Instrução Normativa 51 (IN 51) em 2002 (BRASIL, 2002), que prevê, progressivamente, a exigência do resfriamento de todo o leite na propriedade rural logo após a ordenha em todo o Brasil.

Os cuidados necessários e relacionados com a obtenção do leite cru se iniciam com o atestado de saúde do animal e do ordenhador, bem como condições higiênicas sanitárias do ambiente de ordenha. A ordenha, preferencialmente mecânica, deve ocorrer dentro dos mais criteriosos padrões sanitários, pois mesmo em condições ótimas, o leite representa uma carga microbiana que deve ser mantida constante, evitando a multiplicação da mesma no leite (AJZENTAL, 1994).

Esses procedimentos durante a obtenção e manutenção do leite até a sua entrada no estabelecimento de beneficiamento, determinam o tipo e a quantidade de contaminantes. A saúde do rebanho leiteiro, as boas práticas durante a ordenha, a conservação do leite sob refrigeração até o momento do processamento são fundamentais para evitar o desenvolvimento dos microorganismos responsáveis pela sua deterioração. Os cuidados para garantir um leite de boa qualidade como matéria-prima, são essenciais para a fabricação de bons produtos derivados (PONSANO et al., 1999).

Segundo Santos et al., (2008), a produção leiteira depende que quatro eixos principais que são interligados e não devem ser tratados de forma individual, pois dessa forma podem comprometer a produtividade e qualidade do leite, e consequentemente a rentabilidade da

produção pecuária. Os quatro eixos são a nutrição, a genética, o manejo e a sanidade do animal, e todos exercem papel fundamental na sustentabilidade da produção leiteira mundial.

Dessa maneira a produção leiteira em escala comercial é um conjunto de conceitos fisiológicos, genéticos, zootécnicos e sanitários (SANTOS et al., 2008).

As atividades de pesquisa que tem como objetivo o aumento do conhecimento e identificação dos conceitos da área acadêmica para o campo (produtor) são fundamentais para o aumento da quantidade e qualidade dos produtos da pecuária leiteira, garantindo a qualidade do leite e seus subprodutos. No Brasil no primeiro semestre de 2010 a exportação do leite in natura foi significativamente maior do que a registrada no primeiro semestre de 2009 e a quantidade de leite cru “in natura” destinado a industrialização foi de 5,1 bilhões de litros de leite (IBGE, 2010).

2.1.4 Microbiota inicial do leite

O leite é um produto de destaque na alimentação humana e a higiene leiteira tem que garantir a produção de leite com qualidade através da higiene humana e animal, sendo essa a primeira medida a ser adotada em termos de profilaxia e prevenção, impedindo a transmissão de doenças (GARCIA et al., 2000).

O Ministério da Agricultura e Abastecimento e Reforma Agrária (MAARA), a Secretaria de Inspeção Federal (SIF), considerando a importância representada pelo controle de qualidade das matérias-primas, produtos e subprodutos de laticínios, visando à preservação da saúde do consumidor, e o combate a fraudes, aprovaram em 07/03/1983 a Portaria nº. 6, que dispõe sobre o “Sistema de controle da qualidade do leite e dos produtos lácteos”. Esta portaria determina que o leite “in natura”, imediatamente após a sua chegada ao estabelecimento recebedor, deve ser controlado, bem como deve ser verificada a higiene do veículo e dos latões para o transporte do leite.

Dentre as bactérias presentes no leite destacam-se *Micrococcus*, seguido por *Streptococcus* e *Corynebacterium*. A quantidade e o tipo de microorganismo podem ser afetados em condições anormais resultantes de infecções e enfermidades, devido à realização de ordenha sem higiene, onde o leite alcança altos valores de carga microbiana (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS- ICMSF, 1996).

As principais fontes responsáveis pelo desenvolvimento microbiano inicial podem ser equipamentos de ordenha e limpeza deficiente, que propiciam o rápido desenvolvimento de bactérias coliformes e bacilos gram positivos, como as do gênero *Listeria* (JAY, 1992).

2.1.5 Microorganismos contaminantes do leite

No leite produzido no Brasil os microorganismos patogênicos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* estão praticamente sempre presentes no úbere com mastite, devido ao controle higiênico sanitário deficiente (TAVARES, 1996).

Microorganismos contaminantes, provenientes de equipamentos, utensílios, meio ambiente e mesmo do pessoal responsável pela obtenção e manipulação do leite, são os mais importantes sob o ponto de vista tecnológico, pois podem causar alterações indesejáveis no leite, comprometendo sua qualidade e de seus derivados, podendo inclusive, se tornar impróprio para o consumo e muitas vezes desencadear surtos (PONSANO et al., 1999).

A carga microbiana do leite cru desempenha papel de extrema importância na qualidade final de produtos lácticos. Um leite de baixa qualidade microbiológica não se conserva por longos períodos, mesmo sob refrigeração, devido a sua contaminação, principalmente pelas bactérias psicotróficas, formadoras ou não de esporos, que apesar de seu crescimento lento, produzem grande quantidade de enzimas (lipases e proteases), que atuam no leite e alteram o produto, conferindo sabor amargo, de frutas ou pútrido, e tonalidade roxa. Geralmente, as mudanças no sabor ou aparência física, se devem a microorganismos que apresentam essas atividades, como coliformes, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* e *Pseudomonas* (BISHOP; WHITE, 1988; CRAVEN; MACAULEY, 1993; ICMSF, 1980).

2.1.6 Microorganismos indicadores coliformes e *E. coli*

Coliformes são um grupo de bactérias encontradas no ambiente, incluindo solo, águas de superfície, vegetação e trato intestinal de animais de sangue quente. Os coliformes são indicadores da qualidade higiênico-sanitária de alimentos, são facilmente destruídos pelo calor e não devem sobreviver a tratamentos térmicos adequados. Assim, no caso de alimentos pasteurizados, são indicadores de falha de processo ou de contaminação pós-processamento. Para diversos alimentos prontos para consumo, inclusive lácteos, a legislação (BRASIL, 2001)

contempla o grupo dos coliformes totais e termotolerantes, estes últimos comumente chamados de coliformes fecais, um subgrupo dos coliformes totais restrito aos membros capazes de fermentar a lactose em 24 horas a 44,5-45,5°C, com produção de gás.

A *E. coli* está incluída no grupo dos coliformes termotolerantes e os métodos mais modernos, como o Simplate, diferenciam *E. coli*, através da verificação da atividade da enzima β -glicuronidase, produzida por 96% das cepas, incluindo as anaerogênicas (FENG;HARTMAN, 1982). O reservatório natural da *E. coli* é o trato intestinal de animais de sangue quente, embora a bactéria também possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais. A presença de *E. coli*, além de indicar contaminação fecal, indica o risco da presença de patógenos entéricos no alimento (FAO, 1995), pode, por si só, representar risco à saúde, pois algumas cepas são patogênicas.

O leite pode ser contaminado com *E. coli* no momento da ordenha ou por contato com as fezes dos animais. Outra rota de infecção, é a via oral-fecal que ocorre pelas mãos, ou pela excessiva manipulação de alimentos a serem ingeridos sem tratamento térmico (WELLS et al., 1991).

Os coliformes estão muito difundidos e podem ser detectados em vários tipos de alimentos. A presença destes em leite cru indica práticas de higiene precárias durante a ordenha e nas etapas subsequentes (MORENO et al., 1999).

Além de representar risco a saúde do consumidor, as linhagens de coliformes psicrótróficos podem se multiplicar no leite sob refrigeração (NASCIMENTO et al., 1991).

As fontes mais importantes de contaminação do leite por coliformes são os equipamentos de ordenha devido à limpeza e sanitização deficiente (MORENO et al., 1999).

A detecção de coliformes é usada como um indicador das condições sanitárias em ambientes de produção e processamento de leite, porém não há padrões legais para coliformes em leite cru no Brasil, mas somente para leite pasteurizado (BRASIL, 2002). De acordo com Jones (1999), a contagem de coliformes é um bom indicador das práticas higiênico-sanitárias de produção do leite. Altas contagens de coliformes em leite cru podem ser decorrentes da ordenha de vacas sujas, práticas higiênicas inadequadas, limpeza e sanitização inadequadas de equipamentos ou crescimento bacteriano. Além disso, a contagem de coliformes também pode ser influenciada por mastite causada por esses microrganismos (JONES, 1999).

2.2 *Listeria* spp

2.2.1 Taxonomia

O gênero *Listeria* sp encontra-se no Manual de Bergey's no grupo dos microrganismos bastonetes regulares Gram positivos e não esporogênicos, incluindo cinco espécies *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. ivanovvi*. Existem ainda mais três espécies, porém com classificação incerta, sendo a *L. grayi*, *L. murrayi* e *L. denitrificans* (HOLT, 1994).

O primeiro isolamento de *Listeria monocytogenes* em sangue de coelhos em 1926 por Murray e colaboradores classificou o microrganismo em *Bacterium monocytogenes*. Anos mais tarde o mesmo isolado agora feito por Pirie, dessa vez proveniente de fígado infectado de camundongo africano, recebeu o nome de *Listerella hepatolytica*. Logo após, estudos mostraram que esses dois microrganismos eram o mesmo, portanto foram denominados de *Listerella monocytogenes* (KUHN; GOEBEL, 1999).

A partir de 1940 por uma mudança proposta por Pirie, *Listerella monocytogenes* foi alterada para *Listeria monocytogenes*, que foi adotada na 6ª Edição do "Bergeys Manual of Determinative Bacteriology", sendo aprovado apenas em 1954 pela Comissão Judicial de Nomenclatura e Taxonomia Bacteriológica (KUHN, GOEBEL, 1999).

Ainda podem ser classificadas em duas linhagens de descendências designadas pelas letras minúsculas i e ii através de estudos baseados em DNA e sequenciamento.

A (linhagem i) é representada por *L. monocytogenes* e espécies relacionadas, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovvi* *subsp. ivanovvi* e *subsp. londoniensis* e também podem ser divididas em 2 grupos a) *L. monocytogenes* e *L. innocua* e b) *L. ivanovvi*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri* (ROCOURT, 1999). A (linhagem ii) é representada por *L. grayi* (*L. murrayi* foi recentemente incluída nessa linhagem).

Listeria monocytogenes é um microorganismo patogênico conhecido há muito tempo na microbiologia veterinária, porém tornou-se um dos mais conhecidos e importantes patógenos veiculados a alimentos, devido a surgimento de diversos surtos de listeriose em humanos (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

2.2.2 Características morfológicas e bioquímicas

As bactérias do gênero *Listeria* sp são capazes de se multiplicar em uma ampla faixa de temperatura, possuindo atividade fermentativa sobre carboidratos, produzindo lactato sem produção de gás quando metabolizam glicose (HOLT, 1994).

Listeria sp é uma bactéria parasita intracelular facultativa, e tem forma de bastonete. De acordo com a classificação do Bergey's Manual of Determinative Bacteriology é anaeróbio facultativo, Gram positivo, e não possui esporo. São bactérias móveis, tendo seu movimento através de flagelos peritríqueos, e como característica movimento de tombamento e a motilidade somente é expressa a 20- 25°C e não a 37°C (HOLT, 1994).

Em relação às suas características bioquímicas, *Listeria* sp é oxidase negativa, catalase positiva, sendo algumas espécies beta-hemolíticas em Agar sangue (*Listeria monocytogenes*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii*), D-xilose negativo, D-manitol negativo, L-ramnose positivo, alfa D-manosídeo positivo, fermentam a glicose, vermelho de metila positivo, Voges - Proskauer positivo, indol negativo, esculina positivo e não reduzem o nitrato (BILLE et al., 1992).

O gênero *Listeria* pode ser dividido em sorotipos, baseados em antígenos somáticos e flagelares e são identificados através de um esquema proposto por Seeliger e Hohne em 1979. É um esquema alfa numérico que estabelece os números (1/2, 3, 4, 5,6 etc), que descrevem os antígenos somáticos, enquanto que as letras (a, b, c, d, e, etc) referem-se aos antígenos flagelares.

A espécie *Listeria monocytogenes* pode ter 14 sorotipos, sendo eles: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4bX, 4b, 4c, 4d, 4e e 7. Porém os sorotipos mais frequentes encontrados em surtos e infecções humanas pertencem aos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b (GRAVES et al., 1999; ROCOURT et al., 2000). Em um estudo realizado por Hofer et al., (2006) observou-se que os sorotipos 4b e 1/2a também foram os mais frequentes associados entre os isolados de *Listeria monocytogenes*, dentre o período de 1969 a 2000.

As características bioquímicas que diferem *Listeria monocytogenes* de outras espécies são testes com resultados positivos para β - hemólise, Camp teste para *S. aureus*, patogenicidade para camundongos e fermentação da ramnose. Em relação a sua faixa de crescimento, a *L. monocytogenes* suporta repetidos congelamentos e descongelamentos, podendo crescer em uma faixa de 0 a 45°C (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Embora o pH ótimo para o seu crescimento esteja entre 6 e 8, consegue se desenvolver em uma faixa até maior, entre 5 e 9, sendo 7 o seu ótimo. É um dos poucos microorganismos

patogênicos que se desenvolvem em baixa atividade de água (0.93) e concentrações de NaCl a 10% (FARBER et al., 1992; ROCOURT, 1999). Encontra-se amplamente disseminada na natureza e tanto o homem como animais e o ambiente servem de reservatório desta bactéria. Está presente também, com grande frequência, em ambientes processadores de alimentos (CHAE et al., 2006).

As espécies do gênero *Listeria* podem contaminar ambientes de produção, processamento e distribuição de alimentos, ou seja, os riscos ocorrem desde a fazenda até a mesa do consumidor (BRITO et al., 2007).

2.2.3 Listeriose

Dentre as espécies de *Listeria*, *L. monocytogenes* é a espécie patogênica para o homem e animais (SILVA et al., 2001), sendo as outras espécies menos preocupantes para a saúde humana e animal. Porém, há descrição na literatura científica de um estudo de caso fatal de bacteremia pela espécie *Listeria innocua* (PERIN et al., 2003).

A listeriose humana é essencialmente transmitida através do consumo de alimentos contaminados, da contaminação do recém-nascido durante o parto, por infecção cruzada no ambiente hospitalar e pelo contacto com animais (McLAUCHLIN, 2004). Pode se manifestar tanto na forma invasiva como na não invasiva, e é muito semelhante a dos demais mamíferos.

A doença invasiva é caracterizada por sintomas severos como meningites e encefalite. Acomete principalmente mulheres grávidas, podendo levar ao parto prematuro ou aborto; indivíduos imunodeficientes, geralmente com câncer; transplantados; portadores de HIV, sob terapia imunossupressiva; além dos idosos, podendo também desenvolver processos de septicemia (SLUTSKER; SCHUCHAT, 1999).

A forma não invasiva resulta em uma gastroenterite febril (diarréia e febre), em muitos casos, com sintomas não aparentes e, conforme descrito por Schlech (1997) e por Dalton (1997) parece não afetar grupos populacionais específicos.

O período de incubação da listeriose varia de um dia a algumas semanas e não se conhece ainda a dose infectante para *Listeria monocytogenes*, seja para a síndrome invasiva, ou não invasiva. Dados de estudos realizados sobre surtos ou casos esporádicos relatam que a dose deve ser elevada (maior que 10^6 UFC/g ou mL do alimento) para que a bactéria seja causadora de uma infecção. Porém, em relatos de outros trabalhos, a dose infectiva pode provocar surtos mesmo

quando sendo baixa (menor que 10 UFC/g ou mL de alimento) (VALK et al., 2001).

Deve - se lembrar que a dose de infecção pode variar dependendo da patogenicidade e virulência da cepa envolvida e dos fatores de risco dos indivíduos expostos, além do tipo de veiculador do patógeno. Alimentos ricos em gordura, por exemplo, podem conferir proteção a *Listeria monocytogenes* às condições do ambiente estomacal ou durante a invasão do trato intestinal (BUCHANAN et al., 2000).

A mortalidade por listeriose é muito elevada podendo atingir até 50% (ROCOURT et al. 2000). Sendo assim dentre as Doenças Transmitidas por Alimentos é a que causa maior número de mortes (MEAD et al., 1999).

Perin et al., (2003) relataram a morte de uma mulher de 62 anos que deu entrada em um hospital apresentando dores abdominais, pressão corpórea baixa e febre muito alta (39,9°C), com quadro de evolução rápida que repercutiu em complicações hepáticas, neurológicas e septicemia e óbito 40 horas após a admissão no hospital. Após os testes para a identificação do agente etiológico, o isolado foi identificado com *Listeria innocua* sorotipo 6a. Chama atenção as características fisiológicas e bioquímicas do isolado, que apresentou positividade em Camp test com *S. aureus*. Dessa maneira torna-se importante também o estudo de cepas de *L. innocua*.

2.2.4 Mecanismo de infecção

Durante o seu processo infeccioso essa bactéria apresenta fatores clínicos específicos e propriedades únicas, como a capacidade de atravessar as barreiras intestinais, fetal e hemato - encefálica (PAGGOTO, 2006).

O processo de infecção por *L. monocytogenes* é chamado de “*zipper mechanism*”, pois sendo uma bactéria invasiva, ela mesma induz sua entrada nas células por meio de internalizações da membrana plasmática. Quando adentram a célula, ficam retidas em um vacúolo que é lisado em menos de trinta minutos, ficando livres no citosol e começam a se replicar. As bactérias atingem a membrana plasmática e induzem a formação de saliências, que ao serem formadas podem se invaginar em uma célula vizinha e dar origem a duas membranas de vacúolo. A própria bactéria lisa este vacúolo a fim de obter acesso a uma segunda célula infectada, se disseminado nos tecidos, por uma participação direta de célula a célula (TILNEY; PORTNOY, 1989).

Muitos estudos ao longo dos anos foram necessários para a obtenção de conhecimento sobre vários genes bacterianos e fatores críticos relacionados com o processo infeccioso (IRETON; COSSART, 1997) dentre eles: as internalinas para a entrada nas células, e os poros para a formação de listeriolisina (LLO) para a saída da bactéria do vacúolo formado. Porém algumas listeriolisinas podem ser ineficientes, e o rompimento do vacúolo pode ser realizado por outro fator de virulência a PI-PLC.

Os movimentos intercelulares e intracelulares são mediados pelas ActA, que é uma proteína de superfície. A lise do segundo vacúolo é realizada pela lecitinase (PC-PLC) e também pela LLO (COSSART, 2002).

2.2.5 Patogenicidade e fatores de virulência

A *Listeria monocytogenes*, após ser ingerida, atinge o trato intestinal aderindo e invadindo a mucosa e colonizando o hospedeiro. A seguir dissemina-se através da corrente sanguínea ou linfática, para o fígado e vesícula (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001). Se o sistema imunológico do hospedeiro estiver ativo, 5 a 7 dias pós-infecção, já não se encontra *L. monocytogenes* nos órgãos. Se a infecção não for controlada, como pode ocorrer em indivíduos com baixo sistema imune, a *L. monocytogenes* pode ser liberada na corrente sanguínea, ou infectar outra variedade de tecidos.

Somente algumas cepas são virulentas e vários fatores de virulência explicam a sua patogenicidade como as fosfolipases (plcA e plcB) que hidrolisam os lipídeos da membrana causando a ruptura da célula; a listeriolisina O (hly) que lisa as células do hospedeiro; metaloprotease (mpl) e proteína actA e dependem da proteína regulatória (prfA) (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Há outros genes que também codificam fatores de virulência desse grupo, como as internalinas, que estão relacionadas com o mecanismo de invasão da célula do hospedeiro, conferindo capacidade invasora. Dessa maneira, todas as cepas de *L. monocytogenes* devem ser consideradas patogênicas (HAMDI et al., 2007).

O processo infeccioso por *L. monocytogenes* acontece em 5 estágios, que geralmente estão intimamente ligados aos fatores de virulência expressos pela bactéria. Estes se resumem em: internalização do patógeno pela célula hospedeira, fuga do vacúolo, multiplicação da bactéria

dentro do citoplasma, direcionamento da bactéria para a célula hospedeira adjacente e, após a destruição do vacúolo, a *L. monocytogenes* está pronta para um novo ciclo (DESTRO, 2006).

Os fatores de virulência expressos pela bactéria e seus mecanismos de infecção podem ser observados na Figura 1.

Figura 1- Etapas do ciclo da infecção por *L. monocytogenes* e suas proteínas (fatores de virulência) The figure was adapted from Tilney & Portnoy. Annual Reviews Genetics, v.31, p.113-138,1997.

2.2.5.1 Internalinas

A Internalina A (InIA) é responsável pela entrada da bactéria nas células intestinais. Esta proteína possui um receptor na célula hospedeira, a E- cadaverina, que provoca a adesão célula-célula, dependendo do cálcio através de algumas interações homofílicas entre as células adjacentes (COSSART, 2002).

A InIA é formada por 800 aminoácidos com repetições formadas por leucina (Leucine Rich Repeats- LLR), um peptídeo sinal e uma região terminal-C que contém o peptídeo LPXTG, sendo encontrado apenas em bactérias Gram positivas. Contém também uma sequência hidrofóbica. Esta região terminal-C permite a ligação da proteína com o peptídeoglicano (COSSART, 1997).

A Internalina B (InIB) é a proteína responsável pela entrada da bactéria nos hepatócitos, células epiteliais ou fibroblastos, codificada por 630 aminoácidos, possuindo uma sequência sinal e outra região LLR. Esta proteína é de extrema importância na infecção hepática e está fracamente associada à membrana de bactérias Gram positivas. O seu receptor ainda é

desconhecido porém, alguns trabalhos, sugerem ligação com a fosfoinositídeo 3-cinase (PI-3 cinase) e um citoesqueleto de actina. Outra proteína de superfície, a ActA, também pode participar da invasão (COSSART; LECUIT, 1998).

A InIC não está envolvida no processo de entrada na célula epitelial, mas pode estar envolvida na virulência, sendo expressa quando a infecção está na fase de espalhamento intercelular ativo, participando da disseminação da infecção (VASQUEZ - BOLAND et al., 2001).

Os estudos mostram que existem ainda outras proteínas responsáveis pelos mecanismos de infecção, que são identificadas como: InIC2, InID, InIE, InIF, InIG e InIH. Porém, estas proteínas estariam envolvidas na colonização dos tecidos e ainda podem não estar relacionadas com a virulência (VASQUEZ - BOLAND et al., 2001).

2.2.5.2 Listeriolisina O

Esta proteína é responsável pelo rompimento do vacúolo primário para liberar a bactéria no citosol e dar continuidade ao processo. Permite, ainda, a multiplicação intracelular e a sobrevivência de *L. monocytogenes* dentro dos macrófagos e das células não fagocitárias, bem como, induz a resposta imune do hospedeiro. A ação desta proteína pode ser visualizada ao redor de colônias crescidas em ágar sangue, que é uma das provas bioquímicas para se determinar a atividade hemolítica da bactéria, sendo determinante na virulência das cepas de *L. monocytogenes* (COSSART, 2007; VASQUEZ - BOLAND et al., 2001).

A Listeriolisina O (LLO) é codificada por 539 aminoácidos, e possui uma região terminal-N e uma região terminal-C. Tem como função formar uma região de poro, fundamental para a lise do vacúolo; e é ativa somente em membranas que contêm o receptor colesterol (KUNH; GOEBEL, 1999). Trabalhos sugerem que esse receptor de colesterol promove a interação entre a toxina e a membrana (VASQUEZ - BOLAND et al., 2001).

Sua atividade é expressa a pH de 5,5 extremamente importante para o rompimento do vacúolo. Porém, na ausência de LLO, alguns trabalhos indicam que a PI-PLC é capaz de mediar nas células epiteliais de mamíferos e em células não fagocitárias, o escape do vacúolo primário (MARQUIS et al., 1995; GOLDFINE; WADSWORTH, 2002).

2.2.5.3 Proteína ActA

Esta proteína é responsável pelo principal fator de virulência de *L. monocytogenes*, sendo capaz de induzir a agregação da actina. Dessa forma, esta distribuição da proteína na superfície é o que pré-determina onde vai ser realizada a agregação e a direção do movimento bacteriano. Essa polimerização de actina tem uma relação direta com a movimentação bacteriana, que torna o seu desenvolvimento e propagação muito rápida de uma célula para outra (COSSART; KOCKS, 1994).

Existem ainda outros fatores envolvidos na polimerização da actina como a VASP (Vasodilatador-stimulated phosphoprotein), a Arp2 e Arp3. O Fator VASP possui ligação direta com a ActA na região de PRR; uma vez que a Profilina se liga na VASP e regula a montagem dos filamentos de actina, responsável pelo movimento. A Arp2 e Arp3 estão ligadas na ActA pelo domínio terminal-N e promovem a montagem da actina (COSSART, 1997).

2.2.5.4 Fosfolipases e outros

As fosfolipases são importantes quando a dupla membrana do vacúolo for rompida para a continuação do ciclo de infecção. As fosfolipases do tipo C através da clivação de grupos polares dos fosfolipídios na ponte glicerol fosfato produzem diacilglicerol e um éster de fosfato. O produto do *plcA*, PI-PLC, cliva fosfatidilinositol, resultando em monofosfato inositol- 1,2-cíclico. A PC-PLC formada hidrolisa completamente os lipídeos das células de mamíferos. Na etapa onde a bactéria fica confinada no vacúolo, a listeriolisina provocará a formação de poros e lesões na membrana, facilitando o acesso das fosfolipases que irão lisar e dissolver a barreira que delimita o compartimento fagossomal (GOLDFINE et al., 1995).

A PC-PLC vai ser eficiente para lisar o vacúolo secundário, após a propagação da bactéria. Muitos trabalhos indicam que esse fator é essencial e atua junto com a PI - PLC e Mpl para atingir a LLO em um nível que o escape a partir dos vacúolos primário e secundário seja eficiente (VASQUEZ - BOLAND et al., 2001).

2.3 Alimentos envolvidos em surtos de Listeriose

Nos últimos vinte anos foram descritos vários surtos de listeriose associados ao consumo de diversos alimentos como saladas, patês, queijos, leite pasteurizado, camarões e manteiga. No entanto, os produtos que representam um maior risco são aqueles cujo processo de fabricação não

inclui qualquer etapa de redução/eliminação de *L. monocytogenes* e cujas matérias-primas apresentam elevada incidência/concentrações da bactéria. Fatores de risco adicionais são capacidade de crescimento da bactéria no produto e a ausência de processamento do mesmo antes de consumido. Nesta categoria de produtos incluem-se o leite cru, os laticínios produzidos com leite cru, peixe defumado e alguns embutidos (McLAUCHLIN et al., 2004).

Alguns estudos que avaliaram a fonte de contaminação de vários alimentos com *L. monocytogenes* sugerem que a contaminação pós-processamento na indústria de alimentos é extremamente importante. Neste contexto, é de realçar a capacidade de formação de biofilmes por *L. monocytogenes* nos ambientes de processamento, em superfícies e nos equipamentos, o que dificulta a sua eliminação durante os processos de limpeza e de desinfecção. Os alimentos associados com a transmissão da doença são vários. Porém a contaminação através de produtos lácteos é a que tem mais chamado atenção, uma vez que inúmeros surtos de listeriose estão associados a este tipo de produto (KABUKI, 2004) e também relacionados com a matéria-prima, o leite cru (STEELE et al., 1997).

Vários casos foram relatados envolvendo diferentes tipos de alimentos, nos Estados Unidos em 1983 envolvendo 49 indivíduos, com índice de mortalidade de 29%, tendo como veículo o leite pasteurizado. Ainda nos EUA em 1985 o alimento relatado foi queijo fresco tipo mexicano. Outro surto, também com queijo fresco ocorreu na Suíça, entre 1983 e 1987, com 122 casos e 31 mortes (FRANCO ; LANDGRAF, 2005).

As evidências mais comuns para a primária fonte de transmissão de *L. monocytogenes* a partir de seu reservatório ambiental para humanos é a ingestão de alimentos contaminados. Estudos de surtos de listeriose na Califórnia e Pensilvânia indicaram vários produtos lácteos (SCHLECH, 1988).

Durante a década de 1980 muitos surtos ocorreram na França, Estados Unidos e Canadá, porém a *Listeria monocytogenes* despertou interesse dos microbiologistas a partir de seu isolamento de repolho cru, que desencadeou um surto no Canadá em 1981. O repolho foi incriminado como o veículo de transmissão da bactéria, e a hortalica era cultivada em campos fertilizados com fezes de ovinos, que haviam sido portadores de listeriose (LOGUERCIO et al., 2001).

Vários produtos podem ser considerados como potenciais causadores de surtos de listeriose. No entanto, a maioria dos surtos documentados resulta de falhas em algum sistema de

controle. A implantação de sistemas de autocontrole, como o Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) ao longo de toda a cadeia é uma estratégia importante de prevenção (McLAUCHLIN et. al., 2004).

2.4 Métodos de isolamento e tipagem molecular de *L. monocytogenes*

Atualmente, em leite, o método convencional do Food and Drug Administration (FDA) está entre os mais difundidos e utilizados na detecção de *L. monocytogenes* (HITCHINS, 2003). Os métodos de detecção de *L. monocytogenes* em alimentos envolvem etapas de enriquecimento, semeadura em meios sólidos seletivos e isolamento para posterior identificação. Os meios de cultivo podem variar, dependendo do alimento e da metodologia utilizada. Os ágaros seletivos Oxford e o Palcam, recomendados pelos métodos oficiais, se baseiam na hidrólise da esculina para diferenciar *Listeria* spp de outros microrganismos, porém, nesses meios, não é possível diferenciar a *L. monocytogenes* das demais espécies de *Listeria*.

Ágaros seletivos que permitem a diferenciação da *L. monocytogenes* das outras espécies vêm sendo empregados no isolamento e na enumeração da bactéria. O uso desses meios, em paralelo com os convencionais, é recomendado em protocolos oficiais como o do FDA, pois permitem diferenciar colônias de *L. monocytogenes*/*L. ivanovii* daquelas de outras espécies de *Listeria*, quando presentes, tornando o isolamento e a identificação mais rápida. Dentre esses meios, está o Agar Listeria –ALOA- (GREENWOOD et al. 2005). No ALOA (AES Chemunex) as colônias de *Listeria* spp apresentam bordas regulares e cor azul esverdeada, devido à produção de β -glucosidase, evidenciada pela hidrólise de um substrato cromogênico específico. O meio também contém um substrato para a fosfolipase, presente somente nas espécies de *L. monocytogenes* e em algumas cepas de *L. ivanovii*, que proporciona o aparecimento de um halo opaco ao redor da colônia. Greenwood et al., (2005) não observaram diferença significativa na recuperação de *L. monocytogenes* de alimentos, utilizando os ágaros cromogênicos ALOA e Rapid L. mono e o convencional Oxford. Os autores destacaram a vantagem dos cromogênicos possibilitarem a identificação presuntiva de *L. monocytogenes* em 24h.

Para a identificação de *L. monocytogenes*, testes bioquímicos comerciais (kits) são empregados como alternativa aos testes convencionais. O API Listeria (bio Mérieux) é um desses “kits” e possui aprovação pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC).

Em investigações epidemiológicas são necessárias técnicas capazes de diferenciar cepas (GASANOV et al., 2005). Nos anos recentes houve um interesse considerável na subtipagem de *L. monocytogenes*, com o objetivo de aumentar a compreensão da sua ecologia, epidemiologia e patogenicidade (HARVEY;GILMOUR, 1996). Os métodos de subtipagem incluem métodos fenotípicos e métodos genotípicos (FARBER, 1996; GRAVES et al., 1999).

A sorotipagem é frequentemente o primeiro passo para tipificar cepas de *Listeria* e permite uma triagem rápida das cepas. Embora a sorotipagem tenha limitações em estudos epidemiológicos (LUKINMAA et al., 2004; TOMPKIN, 2002) ela permite verificar prevalências de sorotipos e rastrear contaminações (WIEDMANN, 2002).

Para subtipagem de *L. monocytogenes*, Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é uma das técnicas de melhor reprodutibilidade (BROSH et al., 1994). A PFGE caracteriza a bactéria em subtipos pela geração de perfil de bandas de DNA após digestão do DNA bacteriano por enzimas de restrição. As vantagens do método são a alta reprodutibilidade, poder discriminatório e fácil interpretação dos resultados devido à produção de 10 a 15 bandas facilmente visíveis (FARBER, 1996). É um instrumento útil para a identificação da similaridade genética entre isolados bacterianos, e para a identificação de fontes de contaminação (BRITO et al., 2007).

Na detecção de *Listeria monocytogenes* em leite cru, pesquisadores geralmente utilizam a técnica de PCR (KONGO et al., 2006; KWANG-SOO et al., 2002). São poucos os trabalhos sobre ocorrência de *L. monocytogenes* em leite cru que utilizam a técnica de PFGE (HAMDI et al., 2007; MURAOKA et al., 2003). Estes autores sugeriram uma distribuição geográfica ampla das cepas isoladas de leite cru, as quais podem ser usados em pesquisas epidemiológicas.

2.5 Ocorrência de *L. monocytogenes* em leite cru

Os alimentos que representam um maior risco de transmitir listeriose são aqueles prontos para o consumo e que apresentam vida de prateleira longa em temperatura de refrigeração, permitindo o crescimento e multiplicação do agente (ROCOURT et al., 2000).

Esse microrganismo tem sido observado em inúmeros estudos nos últimos anos e esses trabalhos tentam rastrear a fonte primária de contaminação. De acordo com Fenlon et al., (1996), a *Listeria monocytogenes* estaria sendo veiculada primariamente através da matéria-prima, podendo ser ela animal ou vegetal, sendo introduzida no ambiente industrial, adaptando-se e

proliferando-se durante o processamento.

A contaminação do leite cru por *Listeria monocytogenes* pode ocorrer por diversas maneiras. No laticínio o leite não pasteurizado pode ser uma fonte de contaminação para o ambiente. Pode ocorrer contaminação nas áreas de manuseio, equipamentos como tanques, escovas, latões e mangueiras, bem como fezes dos animais e silagem contaminada e de má qualidade (HUSU, 1990).

Os queijos frescos são particularmente suscetíveis à contaminação por *L. monocytogenes*, e isso ocorre com maior frequência, quando são feitos com leite cru ou devido à contaminação após a pasteurização (BRITO et al., 2007).

A presença de *Listeria monocytogenes* em produtos lácteos ocorre principalmente devida à contaminação indireta a partir de leite cru. Essa incidência é preocupante, pois existe o hábito de consumi-lo ou utilizá-lo na produção de derivados do leite (MACKEY; BRATCHELL, 1989).

Estudos como os realizados por Fenlon 1986 e Skovgaard e Morgen, 1988 confirmaram a relação da qualidade da silagem e a presença de *Listeria monocytogenes* nas fezes, e a associação desse microrganismo com o desenvolvimento de mastite em bovinas.

A ocorrência de *L. monocytogenes* depende do local, do número de amostras e da metodologia utilizada para a sua identificação. Sua prevalência depende do local de coleta na cadeia de produção e distribuição do leite cru. Dados na Suécia indicaram que *L. monocytogenes* foi isolada em apenas 1% de 294 amostras de leite cru de tanques de fazendas e em 19,6% dos silos da indústria, com predomínio no inverno. Já em um estudo realizado na Espanha por Dominguez-Rodriguez et al., (1985) foram encontradas 45,3% de amostras positivas de leite cru, de 95 coletadas. Uma menor ocorrência (6,8%), também em leite cru, foi relatada por Vitas et al., (2004), em 340 amostras de tanques refrigerados de fazendas. Em leite cru coletado de tanques de fazendas, nos EUA, foram relatadas prevalências de 5,9% (n=948) e 6,5% (n=861).

No Brasil, Destro et al., (1993) em São Paulo utilizando um total de 220 amostras de leite cru, observaram 28 (17%) positivas, sendo identificadas as espécies *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *L. welshimeri* e *L. grayi*.

Na França, Meyer-Broseta et al., (2003) encontraram prevalência baixa de *L. monocytogenes* e ocorrência esporádica (predomínio no inverno), em leite cru coletado de fazendas, durante quatro anos, e apontaram necessidade de pesquisas sobre os fatores de risco de contaminação. Em certas pesquisas, como a de Massa et al., (1990) não houve detecção em leite

cru, o que pode ser explicado pelo baixo número de amostras (40).

Destro et al., 1991 (N=20); Cassarotti et al., 1994 (N=20); Rocha (2005) (N= 6); Nero, 2005 (N=240) e Arcuri et al., 2006 (N=42). Em contraste, Moura et al. (1993) isolaram *L. monocytogenes* de 9,5% das amostras analisadas (N=220) no Estado de São Paulo. No Nordeste, Figueiredo(2000) isolou *L. monocytogenes* em 15% (N=60), Catão; Cebalos (2001) em 37,8% (N=45) e Silva et al., 2003 em 16,7% (N=6) das amostras de leite cru coletadas de indústrias de processamento de leite. Diferenças na ocorrência podem ser explicadas pela distribuição geográfica do gênero *Listeria* (VAN KESSEL et al., 2004). Além disso, a detecção de *L. monocytogenes* em leite cru pode ser difícil devido às baixas contagens da bactéria e à competição da microbiota bacteriana (MEYER-BROSETA) (2003).

Segundo Marshall, (1995) pode haver contaminação cruzada de *L. monocytogenes* e o leite cru, visto que manipuladores com educação sanitária deficiente poderiam estar contaminando o produto, pois circulam por todo o ambiente da indústria. Isso mostra que a situação ideal seria prevenir a entrada deste patógeno no ambiente da indústria de alimentos, e ressaltar-se a importância de se investir em estudos de identificação desses fatores de risco, fazendo-se o controle da matéria-prima, higienização cuidadosa das plataformas de recepção do leite, sanitização correta dos equipamentos, bem como a garantir a saúde dos manipuladores e funcionários das indústrias. Esse conjunto de medidas é extremamente importante para diminuir ou erradicar as chances de contaminação.

3 OBJETIVOS

1. Avaliar a ocorrência de *Listeria monocytogenes* no leite cru e ambiente de ordenha das regiões A, B e C estudadas.
2. Avaliar as 75 propriedades fornecedoras de leite de acordo com os parâmetros higiênico-sanitários, por meio da aplicação de questionário sobre pontos de avaliação determinados na ordenha, manipuladores, equipamentos, utensílios e armazenamento do leite.
3. Realizar contagem de coliformes totais e *E. coli* em leite cru.
4. Caracterizar os isolados por sorotipagem.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de Estudo

A pesquisa foi conduzida em 3 regiões do Estado de São Paulo, localizadas nos municípios de Brotas, Pirassununga-SP e Piracicaba - SP, incluindo as respectivas propriedades fornecedoras de leite para os laticínios, denominados A, B e C. Todos os laticínios recebem leite refrigerado e possuem registro no Serviço de Inspeção Federal (SIF). Foram colhidas amostras de leite cru de 30% das propriedades fornecedoras de leite para os laticínios, assegurando um número mínimo de 20 propriedades. Assim, foram analisadas amostras de leite cru de 25 propriedades de cada região, fornecedoras para os laticínios A, B e C.

4.2 Amostragem

4.2.1 Período de coleta de amostras

Durante um período de 12 meses, foram realizadas 4 visitas em cada região das indústrias e suas propriedades fornecedoras de leite. As visitas foram intercaladas de forma que, a cada 3 meses todas, as propriedades e regiões fossem amostradas, conforme o plano de amostragem esquematizado na Tabela 1, o qual inclui também um resumo dos números de amostras que foram colhidas durante o estudo. Foram analisadas 286 amostras de leite cru.

Os meses referentes à coleta das amostras nas regiões A, B e C são apresentados na Tabela 1. Destaca-se que em determinadas coletas, não foi possível coletar o número de 25 amostras, devido ao fato de naquele mês as fazendas atribuídas não estarem fornecendo o leite no momento da coleta ou, muitas vezes por algum defeito no tanque de refrigeração.

Tabela 1 – Amostras de leite coletadas das regiões estudadas no período de 2008- 2009

Meses de coleta	Fazendas/Regiões			
	A	B	C	Total
Outubro	25			25
Novembro		25		25
Dezembro			25	25
Janeiro	25			25
Fevereiro		23		23
Março			22	22
Abril	25			25
Maio		25		25
Junho			23	23
Julho	24			24
Agosto		22		22
Setembro			22	22
Totais Fazendas	99	95	92	286

4.2.2 Coleta de amostras e dados dos questionários

As amostras de leite cru (500 mL) foram coletadas diretamente dos tanques, após homogeneização do leite, com auxílio de concha esterilizada, em frascos esterilizados. Todas as amostras foram coletadas diretamente do tanque de refrigeração ou latão de imersão de cada propriedade leiteira. A homogeneização do leite no tanque foi feita acionando-se o agitador por cinco minutos. Nos latões de imersão a agitação foi manual com a própria concha esterilizada, antes da coleta do leite. Após a homogeneização, o leite foi transferido para o frasco esterilizado, com o auxílio da concha esterilizada e devidamente identificado com o número correspondente de cada produtor. As amostras foram transportadas em caixas de isopor com gelo até o Laboratório de Higiene e Laticínios da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ).

Os fatores selecionados como de risco para a contaminação por *L. monocytogenes* em leite cru, foram avaliados previamente com auxílio de um questionário (Anexo A), baseado nos regulamentos vigentes (BRASIL, 1997; BRASIL 2002) e Spexoto (2003). O questionário

continha questões a respeito da produção do leite principalmente sobre procedimentos adotados na ordenha tais como: utilização de cloro ou iodo antes da ordenha (pré-dipping) e depois da ordenha (pós-dipping), condições higiênico-sanitárias das instalações e equipamentos do ambiente de ordenha. Foram avaliados 40 itens a partir do questionário que foi aplicado em cada propriedade leiteira visitada. Na análise dos dados os itens foram classificados de acordo com o atendimento em: Grupo 1: 76 a 100% de atendimento dos itens- condições de ordenha satisfatória; Grupo 2: 51 a 75% de atendimento dos itens- condições de ordenha regular; Grupo 3: 0 a 50% de atendimento dos itens- condições insatisfatórias de ordenha.

Nos meses de janeiro e março de 2009 foram aplicados os questionários da região A e B, respectivamente. Os questionários da região C foram aplicados após o término das análises laboratoriais, em novembro de 2009.

Durante todas as coletas de amostras a temperatura foi aferida com termômetro e observou-se o tempo em que o leite permanecia na propriedade até ser transportado para os laticínios. Também foi verificada a administração de silagem para o rebanho.

Nos primeiros meses de coleta para a análise laboratorial foram utilizadas alíquotas de 25 mL, o que a partir do terceiro mês foi substituído por uma alíquota maior de 50 mL. Essa modificação foi realizada devido à dificuldade do isolamento de *L. monocytogenes* no leite fornecido pelas propriedades.

A partir do mês de abril durante a 7ª coleta foi introduzida a amostragem em 3 tanques de refrigeração de 3 fazendas de cada região em estudo, sendo realizada pela técnica de Moore modificada (LACEN, 2000), que baseia-se na utilização de uma mecha de gaze estéril introduzida em uma rede de nylon, amarrada por um barbante. As mechas foram introduzidas no leite contido nos tanques de refrigeração, onde permaneceram por um período de 18 horas. Após a retirada da mecha, esta foi acondicionada em bolsas estéreis e transportada, em caixas térmicas, até o Laboratório de Higiene e Laticínios/ESALQ/USP, para análise, no mesmo dia da coleta. Além disso, de 3 fazendas incluídas no estudo, foram coletadas amostras do ambiente de produção de leite (ordenha) e animais em lactação para pesquisa de *L. monocytogenes*. Foram analisadas 6 mechas para a região A, sendo os produtores números 7,18 e 47. Na região B foram analisadas 4 mechas nos produtores de número 500 e 600, e na região C foram analisadas 4 mechas, sendo os produtores 116 e 31.

Também foi realizada na 3ª coleta da região B no mês de junho de 2009, uma análise em paralelo pela Metodologia de Enriquecimento a frio (FARBER; PETERKIN, 1991) de 25 propriedades leiteiras da Região B, a fim de aumentar as chances de isolamento e tentar inserir outra metodologia, visto a dificuldade no isolamento de *L. monocytogenes*.

Nas Figuras 2 e 3 estão apresentadas: a coleta do leite em tanque de expansão e latão por imersão.

Figura 2- Coleta em tanque

Figura 3- Coleta em latão por imersão

4.2.3 Amostras do ambiente de ordenha

De 3 fazendas incluídas no estudo, sendo uma fazenda fornecedora para cada laticínio, foram coletadas amostras do ambiente de produção de leite (ordenha) e de animais em lactação pela técnica de Swab (HITCHINS, 2003). Foram coletadas amostras do ambiente de ordenha dentre elas: ralos (N=6), chão da sala de ordenha (N=3), teteiras (N=10), pisos (N=5), superfície de tetos e úberes de vacas em lactação (N=18), silagem (N=2) e superfície de tanque de armazenamento de leite (N=1). Para as amostras ambientais foram utilizadas esponjas (Inlab) umedecidas em solução salina (0,85%) com peptona (0,1%), adicionada de neutralizantes de sanitizantes: 0,01% de tiosulfato de sódio (SILVA et al., 2005); 0,5% de polisorbato (Tween 80) e 0,07% de lecitina de soja (EVANCHO et al., 2002). Após a coleta, as esponjas foram colocadas em bolsas com 60 mL de Caldo de Enriquecimento para *Listeria* Tamponado (BLEB)

(Difco). As amostras foram transportadas em caixas de isopor com gelo até o Laboratório de Higiene e Laticínios da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), onde foram analisadas.

A silagem foi coletada em frasco estéril com o auxílio de uma luva esterilizada. Somente 2 amostras de silagem foram coletadas dos produtores, sendo uma do silo de um produtor da região B e outra de um silo da região C.

As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas e transportadas até o Laboratório de Higiene e Laticínios/ESALQ/USP, onde foram analisadas no mesmo dia.

Foram analisados 45 pontos do ambiente de ordenha entre eles: pisos, ralos, teteiras, superfície do tanque, animais em lactação e piso da sala de ordenha. Também foram analisadas mais 4 amostras de silagem fornecidas pela Departamento de Zootecnia (ESALQ-USP), totalizando 49 amostras ambientais.

A quantidade de amostras ambientais coletadas e meses referentes estão demonstrados no plano de amostragem na Tabela 2.

Tabela 2 – Amostras ambientais das 3 regiões estudadas

Meses de coleta (2009)	Fazenda			Total
	A	B	C	
Abril	7			7
Maio		7		7
Junho			8	8
Julho	8			8
Agosto		6		6
Setembro			9	9
Totais Fazendas	15	13	17	45

Nas Figuras 4, 5 e 6 abaixo estão apresentadas amostras ambientais.

Figura 4 - Ambiente de Ordenha

Figura 5 - Silagem

Figura 6 - Teto

4.3 METODOLOGIA

4.3.1 Procedimentos Laboratoriais

As amostras de leite cru, mechas de Moore e ambientais foram analisadas pelo método preconizado pelo FDA descrito no Bacteriological Analytical Manual (BAM) (HITCHINS, 2003) e incluído o meio ALOA (AESChemunex), como pode ser observado em anexo no protocolo de isolamento.

4.3.2 Isolamento de *L. monocytogenes* em leite cru e ambiente de ordenha

Após homogeneização, 50 mL de leite foram inoculados em 450 mL de BLEB. As mechas de Moore foram colocadas em 225 mL de BLEB. Esponjas e mechas foram homogeneizadas em Stomacher antes da incubação. As amostras foram incubadas a 30°C/48h. Após 4 horas do início da incubação foram adicionados: acriflavina (10 mg/L); ácido nalidíxico (40 mg/L) e cicloheximida (50 mg/L). No término da incubação, foi feito estriamento nos ágar OXFORD (Oxoid) e Agar *Listeria* segundo Ottaviani e Agosti (ALOA - AES Chemunex) que foram incubados a 35°C/24-48h e 37°C/24-48h, respectivamente. De cada meio, 3 colônias características foram purificadas em Ágar Soja Trypticase (TSA) (Oxoid) com 0,6% de Extrato de Levedura.

4.3.3 Isolamento de *L. monocytogenes* pelo método de enriquecimento a frio

O Enriquecimento foi feito com 25 mL de leite cru em caldo (TSB+YE) e a temperatura de incubação foi de 4°C durante o período de 30 dias (FARBER; PETERKIN, 1991). Após a incubação as 25 amostras foram estriadas em meio Oxford (35°C/48horas). Após a incubação foi verificada a presença de colônias típicas de *L. monocytogenes*: colônias esféricas, pretas, rodeadas por um halo preto da hidrólise da esculina (meio OXFORD).

4.3.4 Confirmação das colônias típicas

As colônias características foram submetidas à coloração de Gram, teste de catalase e motilidade característica em “guarda-chuva”, pela inoculação em picada no meio Agar Sulfeto Indol Motilidade (SIM) incubado a 25°C por até 7dias. As colônias confirmadas foram repicadas em placas de Ágar Trypticase de Soja com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE) e incubadas a 35°C /24-48h.

4.3.5 Confirmação bioquímica

As colônias que se apresentaram bastonetes Gram positivos, catalase positivos e motilidade característica a 25°C, foram analisadas pelo sistema de identificação API *Listeria* (BioMérieux), conforme o procedimento recomendado pelo fabricante e Camp test. O ensaio de Camp test foi realizado em placas preparadas com Ágar base adicionado de 8% de sangue de

carneiro desfibrinado, conforme Donnelly et al.(1992). Uma cultura hemolítica de *S. aureus* e outra de *Rodococcus equi* foram inoculadas, separadamente, em uma única estria, uma paralela a outra. No espaço entre as estrias, a cultura suspeita foi inoculada, perpendicular as duas estrias previamente inoculadas, porém sem tocá-las. A placa foi incubada a 35°C / 24-48h e observada se ocorria à presença de halo transparente de hemólise ao redor das estrias inoculadas.

4.3.6 Enumeração de coliformes totais e *Escherichia coli*

Foi utilizado o sistema Simplate®CEc, conforme as instruções do fabricante. O substrato para cultivo de coliformes totais e *E. coli* foi hidratado em 100 mL de água destilada estéril. No centro de cada placa de Simplate, foram pipetados 1 mL das diluições 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-5} . Em seguida foram adicionados 9 mL do substrato hidratado, obtendo-se, assim, um volume de 10 mL. As placas foram agitadas em movimentos circulares até que todas as cavidades fôssem preenchidas pela mistura. O excesso foi vertido e descartado. As placas foram incubadas a 32°C por um período de 24h. A leitura dos resultados foi feita em câmara de luz ultravioleta (UV), 365 nm de comprimento de onda. Conforme recomendação do fabricante as cavidades que apresentaram cor púrpura, a olho nu, foram consideradas positivas para coliformes totais e aquelas que fluoresceram sob UV, foram positivas para *E. coli*. O número mais provável (NMP) foi determinado pela tabela apropriada.

4.3.7 Sorotipagem

A tipificação antigênica das cepas identificadas como *Listeria innocua* foi feita de acordo com Seelinger e Hohne (1979), no Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro.

4.3.8 Delineamento experimental e análise estatística

A comparação da análise dos itens de verificação selecionados: lavagem dos tetos, secagem dos tetos, realização de pré-dipping, pós-dipping, calçamento na sala de ordenha, ordenha mecânica, manual, sistema de refrigeração por tanque ou latão de imersão em relação às contagens de coliformes totais foi feito pelo teste de comparações múltiplas de médias (Teste de Tukey), ajustado para o nível de significância ($P < 0,05$). Da mesma maneira as contagens de

coliformes totais e *E. coli* entre as 4 coletas foi feita também pelo teste de comparações múltiplas de médias (Teste de Tukey), ajustado para o nível de significância ($P < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das propriedades leiteiras das regiões A, B e C.

Levando em conta que a qualidade do leite é influenciada, dentre outros fatores pela qualidade do manejo na ordenha, a partir da aplicação de um questionário para o levantamento de dados referentes à produção de leite para as propriedades A, B e C, foi possível caracterizar o tipo de propriedade, avaliando suas práticas de manejo, instalações, processos de higienização e temperatura de resfriamento do leite.

Muitos fatores contribuem para a má qualidade microbiológica do leite, e destacam – se entre eles: a precariedade no controle sanitário do rebanho leiteiro, falta de higiene na obtenção do leite como matéria - prima, ausência de infra - estrutura quanto às instalações do ambiente de ordenha, transporte inadequado e falha no sistema de refrigeração.

Foram avaliadas 75 fazendas, correspondendo a 25 propriedades leiteiras por região. Os dados obtidos foram comparados com as análises laboratoriais o que confere um maior entendimento para os achados microbiológicos, e uma relação da produção com alta contagem de coliformes.

Não houve correlação entre *L. monocytogenes* e os dados obtidos durante as avaliações das propriedades, pois não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas das 3 regiões de propriedades leiteiras a presença deste microrganismo.

Na Tabela 3 e 4 estão apresentadas resumidamente as características peculiares de cada região das fazendas visitadas.

Nas Figuras 7a e 7b e 8a, 8b, 9a e 9b, estão apresentadas algumas fotos sobre as diferentes características encontradas nas regiões estudadas.

Tabela 3 – Características das propriedades fornecedoras de leite das regiões A, B e C

Características	Região		
	A	B	C
	Fazendas N (%)	Fazendas N(%)	Fazendas N(%)
Produção diária de leite			
Até 100 L	11(44,0)	1 (4,00)	10 (40,0)
>100-500L	11(44,0)	18 (72,0)	14 (56,0)
>500-1000L	0 (0,00)	4 (16,0)	1 (4,00)
>1000-3000L	2 (8,00)	2 (8,00)	0 (0,00)
>3000-5000L	1 (4,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
Tipo de ordenha			
Mecânica - canalizada	1 (4,00)	5 (20,0)	0 (0,00)
Mecânica - balde ao pé	12 (48,0)	12 (48,0)	15 (60,0)
Manual	12 (48,0)	8 (32,0)	10 (40,0)
Sistema de refrigeração do leite			
Tanque de refrigeração	11 (44,0)	22 (88,0)	22 (88,0)
Latão em imersão em água	14 (56,0)	3 (12,0)	3 (12,0)

Tabela 4 – Condições de ordenha das regiões A, B e C

Condições de ordenha	Região					
	A		B		C	
	(N=25)		(N=25)		(N=25)	
	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
Utiliza uniforme apropriado	2 (8,00)	23(92,0)	4 (16,0)	21(84,0)	1(4,00)	24(96,0)
Faz lavagem dos tetos	25(100,0)	0 (0,00)	24(96,0)	1(4,00)	23(92,0)	2 (8,00)
Utiliza pré-dipping	7 (26,0)	18(72,0)	12(48,0)	13(52,0)	14(56,0)	11(44,0)
Faz secagem dos tetos	24 (96,0)	1 (4,00)	20(80,0)	5(20,0)	22(88,0)	3(12,0)
Papel toalha (secagem adequada	4 (16,0)	21(84,0)	9(36,0)	16(64,0)	9(36,0)	16(64,0)
Utiliza pós-dipping	5 (20,0)	20(80,0)	9 (36,0)	16(64,0)	16(64,0)	9(36,0)
Utiliza luvas na ordenha	3 (12,0)	22(88,0)	3(12,0)	22(88,0)	0(0,00)	25(100,0)
Calçamento do curral de espera	15 (60,0)	10(40,0)	13(52,0)	12(48,0)	21(84,0)	4 (16,0)
Curral de espera						
adequadamente limpo	5 (20,0)	20(80,0)	4(16,0)	21(84,0)	1(4,00)	24(96,0)
Presença de moscas no curral de						
espera	21 (84,0)	4 (16,0)	22(88,0)	3(12,0)	24(96,0)	1(4,00)
Sala de ordenha calçada	17 (68,0)	8 (32,0)	17(68,0)	8(32,0)	23(92,0)	2(8,00)
Sala de espera adequadamente						
limpa	5 (20,0)	20(80,0)	4(16,0)	21(84,0)	1(4,00)	24(96,0)
Água quente para lavagem						
equipamentos utensílios	7 (26,0)	18(72,0)	6(24,0)	19(76,0)	3(12,0)	22(88,0)
Sanitizante para enxágüe						
equipamentos/utensílios	7 (26,0)	18(72,0)	5(20,0)	20(20,0)	13(52,0)	12(48,0)

(7a) Tanque de refrigeração

(7b) Latão em imersão

(8a) Ordenha Mecânica

(8b) Ordenha Balde ao pé

(9a) Ordenha Manual e sem calçamento

(9b) Sala de ordenha calçada

De acordo com os dados apresentados na Tabela 3 nas propriedades leiteiras das 3 regiões A, B e C houve predomínio de pequenos produtores, com 86,6% (N=65) produzindo volume de leite de até 500L/dia. Essa característica de produção em pequena escala pode ser encontrada em outras regiões do Brasil, conforme demonstraram Nero et al., (2005) avaliando propriedades leiteiras das regiões de Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul encontrando predomínio de pequenos e médios produtores. Monteiro et al., (2007), avaliando 41 propriedades leiteiras no Estado de Pernambuco encontraram também predomínio de pequenos produtores com 48,8% produzindo de 50 a 200L/dia.

O predomínio de pequenas e médias propriedades é uma característica marcante da pecuária leiteira no Brasil com características de agricultura familiar, sendo esta a fonte de renda. Porém, a precariedade de informações a respeito da produção do leite com qualidade, a falta de assistência e baixo investimento geram pouca produtividade e baixa qualidade. Pode-se observar nas diversas regiões do Brasil que produtores com maior produtividade produzem leite com maior qualidade. As diferenças de qualidade são atribuídas às condições de produção em cada região, perfil do produtor, assistência técnica, controle sanitário dos rebanhos, e principalmente, políticas de pagamento por qualidade nos laticínios (TKAEZ et al., 2004).

Em relação ao tipo de ordenha das propriedades 92% (N=69) realizavam ordenha manual e com condições de higiene precárias como pode ser observado na Tabelas 4. Apesar de algumas propriedades realizarem ordenha mecânica, o que se observou nas regiões estudadas é que os produtores não investem em melhorias para o sistema de produção leiteira e que desconhecem os aspectos higiênicos que contribuem para um leite de qualidade.

Quanto ao sistema de refrigeração, no presente trabalho 73, 3% (N=55) possuíam tanque de expansão para a refrigeração do leite produzido. Monteiro et al., (2007), avaliando 41 propriedades leiteiras do estado de Pernambuco encontraram 87,8% de ordenha manual, dados semelhantes aos encontrados no presente trabalho, porém quanto ao sistema de armazenamento do leite recém-ordenhado apenas 24,4% (N=10) utilizavam tanque de expansão, mas comunitário, sendo que o restante 75,6% (N=31) não utilizavam nenhuma forma térmica de armazenamento para o leite, entregando o mesmo em temperatura ambiente para os laticínios.

Silva et al., (2008) estudando 6 propriedades leiteiras na região de Minas encontraram 100% de ordenha manual. No estado de São Paulo em Paranapanema, Furlaneto et al., (2008) analisando 41 propriedades encontraram 77% com predomínio de ordenha manual, dados de

pesquisas que concordam com os apresentados no presente trabalho. Moraes et al., (2005) analisando a qualidade microbiológica de 41 propriedades do Rio Grande do Sul verificaram que 50% (N=21) das propriedades realizavam ordenha manual e 50% realizavam ordenha mecânica.

Quanto às condições de produção observadas na aplicação dos questionários as propriedades foram enquadradas em grupos como descrito no item 4.2.2. Verificou-se que 77,3% (n=58) apresentaram condições insatisfatórias de produção de leite e higienização de equipamentos e infra-estrutura sendo enquadradas no grupo 3; 20% (n=15) encontram-se em condições regulares se enquadrando no grupo 2 e apenas 2,7% (n=2) apresentaram condições satisfatórias de produção, enquadradas no grupo 1. Estes dados revelam que a maior parte dos produtores não adotam procedimentos básicos e críticos como secagem adequada dos tetos com papel toalha, pré-dipping(lavagem do teto com cloro), pós-dipping (aplicação de iodo após a ordenha) e sanitização de equipamentos e utensílios, aumentando os riscos de contaminação do leite. As consequências dessas práticas se refletem nos resultados microbiológicos encontrados neste trabalho.

Trabalhos realizados em regiões do Brasil (ARCURI et al., 2006; MONTEIRO et al., 2007; SILVA et al., 2008; ZEGARRA et al., 2007) avaliando propriedades leiteiras quanto às condições de higiene verificaram que a maior parte das regiões analisadas encontram-se em condições insatisfatórias de produção, concordando com os dados apresentados no presente trabalho.

Condições inadequadas de higiene e produção comprometem a qualidade do leite obtido, contribuindo para a presença de sujidades, microrganismos e substâncias que podem ser incorporadas ao leite no momento do manejo. A falta de higiene principalmente dos tetos e das mãos dos ordenhadores favorece a contaminação do leite. O manejo adequado da ordenha é uma das estratégias mais importantes para garantir um leite de melhor qualidade (FONSECA; SANTOS, 2000).

Segundo Taverna (2004) a utilização de pré-dipping é o mais importante para resultados de baixa contagem de microrganismos no leite, contribuindo para melhorar a qualidade do mesmo.

A obtenção do leite proveniente de vacas sadias, práticas adequadas de manejo com higiene e armazenamento refrigerado corretos do leite produzido na fazenda são medidas

fundamentais e primárias para se garantir uma produção de maior qualidade (ARCURI et al., 2006).

Nas Tabelas 5, 6, e 7 podem ser visualizadas as características particulares de cada produtor referente a cada região estudada e a qual grupo se enquadrou na classificação em relação às condições de higiene.

Tabela 5 - Características das propriedades leiteiras avaliadas na Região de Brotas (A), São Paulo

(continua)

Propriedades leiteiras – Região A												
Itens avaliados nos questionários	5	7	9	12	18	21	29	30	32	33	34	43
Condições de Higiene (grupos)	2	2	3	3	1	3	2	3	3	3	3	3
Faz lavagem dos tetos	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Realiza pré-dipping	não	sim	não	não	sim	sim	sim	não	não	sim	não	não
Secagem adequada dos tetos com papel toalha	não	sim	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	não
Realiza pós-dipping	sim	não	não	não	sim	sim	sim	não	não	não	não	não
Sanitizante para enxágüe equipamentos/utensílios	sim	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	não
Sistema de resfriamento do leite	T	T	L	L	T	L	T	L	L	T	L	L

*Grupo 1: condições satisfatórias de ordenha; Grupo 2: condições regulares de ordenha; Grupo 3: condições insatisfatórias de ordenha;

T= tanque; L= latão

Tabela 5 - Características das propriedades leiteiras avaliadas na Região de Brotas (A), São Paulo

(conclusão)

Propriedades leiteiras – Região A													
Itens avaliados nos questionários	47	51	70	79	80	113	116	121	125	131	133	134	157
Condições de higiene (grupos)	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3
Faz lavagem dos tetos	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Realiza pré-dipping	não	não	não	não	sim	não	sim	não	não	não	não	não	não
Secagem adequada dos tetos com papel toalha	não	não	não	não	não	não	sim	não	sim	não	não	não	não
Realiza pós-dipping	não	não	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não
Sanitizante para enxágüe equipamentos/utensílios	não	não	sim	sim	sim	não	sim	não	não	sim	não	não	não
Sistema de resfriamento do leite	T	T	L	L	L	L	T	T	L	T	T	L	L

*Grupo 1: condições satisfatórias de ordenha; Grupo 2: condições regulares de ordenha; Grupo 3: condições insatisfatórias de ordenha;

T= tanque; L= latão

Tabela 6 - Características das propriedades leiteiras avaliadas na Região de Santa Cruz da Conceição (B)
(Pirassununga), São Paulo

(continua)

Propriedades leiteiras – Região B												
Itens avaliados nos questionários	1	53	58	59	60	63	70	74	76	151	155	156
Condições de higiene (grupos)	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Faz lavagem tetos	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Realiza pré-dipping	sim	não	não	não	não	não	sim	sim	não	sim	não	sim
Secagem adequada dos tetos com papel toalha	sim	não	não	não	não	não	não	sim	não	não	não	sim
Realiza pós-dipping	sim	não	não	não	não	não	não	sim	não	sim	não	sim
Sanitizante para enxágüe equipamentos/utensílios	sim	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não
Sistema de resfriamento do leite	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T

*Grupo 1: condições satisfatórias de ordenha; Grupo 2: condições regulares de ordenha; Grupo 3: condições insatisfatórias de ordenha;
T= tanque; L= latão

Tabela 6 - Características das propriedades leiteiras avaliadas na Região de Santa Cruz da Conceição (B) (Pirassununga), São Paulo

(conclusão)

Propriedades leiteiras – Região B													
Itens avaliados nos questionários	157	158	204	205	207	209	210	221	251	260	500	600	700
Condições de higiene (grupos)	3	3	2	2	1	3	3	3	3	3	2	2	2
Faz lavagem dos tetos	sim	sim	sim	sim	sim	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Realiza pré-dipping	não	não	sim	sim	sim	não	sim	não	não	não	sim	sim	sim
Secagem adequada dos tetos com papel toalha	não	não	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	sim	sim	sim
Realiza pós-dipping	não	não	não	sim	sim	não	não	não	não	não	sim	sim	sim
Sanitizante para enxágüe equipamentos/utensílios	não	não	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não	não	sim
Sistema de resfriamento do leite	T	L	T	T	T	L	T	L	T	T	T	T	T

*Grupo 1: condições satisfatórias de ordenha; Grupo 2: condições regulares de ordenha; Grupo 3: condições insatisfatórias de ordenha;

T= tanque; L= latão;

Tabela 7 - Características gerais das propriedades leiteiras avaliadas na Região de Piracicaba (C), São Paulo
(continua)

Propriedades leiteiras – Região C												
Itens avaliados nos questionários	02	03	05	06	07	08	09	10	11	12	17	18
Condições de higiene (grupos)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2
Faz lavagem dos tetos	sim	sim	sim	não	sim	sim	sim	não	sim	sim	sim	sim
Realiza pré-dipping	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	sim	sim	sim
Secagem adequada dos tetos com papel toalha	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não
Realiza pós-dipping	não	não	sim	não	não	sim	não	não	sim	sim	não	sim
Sanitizante para enxágüe equipamento/utensílios	não	não	não	não	sim	sim	não	não	não	sim	sim	não
Sistema de resfriamento do leite	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T

*Grupo 1: condições satisfatórias de ordenha; Grupo 2: condições regulares de ordenha; Grupo 3: condições insatisfatórias de ordenha;
T= tanque; L= latão;

Tabela 7 - Características das propriedades leiteiras avaliadas na Região de Piracicaba (C), São Paulo

(conclusão)

Propriedades leiteiras – Região C													
Itens avaliados nos questionários	20	22	23	24	26	30	31	34	34a	34b	34c	50	116
Condições de higiene (grupos)	2	3	3	3	2	3	2	3	3	3	3	2	3
Faz lavagem dos tetos	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Realiza pré-dipping	sim	sim	não	não	sim	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Secagem adequada dos tetos com papel toalha	sim	sim	não	não	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim	não	não
Realiza pós-dipping	não	sim	não	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Sanitizante para enxágue equipamento/utensílios	não	não	não	sim	sim	não	não	não	não	não	não	não	não
Sistema de resfriamento do leite	T	T	T	T	T	T	T	T	L	L	L	T	L

*Grupo 1: condições satisfatórias de ordenha; Grupo 2: condições regulares de ordenha; Grupo 3: condições insatisfatórias de ordenha;

T= tanque; L= latão;

Em relação à faixa de temperatura aferida no momento da coleta das 4 coletas realizadas na região A, a temperatura média no latão foi de 3,9°C (DP=0,32), enquanto no tanque foi de 3,4°C, (DP=0,09). Alguns produtores alcançaram temperaturas de até 6,0°C em sistemas de refrigeração por tanque, e os produtores com sistema de latão por imersão se mantiveram durante todas as coletas abaixo de 7°C.

Temperaturas elevadas foram registradas, especificamente na região B, que obteve temperaturas em escalas de 2°C a 14°C, evidenciando o descaso de alguns produtores que mesmo com tanques de refrigeração as temperaturas chegaram a 14°C, comprometendo a qualidade do leite. Estes dados condizem com os encontrados por Tebaldi et al., (2008) que registraram em uma região do Estado de Minas Gerais temperaturas de até 14°C em tanques de refrigeração. Na região C as temperaturas médias aferidas durante as 4 coletas realizadas não ultrapassaram 4,1°C, sendo que a média geral foi de 3,9°C (DP=0,17), e sem grandes oscilações de temperatura, assegurando que os sistemas de refrigeração estão sendo eficientes para essa região, mas mesmo assim não garantindo a qualidade do leite obtido.

Embora o controle de temperatura seja uma ferramenta importante na qualidade do leite, isoladamente é incapaz de garantir sua qualidade, sendo necessárias boas práticas de higiene na ordenha, o que, conforme os resultados dos questionários (Tabela 4), em regra não são cumpridas. Entretanto, caso o leite não fosse refrigerado, sem dúvida a população bacteriana no leite seria ainda maior.

Outro aspecto importante avaliado durante a aplicação dos questionários das 75 fazendas analisadas das regiões A, B e C foi o intervalo do recolhimento do leite pelo laticínio. Das 25 fazendas analisadas da região A apenas 4% (n=1) apresentou o recolhimento do leite em 24h, sendo que 80% (n=20) das propriedades tinham o leite recolhido em 48h, 8% (n=2) em 72h e 8% (n=2) em 96h.

Na região B das 25 fazendas analisadas apenas 12% (n=3) das propriedades tinham o leite recolhido em 24h, 64% (n=16) em 48h, 16% (n=4) em 72h e 8% (n=2) em 96h.

Na região C das 25 fazendas apenas 12% (n=5) tinham o leite recolhido em 24h, 48% (n=12) em 48h, e 32% (n=8) em 72h.

Dessa maneira apenas 12% (n=9) das 75 propriedades avaliadas estiveram dentro dos padrões legais da IN 51 que recomenda que o leite não permaneça por mais de 24 horas na propriedade leiteira (BRASIL, 2002).

Esses achados são preocupantes visto que mostram práticas de manejo na ordenha insatisfatórias, temperaturas abusivas de armazenamento, tempo inadequado de permanência do leite na propriedade somado a alta contagem de coliformes encontradas no presente trabalho refletindo na má qualidade do leite avaliado.

5.2 Pesquisa de *L. monocytogenes* e enumeração de Coliformes Totais e *E. coli* nas regiões A, B e C.

Os resultados descritos a seguir referem - se às análises das 4 coletas para cada região amostrada. Das 99 amostras de leite cru coletados de tanques e latões refrigerados da região A, 95 amostras da região B e 92 amostras da região C não foram isoladas *L. monocytogenes* ou mesmo *Listeria* spp. Nas Tabelas 8 e 9 estão apresentados os resultados da pesquisa de *L. monocytogenes* no leite cru de mistura das fazendas das regiões A. Nas mesmas tabelas são apresentados resultados da enumeração de coliformes totais e *E. coli* e, também, registros da temperatura do leite, no momento da coleta das amostras.

Das 6 amostragens de mechas dos produtores 7, 18 e 47 não foi detectada a presença de *Listeria* spp.

Tabela 8 – Resultados da pesquisa de *Listeria monocytogenes*, registros de temperaturas do leite no momento da coleta e enumeração de coliformes totais e *E. coli* nas amostras de leite cru de mistura de fazendas da região A (Brotas – SP) durante a 1ª e 2ª coleta.

Número dos produtores	1ª coleta (out/2008)				2ª coleta (jan/2009)			
	<i>L. monocytogenes</i>		Coliformes	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>		Coliformes	<i>E. coli</i>
	Temp. °C	50 mL	Totais NMP/mL (Log)	NMP/mL (Log)	Temp. °C	50 mL	Totais NMP/mL (Log)	NMP/mL (Log)
5	2,8	ausência	2,56	0,00	2,9	ausência	3,78	3,30
7	2,0	ausência	4,87	1,30	2,0	ausência	7,38	3,30
9	2,0	ausência	4,60	1,60	4,0	ausência	4,26	3,47
12	3,0	ausência	7,36	3,87	4,0	ausência	>7,87	7,87
18	2,0	ausência	4,48	1,41	2,0	ausência	3,60	0,00
21	4,5	ausência	4,45	1,78	4,0	ausência	2,80	0,78
29	6,0	ausência	4,76	1,34	6,0	ausência	4,26	2,68
30	5,0	ausência	5,90	0,00	3,0	ausência	6,34	3,47
32	4,0	ausência	6,60	1,34	3,0	ausência	4,75	1,83
33	0,0	ausência	6,88	0,00	2,0	ausência	7,28	0,90
34	5,0	ausência	6,00	0,00	6,0	ausência	5,12	2,26
43	3,0	ausência	5,15	0,00	4,0	ausência	5,12	2,47
47	3,0	ausência	4,73	1,60	2,0	ausência	5,08	0,00
51	2,8	ausência	7,41	0,00	2,0	ausência	6,41	0,00
70	5,0	ausência	7,43	3,87	5,0	ausência	4,73	4,45
79	5,0	ausência	5,61	1,58	3,0	ausência	3,90	3,90
80	5,0	ausência	6,70	1,66	3,0	ausência	7,49	3,80
113	3,0	ausência	7,11	0,00	4,0	ausência	>7,87	2,13
116	3,0	ausência	4,00	0,00	3,2	ausência	5,71	3,02
121	5,1	ausência	5,18	0,00	5,7	ausência	4,62	0,00
125	4,0	ausência	7,79	1,00	3,0	ausência	6,26	3,47
131	3,1	ausência	4,58	1,45	3,7	ausência	4,85	1,30
133	4,0	ausência	6,38	0,00	2,8	ausência	5,80	0,00
134	4,0	ausência	7,00	1,90	4,0	ausência	6,97	0,00
157	4,0	ausência	5,49	0,00	3,0	ausência	3,30	0,00
M/DP	3,6 [±] 1,3,4 ^y	-	5,72 [±] 1,32 ¹	1,03 [±] 1,14 ¹	3,5 [±] 1,20 ^y	-	5,21 [±] 1,35 ²	2,18 [±] 1,93 ¹

^y = valor refere-se à média [±] desvio padrão das temperaturas de leite cru de 25 tanques e/ou latões.

¹ = valor refere-se à média [±] desvio padrão de amostras de leite cru de 25 produtores.

² = valor refere-se à média [±] desvio padrão de amostras de leite cru de 23 produtores.

Tabela 9 – Resultados da pesquisa de *Listeria monocytogenes*, registros de temperaturas do leite no momento da coleta e enumeração de coliformes totais e *E. coli* nas amostras de leite cru de mistura de fazendas da região A (Brotas – SP) durante 3ª e 4ª coleta.

Número dos produtores	3ª coleta (abril/2009)				4ª coleta (julho/2009)			
	Temp.	<i>L. monocytogenes</i>	Coliformes Totais	<i>E. coli</i>	Temp.	<i>L. monocytogenes</i>	Coliformes Totais	<i>E. coli</i>
	°C	50 mL	NMP/mL (Log)	NMP/mL (Log)	°C	50 mL	NMP/mL (Log)	NMP/mL (Log)
5	3,0	ausência	4,95	0,90	3,2	ausência	2,00	1,78
7	4,0	ausência	7,12	5,22	4,0	ausência	4,41	1,90
9	5,0	ausência	4,93	0,78	2,5	ausência	3,57	0,60
12	4,0	ausência	7,71	2,80	4,0	ausência	<7,87	7,59
18	2,0	ausência	3,53	0,78	2,0	ausência	2,79	1,00
21	4,0	ausência	2,95	0,90	4,0	ausência	2,76	1,60
29	5,0	ausência	3,24	2,48	5,0	ausência	2,15	1,78
30	4,0	ausência	7,87	5,19	3,0	ausência	1,79	<0,00
32	4,0	ausência	6,48	4,60	4,0	ausência	2,41	1,90
33	3,0	ausência	6,48	2,55	3,0	ausência	5,16	<0,00
34	5,0	ausência	5,46	<0,00	3,5	ausência	3,42	1,30
43	3,0	ausência	7,71	<0,00	3,0	ausência	2,92	<0,00
47	3,0	ausência	6,87	0,30	4,0	ausência	4,56	<0,00
51	3,0	ausência	6,87	<0,00	5,0	ausência	1,78	<0,00
70	5,0	ausência	5,25	4,15	4,0	ausência	3,59	1,30
79	5,0	ausência	5,78	2,48	*	*	*	*
80	5,0	ausência	7,09	<0,00	5,0	ausência	6,00	0,30
113	4,0	ausência	7,35	0,78	4,0	ausência	3,55	<0,00
116	3,2	ausência	6,48	2,67	3,0	ausência	5,62	0,60
121	3,1	ausência	5,26	<0,00	3,1	ausência	3,90	1,30
131	5,0	ausência	5,24	0,60	4,0	ausência	2,20	1,15
133	2,0	ausência	6,60	0,60	2,0	ausência	3,16	1,00
134	4,0	ausência	6,68	<0,00	4,0	ausência	2,70	<0,00
157	4,0	ausência	6,60	0,90	3,0	ausência	2,70	<0,00
106	4,0	ausência	7,64	0,60	5,0	ausência	<7,87	<0,00
M/DP	3,9 [±] ,0,9 ^y	-	6,09 [±] ,1,40 ¹	2,7 [±] 1,68, ¹	3,6 [±] 0,9 ^y	-	3,3 [±] 1,21 ²	1,71 [±] 1,67 ¹

*= não coletada

^y = valor refere-se à média [±] desvio padrão das temperaturas de leite cru de 25 tanques e/ou latões.

¹ = valor refere-se à média [±] desvio padrão de amostras de leite cru de 25 produtores.

² = valor refere-se à média [±] desvio padrão de amostras de leite cru de 24 produtores.

Nas Tabelas 10 e 11 estão apresentados os resultados da pesquisa de *L. monocytogenes* no leite cru de mistura das fazendas das regiões B. Nas mesmas tabelas estão apresentados os resultados da enumeração de coliformes totais e *E. coli* e, também, registros da temperatura do leite, no momento da coleta das amostras.

Durante a 4ª coleta da região B não foram coletadas amostras dos produtores números 210, 221 e 700, e os produtores 253,53 e 158 foram substituídos pelos produtores 23, 162 e 207 respectivamente. Das 4 mechas analisadas da região B, dos produtores 600 e 700, não houve detecção de *Listeria ssp.*

Tabela 10 – Resultados da pesquisa de *Listeria monocytogenes*, registros de temperaturas do leite no momento da coleta e enumeração de coliformes totais e *E. coli* nas amostras de leite cru de mistura de fazendas da região B (Pirassununga – SP) durante a 1ª e 2ª coleta.

Número dos produtores	1ª coleta (nov/2008)				2ª coleta (fev/2009)			
	<i>L. monocytogenes</i>		Coliformes	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>		Coliformes	<i>E. coli</i>
	Temp.	50 mL	Totais	NMP/mL	Temp.	50 mL	Totais	NMP/mL
	°C		(Log)	(Log)	°C		(Log)	(Log)
1	3,5	ausência	6,51	3,60	3,4	ausência	6,26	4,48
53	4,7	ausência	5,64	0,00	7,7	ausência	6,15	0,00
58	8,0	ausência	4,08	1,60	14	ausência	5,60	0,00
59	8,0	ausência	4,34	2,30	7,0	ausência	4,76	1,00
60	3,0	ausência	6,79	2,97	3,1	ausência	1,78	0,78
63	2,7	ausência	3,30	1,90	4,2	ausência	4,20	1,00
70	8,0	ausência	4,20	0,00	4,1	ausência	6,00	0,90
74	6,9	ausência	4,73	1,78	4,8	ausência	2,26	0,78
76	3,1	ausência	5,79	0,00	3,5	ausência	2,90	0,00
151	8,0	ausência	4,85	1,78	9,0	ausência	3,78	0,00
155	12,0	ausência	7,35	1,90	4,1	ausência	4,48	0,00
156	3,0	ausência	6,76	0,00	3,7	ausência	2,85	0,00
157	4,0	ausência	6,70	2,00	*	*	*	*
158	13,0	ausência	>7,87	3,75	4,1	ausência	6,68	4,41
204	5,2	ausência	7,43	1,90	2,0	ausência	5,06	1,78
205	3,8	ausência	3,54	0,00	3,1	ausência	3,60	0,00
207	3,0	ausência	5,30	2,78	4,0	ausência	2,48	0,60
209	13,0	ausência	7,32	6,83	12	ausência	5,16	3,78
210	2,0	ausência	6,45	0,00	2,0	ausência	4,68	0,00
221	14,0	ausência	7,22	5,32	11	ausência	6,56	6,20
251	5,2	ausência	7,11	1,78	5,0	ausência	4,60	3,90
260	4,3	ausência	2,34	1,30	13	ausência	4,48	1,51
500	3,9	ausência	3,11	<0,00	5,0	ausência	1,90	1,08
600	4,5	ausência	4,38	0,00	8,6	ausência	5,30	0,00
700	4,5	ausência	4,79	2,78	3,9	ausência	6,08	1,66
M/DP	6,1 [±] 3,5 ^y	-	5,42 [±] 1,54 ¹	2,72 [±] 1,46 ¹	5,92 [±] 3,51 ^z	-	4,48 [±] 1,51 ²	2,26 [±] 1,79 ²

* = amostra não coletada

^y = valor refere-se à média [±] desvio padrão das temperaturas de leite cru de 25 tanques e/ou latões.

^z = valor refere-se à média [±] desvio padrão das temperaturas de leite cru de 24 tanques e/ou latões.

¹ = valor refere-se à média [±] desvio padrão de amostras de leite cru de 25 produtores.

Tabela 11 – Resultados da pesquisa de *Listeria monocytogenes*, registros de temperaturas do leite no momento da coleta e enumeração de coliformes totais e *E. coli* nas amostras de leite cru de mistura de fazendas da região B (Santa Cruz da Conceição – SP) durante a 3ª e 4ª coleta.

Número dos produtores	3ª coleta (maio/2009)					4ª coleta (ago/2009)				
	<i>L. monocytogenes</i>		Coliformes	<i>E. coli</i>		<i>L. monocytogenes</i>		Coliformes	<i>E. coli</i>	
	Temp.	50 mL	Totais	NMP/mL	Nº	50 mL	Totais	NMP/mL	(Log)	(Log)
	°C		(Log)	(Log)			(Log)			
1	7,0	ausência	3,60	1,60	1	7,2	ausência	3,35	1,60	
53	4,9	ausência	1,78	0,30	162	3,2	ausência	2,70	2,00	
58	13,8	ausência	2,20	0,00	58	4,1	ausência	2,75	0,00	
59	10	ausência	3,12	0,00	59	3,1	ausência	7,64	<0,00	
60	6	ausência	1,78	0,78	60	5	ausência	7,35	1,30	
63	2,2	ausência	3,08	0,00	63	3,2	ausência	3,60	3,60	
70	*	*	*	*	70	3,5	ausência	4,20	<0,00	
74	5,0	ausência	3,80	1,30	74	3,1	ausência	2,08	1,30	
76	3,7	ausência	3,90	1,60	76	3,7	ausência	3,00	2,00	
151	8,0	ausência	2,76	<0,00	151	4,4	ausência	4,51	0,00	
155	8,5	ausência	4,76	1,60	155	2,1	ausência	6,51	2,11	
156	4,0	ausência	2,20	<0,00	156	3,4	ausência	1,49	<0,00	
157	4,0	ausência	5,47	<0,00	157	7,0	ausência	6,34	1,60	
158	10,0	ausência	6,26	4,81	158	*	*	*	*	
204	2,0	ausência	4,90	<0,00	204	4,2	ausência	5,31	0,30	
205	2,8	ausência	4,51	<0,00	205	3,0	ausência	2,34	0,00	
253	8,0	ausência	2,20	0,78	207	4,1	ausência	1,95	1,78	
209	4,0	ausência	3,03	<0,00	209	3,2	ausência	4,83	3,49	
210	12,0	ausência	4,20	<0,00	210	*	*	*	*	
221	3,0	ausência	4,41	1,00	221	*	*	*	*	
251	4,0	ausência	2,51	0,00	251	4,0	ausência	6,15	1,60	
260	8,0	ausência	4,68	1,60	260	14,6	ausência	3,42	<0,00	
500	7,0	ausência	2,00	1,00	500	7,2	ausência	2,08	0,30	
600	8,6	ausência	4,20	3,15	600	8,0	ausência	1,30	0,00	
700	6,0	ausência	1,30	<0,00	23	6,4	ausência	0,30	1,30	
M/DP	6,4±3,1 ^y	-	3,45±1,31 ¹	1,22±1,28 ¹	5,0±2,73 ^z	-	3,78±2,06 ²	1,35±1,11 ²		

* = amostra não coletada

^y = valor refere-se à média ± desvio padrão das temperaturas de leite cru de 24 tanques e/ou latões.

² = valor refere-se à média ± desvio padrão das temperaturas de leite cru de 22 tanques e/ou latões.

¹ = valor refere-se à média ± desvio padrão de amostras de leite cru de 24 produtores.

Nas Tabelas 12 e 13 estão apresentados os resultados da pesquisa de *L. monocytogenes* no leite cru de mistura das fazendas das regiões C. Nas mesmas tabelas são apresentados resultados da enumeração de coliformes totais e *E. coli* e, também, registros da temperatura do leite, no momento da coleta das amostras.

Na região C os produtores foram constantes nas duas primeiras coletas referentes aos meses de dezembro de 2008 e março de 2009. A partir da terceira coleta no mês de junho, o produtor 4 foi substituído pelo produtor 47. As amostras dos produtores 53 e 41 foram substituídas pelos produtores 116 e 164, devido à proximidade destas fazendas em relação ao laticínio C, o que facilitou também a análise por imersão das mechas de Moore.

As mechas de Moore nesta região foram introduzidas nos produtores 116 e 31, totalizando 4 amostras, apresentando resultado negativo para a presença de *Listeria* ssp.

Durante o experimento, ao final da terceira coleta, o laticínio C da região de Piracicaba fechou o seu estabelecimento, o que desencadeou a coleta de produtores que atendiam ao laticínio localizado na região de Pardinho, mas que também recebia leite das mesmas regiões, sendo elas: São Pedro, Torrinha e Piracicaba.

Devido à proximidade do produtor 116, ainda foi possível a realização da amostragem do ambiente de ordenha e introdução da Mecha de Moore, mantendo assim a análise nesta propriedade leiteira.

Dos pontos amostrados do ambiente de ordenha, houve positividade de 2 pontos para a presença de *Listeria innocua*, sendo ralo e piso da sala de ordenha do produtor 31, representando 4,44% das amostras ambientais analisadas. No ralo da ordenha foram encontrados dois sorotipos diferentes em um ponto amostrado sendo o sorotipo 6a e 6b. No piso da sala de ordenha foi identificado apenas o sorotipo 6a. As placas com colônias típicas para *Listeria* ssp estão apresentadas nas Figuras 10a, 10b, 10c e 10d e a confirmação feita em Api Listeria para *Listeria innocua* nas Figuras 11a e 11b.

(10a): Meio ALOA (piso sala de ordenha)

(10b): Meio ALOA (ralo da sala de ordenha)

(10c): Meio Oxford (piso da sala de ordenha)

(10d): Meio Oxford (ralo da sala de ordenha)

(11a): Api *Listeria innocua* (piso da sala de ordenha)

(11b): Api *Listeria innocua* (ralo)

Tabela 12 - Resultados da pesquisa de *Listeria monocytogenes*, registros de temperaturas do leite no momento da coleta e enumeração de coliformes totais e *E. coli* nas amostras de leite cru de mistura de fazendas da região C (Piracicaba – SP) durante a 1ª e 2ª coleta.

Número dos produtores	1ª coleta (dez/2008)				2ª coleta (mar/2009)			
		<i>L. monocytogenes</i>	Coliformes Totais	<i>E. coli</i> NMP/mL		<i>L. monocytogenes</i>	Coliformes Totais	<i>E. coli</i> NMP/mL
	Temp. °C	50 mL	NMP/mL (Log)	(Log)	Temp. °C	50 mL	NMP/mL (Log)	(Log)
1	3,2	ausência	3,22	<0,00	3,1	ausência	3,62	0,00
2	3,8	ausência	4,90	3,78	3,7	ausência	3,35	0,00
3	4,9	ausência	2,26	0,00	5,2	ausência	3,03	1,00
4	4,6	ausência	6,58	2,00	4,5	ausência	5,55	3,78
5	4,8	ausência	4,56	0,00	5,0	ausência	4,60	0,90
6	3,0	ausência	4,62	0,00	3,2	ausência	7,80	0,00
7	5,0	ausência	5,46	1,30	5,2	ausência	4,51	0,00
8	4,0	ausência	4,88	1,30	4,3	ausência	4,20	0,60
9	3,9	ausência	1,60	0,00	3,9	ausência	2,56	0,00
10	3,6	ausência	4,83	0,00	3,2	ausência	2,95	1,00
11	3,6	ausência	2,38	0,00	3,8	ausência	4,26	0,00
13	3,6	ausência	3,32	1,78	3,6	ausência	3,59	1,90
18	2,8	ausência	3,87	0,00	2,5	ausência	2,83	0,00
19	3,7	ausência	5,75	0,00	3,5	ausência	4,20	0,00
34	5,0	ausência	5,30	2,51	5,1	ausência	3,35	0,60
35	4,1	ausência	5,30	1,30	4,6	ausência	7,09	1,08
36	4,1	ausência	7,39	0,00	3,7	ausência	3,80	0,00
41	4,5	ausência	4,41	0,00	*	*	*	*
42	4,6	ausência	5,67	0,00	*	*	*	*
45	4,5	ausência	4,62	2,15	4,0	ausência	3,38	0,90
46	3,3	ausência	4,58	1,78	3,5	ausência	3,48	3,26
53	4,7	ausência	4,76	0,00	*	*	*	*
60	4,4	ausência	3,62	1,78	4,2	ausência	5,16	2,79
65	3,2	ausência	5,80	0,00	3,5	ausência	5,15	0,00
66	3,0	ausência	3,32	1,78	3,0	ausência	3,80	1,20
M/DP	4,0 [±] 0,7 ^y	-	4,52 [±] 1,35 ¹	0,86 [±] 1,09 ¹	3,92 [±] 0,76 ^z	-	4,19 [±] 1,32 ²	0,87 [±] 1,13 ²

* = amostra não coletada

^y = valor refere-se à média [±] desvio padrão das temperaturas de leite cru de 25 tanques e/ou latões.

^z = valor refere-se à média [±] desvio padrão das temperaturas de leite cru de 22 tanques e/ou latões.

¹ = valor refere-se à média [±] desvio padrão de amostras de leite cru de 25 produtores.

² = valor refere-se à média [±] desvio padrão de amostras de leite cru de 22 produtores.

Tabela 13 – Resultados da pesquisa de *Listeria monocytogenes*, registros de temperaturas do leite no momento da coleta e enumeração de coliformes totais e *E. coli* nas amostras de leite cru de mistura de fazendas da região C (Piracicaba – SP) durante a 3ª e 4ª coleta.

Número dos produtores	3ª coleta (jun/2009)				4ª coleta (set/2009)				
	<i>L.</i>	Coliformes	<i>E. coli</i>	Nº	<i>L.</i>	Coliformes	<i>E. coli</i>		
	<i>monocytogenes</i>	Totais	NMP/mL		<i>monocytogenes</i>	Totais	NMP/mL		
	Temp.	50 mL	NMP/mL		50 mL	NMP/mL			
	°C	(Log)	(Log)		(Log)	(Log)			
1	3,7	ausência	4,00	<0,00	1	-	ausência	1,78	<0,00
2	4,7	ausência	2,90	5,00	2	4,0	ausência	1,60	0,48
3	5,2	ausência	3,78	<0,00	3	4,2	ausência	4,48	<0,00
47	3,2	ausência	4,70	<0,00	5	3,9	ausência	2,00	<0,00
5	4,2	ausência	6,41	5,00	6	4,8	ausência	2,26	<0,00
6	3,0	ausência	6,56	<0,00	8	4,1	ausência	1,60	0,48
7	4,3	ausência	7,06	<0,00	9	3,5	ausência	2,15	<0,00
8	3,6	ausência	5,13	0,30	10	5,0	ausência	2,34	<0,00
9	3,9	ausência	2,48	<0,00	11	4,1	ausência	2,15	<0,00
12	4,1	ausência	5,20	0,60	12	3,0	ausência	2,66	0,30
11	*	ausência	*	*	13	4,0	ausência	2,68	<0,00
13	3,5	ausência	2,20	<0,00	17	5,1	ausência	2,20	0,90
67	2,5	ausência	4,88	0,00	18	3,7	ausência	2,62	<0,00
19	*	ausência	*	*	20	4,2	ausência	2,38	<0,00
34	4,2	ausência	5,55	1,78	22	5,0	ausência	3,57	3,30
35	4,1	ausência	6,68	<0,00	23	3,5	ausência	5,46	1,30
36	4,0	ausência	5,38	0,78	24	3,1	ausência	2,51	0,00
116	-	ausência	6,00	<0,00	26	-	ausência	3,47	1,30
42	3,5	ausência	5,67	2,15	30	4,3	ausência	3,71	<0,00
45	3,2	ausência	1,60	<0,00	31	4,5	ausência	5,71	1,30
46	3,2	ausência	4,41	<0,00	34	4,1	ausência	5,29	0,60
164	3,0	ausência	1,78	<0,00	116	-	ausência	4,79	0,90
60	4,2	ausência	4,58	2,00	*	*	*	*	*
65	3,7	ausência	4,79	1,30	*	*	*	*	*
66	3,2	ausência	2,93	<0,00	*	*	*	*	*
M/DP	3,7 [±] 0,6 ^y	-	5,0 [±] 1,1 ¹	1,89 [±] 1,79 ¹	4,1 [±] 0,6 ^z	-	3,06 [±] 1,3 ²	0,99 [±] 0,88 ²	

* = amostra não coletada/ - = não aferida

^y = valor refere-se à média [±] desvio padrão das temperaturas de leite cru de 22 tanques e/ou latões.

^z = valor refere-se à média [±] desvio padrão das temperaturas de leite cru de 22 tanques e/ou latões.

¹ = valor refere-se à média [±] desvio padrão de amostras de leite cru de 23 produtores.

² = valor refere-se à média [±] desvio padrão de amostras de leite cru de 22 produtores.

No Brasil, há descrições de ocorrência de *L. monocytogenes* em leite cru variando entre 0 a 37,8%, concordando em parte com os resultados apresentados no presente estudo que apresentou ausência de *L. monocytogenes* em 287 amostras de leite cru. Muitas pesquisas conduzidas no país relatam ausência de *L. monocytogenes* em amostras de leite cru.

Destro et al., (1991) analisando 20 amostras de leite cru, não encontraram a presença do patógeno. Casarotti et al, 1994 (N=20); Rocha (2004) (N=6); Nero, 2005 (N=240) e Arcuri et al., 2006 (N=42) também não encontraram *Listeria ssp* nas amostras analisadas.

Por outro lado outras pesquisas relatam a presença do patógeno, Moura et al., (1993) encontraram *L. monocytogenes* em 9,5% das amostras analisadas (N=220) no Estado de São Paulo. No Nordeste do país, Figueiredo (2000) isolou *L. monocytogenes* em 15% (N=60), Catão e Cebalos (2001) em 37,8% (N=45) e Silva et al., (2003) em 16,7% (N=6) das amostras de leite cru coletadas em indústrias de processamento de leite. Os dados encontrados são divergentes e a ocorrência de *L. monocytogenes* baixa em leite cru.

Dessa maneira é necessário maior número de pesquisas em leite cru com *Listeria monocytogenes* e seu comportamento com relação à presença de microbiota competitiva, visto a dificuldade de isolamento do mesmo.

A ausência de *Listeria monocytogenes* em 25/50 mL das amostras analisadas no estudo não garante que o leite cru refrigerado não tenha a presença da mesma, apenas nos revela ausência na unidade analítica analisada. Os tanques de refrigeração possuíam capacidade de até 1000L ou mais, e há a possibilidade da presença da mesma no leite restante não analisado.

A unidade analítica e a baixa quantidade nos alimentos podem dificultar a análise. Segundo Meyer-Broseta (2003), a detecção de *L. monocytogenes* em leite cru pode ser dificultada pelas baixas contagens da bactéria e devido à competição da microbiota bacteriana.

De acordo com Padilha et al., (2001) normalmente *L. monocytogenes* se encontra nos alimentos em baixa quantidade e seu crescimento pode ser diminuído pela presença de contaminantes, o que pode ser observado durante o experimento onde as contagens elevadas de coliformes totais podem ter influenciado o desempenho de crescimento de *L. monocytogenes*.

Segundo Franco e Landgraf (2002) um determinado microrganismo, ao se multiplicar em um alimento, produz substâncias que podem afetar a capacidade de sobrevivência e multiplicação de outros microrganismos presentes.

Por outro lado à presença de *Listeria monocytogenes* é relatada em ambientes de laticínios, sendo ela um microorganismo psicrotrófico encontrando condições propícias para o seu desenvolvimento, como temperaturas de câmaras frias, ralos, chão e equipamentos devido à capacidade de formação de biofilmes. Segundo Norton et al., (2001) e Kathariou (2002) a indústria é a principal fonte de contaminação por *L. monocytogenes*.

Simultaneamente, a este trabalho a cada coleta de leite das fazendas, 3 laticínios, sendo um em cada região (A, B e C) foram monitorados para o estudo dos padrões de contaminação por *L. monocytogenes*. Nos laticínios foram coletadas no total 393 amostras incluindo leite cru dos silos de recepção, leite pasteurizado, água, amostras ambientais e queijos em fase de processamento e embalado. Nas amostras do laticínio da região A (N=136) não foi encontrada *L. monocytogenes*, entretanto a bactéria foi isolada de 12,50% das amostras do laticínio B (N=136) e de 9,09% do laticínio C (N=121). Nos 3 laticínios estudados, *L. monocytogenes* não foi isolada do leite cru dos silos, do leite pasteurizado, da água, e dos queijos Minas frescal. Apenas no laticínio C houve isolamento de *L. monocytogenes* de amostras de queijo Prato e salmoura. Barancelli¹, 2010 revela a presença da bactéria em estudo no ambiente de processamento do leite, dentro da indústria (informação verbal).

Wagner et al.,(2006) relatam taxas de contaminação por *L. monocytogenes* em ambiente de indústrias de laticínios variando de 6,5 a 90,5%, já Harvey e Gilmour (1992) verificaram incidência de 33,3% , a qual foi maior do que nos ambientes das fazendas (5,3%). Waak (2002) na Suécia, também observou maior prevalência de *L. monocytogenes* nas amostras coletadas dos silos de recebimento de leite (19,6%) do que nas granjas (1%). A análise por Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) dos isolados das granjas e dos silos resultou em 16 tipos clonais, dois deles compartilhados entre os silos e o leite de fazenda.

A grande problemática seria de que maneira essas cepas de *Listeria* conseguem adentrar e se estabelecer e se disseminar no ambiente dos laticínios. De acordo com Ryser e Marth, (1991) através do leite cru, a *L. monocytogenes* pode contaminar o ambiente da indústria, onde encontra condições para colonizar vários locais e contaminar produtos nos diversos estágios de processamento, servindo o leite cru como fonte de contaminação para a indústria.

¹ BARANCELLI, V.G. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

A contaminação do leite cru por *L. monocytogenes* pode ser proveniente de fontes ambientais, durante a ordenha e, neste caso, frequentemente a bactéria é encontrada em baixos números (MEYER-BROSETA et al., 2003). Silagem contaminada pode contaminar animais e ambiente e contaminar o leite (RYSER ; MARTH, 1991), assim como vacas com mastite causada por *L. monocytogenes* (RADOSTIS et al., 1994). Sanaa et al., (1993) verificaram que fatores como baixa qualidade de silagem (pH<4,0), desinfecção incorreta de toalhas entre ordenhas, tubulações de ordenha sujas, iluminação inadequada da sala de ordenha, foram significativamente associados com contaminação do leite cru por *L. monocytogenes*.

As amostras positivas do ambiente de ordenha foram do ralo e piso da sala de ordenha, com 4, 4% das 49 amostras analisadas, podendo ser o ralo uma fonte de contaminação por *Listeria* sp. Ho et al., (2007) analisando amostras de ambiente de ordenha encontraram maior número de amostras positivas no ralo e chão de ordenha, representado 5, 3% das 469 amostras analisadas, sendo positivos para *Listeria monocytogenes* 15 dos 26 pontos analisados, demonstrando que o ambiente de ordenha também é fonte de contaminação por *Listeria*.

A presença de *Listeria innocua* relatada durante o trabalho é relevante, sua presença nas amostras ambientais pode indicar presença presumida de *Listeria monocytogenes*, uma vez que ambas possuem o mesmo habitat e podem estar presentes nos mesmos locais (HOFER ; REIS, 2005). A *L. monocytogenes* pode não ter sido detectada pela baixa quantidade e competição microbiana.

Outro dado importante encontrado foi o resultado da sorotipagem feita nas cepas encontradas no ambiente de ordenha, sendo de dois sorotipos 6a e 6b. O sorotipo 6a é preocupante com base no relato de Perin et al., (2003) em um trabalho onde foi identificado como agente etiológico a *Listeria innocua* sorotipo 6a, levando a paciente a óbito. Dessa maneira o estudo de cepas de *Listeria innocua* também é relevante, principalmente o entendimento de outras espécies.

Desta maneira a avaliação das condições de produção e manejo da ordenha são pontos fundamentais na qualidade do leite produzido, tanto em relação à presença de *Listeria* quanto de coliformes, por isso a grande importância de se investir em estudos de caracterização e fiscalização de propriedades leiteiras, a fim de se identificar os pontos críticos de contaminação por toda sua cadeia produtiva.

Dados que também chamam atenção neste trabalho são contagens elevadas de coliformes totais que em muitos produtores atingiram a escala de 7 log, e para *E. coli*, 5 log. Considerando que esses valores são achados para 1 mL de leite analisado, e que muitos produtores entregam por dia volumes de 100L a 1000L, o valor bruto de coliformes atinge níveis elevados com contagens até de 10 a 12 log.

Em relação às contagens de coliformes e *E. coli* os resultados encontrados foram arbitrariamente classificados em faixas, para efeitos de discussão. Para coliformes totais foram consideradas: contagens até 100NMP/ mL (muito bom); >100 a 1000 NMP/mL (bom); >1000 a 10000 NMP/mL (regular); >10000 a 100000 NMP/mL (ruim); e > 100000 NMP/mL (péssimo). Para *E.coli* foram consideradas contagens: <1 (excelente); >1-10 (bom); >10-100 (ruim); >100-1000 (muito ruim) e >1000 (péssimo).

Os resultados da distribuição das contagens de coliformes totais nas 3 regiões pesquisadas estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Distribuição das contagens de coliformes totais nas amostras de leite cru das regiões A, B e C

Amostras		Distribuição (%) das contagens de coliformes totais (NMP/mL)				
Regiões	N	<10 ²	10 ² -10 ³	>10 ³ -10 ⁴	>10 ⁴ -10 ⁵	>10 ⁵
A	99	3 (3%)	11 (11%)	13 (13%)	17 (17%)	55 (56%)
B	95	8 (9%)	17 (18%)	15 (16%)	23 (24%)	33 (34%)
C	92	7 (7%)	19 (19%)	19 (19%)	21 (21%)	26 (26%)

Das 99 amostras da região A, 3% (n=3) estiveram em faixas de contagens classificados como muito bom e 11% (n=11) bom. 13% (n=13) e 17% (n=17) foram classificadas como regular e ruim. As demais, 56% (n=55) foram classificadas como péssimo.

Das 95 amostras analisadas da região B, apenas 9% (n=8) foram classificadas como muito bom, 18% (n=17) bom e 16% (n=15) como regular, sendo que 58% (n=55) ficaram entre as faixas de ruim e péssimo.

Na região C pode-se verificar que 7% (n=7) foram classificadas na faixa de muito bom, 19% (n=19) bom, 19% (n=19) como regular e 47% (n=47) ficaram entre as faixas de ruim e péssimo. Dessa maneira, 71% das amostras apresentaram contagens acima de 10³ NMP/mL, sendo estes resultados melhores que as outras duas regiões estudadas (A e B).

Os resultados da distribuição das contagens de *E. coli* nas 3 regiões pesquisadas estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Distribuição das contagens de *E.coli* nas amostras de leite cru das regiões A, B e C

Amostras		Distribuição (%) das contagens de coliformes totais (NMP/mL)				
Regiões	N	<1	>1-10	>10-100	>100-1000	>1000
A	99	35(34%)	17(17%)	22 (24%)	9 (9%)	16 (16%)
B	95	33 (35%)	17 (18%)	27 (28%)	5 (5%)	13 (14%)
C	92	48 (52%)	17 (18%)	17 (18%)	4 (4%)	6 (6%)

As contagens de coliformes totais nas 3 regiões estudadas A, B e C estiveram com 86% (N=85) , 74% (N=71) e 72% (N=66) das amostras com contagens acima de 10^3 NMP/mL, respectivamente. *E. coli* esteve presente em 66% das amostras da região A, em 65% da região B e em 46% da região C. Segundo Citadin et al., (2009), contagens de coliformes totais acima de $1,0 \times 10^3$ UFC/mL são indicativas de deficiências de higiene na produção de leite. No referido trabalho foram avaliadas 31 amostras de propriedades leiteiras do município de Marechal Cândido Rondon, que apresentaram falhas nos procedimentos de higiene e limpeza; e contagens de coliformes totais em 29 das amostras com contagens de $4,00 \times 10$ a $1,40 \times 10^4$ UFC/mL, e *E. coli* em 19 amostras com contagens de 4 a $1,10 \times 10^4$ NMP/mL, demonstrando condições deficientes de produção.

Nos Estados Unidos, Van Kessel et al., (2004) encontraram maior porcentagem de amostras de leite cru contaminadas por *E. coli*: 93% das 859 analisadas e verificaram que aproximadamente 40% das amostras apresentavam populações de *E. coli* entre 10 e 100 UFC. No presente estudo, 75%, 81% e 88% das amostras das regiões A, B e C, respectivamente, apresentaram populações de *E. coli* de até 100 MNP/mL. Assim, na região A, 34% (n= 35) das amostras estiveram na faixa considerada excelente, 17% (n=17) bom, 24% (n=22) ruim, 9% (n=9) muito ruim e 16% (n=16) como péssimo. Já na região B, 35% (n=33) ficaram enquadradas na faixa excelente, 18% (n=17) como bom, 28% (n=27) regular, 5% (n=5) ruim e 14% (n=13) como péssimo. A região C apresentou melhores resultados com 52% (n=48) amostras enquadradas na faixa excelente, 18% (n=17) como bom, e 18% (n=17) regular, 4% (n=4) como ruim e 6% (n=6) péssimo.

Foi observada grande variação das contagens de coliformes, no leite de mesmas propriedades, em diferentes coletas, sendo verificadas, em algumas coletas, contagens muito baixas e, em outras, muito altas, evidenciando que não há padronização nem constância nas práticas de ordenha. Assim, houve diferença significativa ($P < 0,05$) nas contagens de coliformes totais, entre as 4 coletas realizadas que pode ser visualizada na Figura 12, porém não houve diferença significativa em relação às contagens de *E. coli* ($P > 0,05$).

Figura 12 - Comparação das médias de contagens de coliformes totais entre as 4 coletas realizadas.

Médias seguidas da mesma letra maiúscula em um mesmo ponto não diferem entre si.

Esses achados condizem com as avaliações dos questionários encontrados neste trabalho que traduzem produção e manejo insatisfatório na ordenha das 3 regiões analisadas.

Pesquisas em outras regiões apresentam dados semelhantes revelando contagens de mesófilos, que inclui os coliformes, em níveis críticos para a qualidade. Em uma pesquisa realizada no estado de Goiás, Bueno et al., (2002) verificaram que das 20 amostras analisadas 75% ($n=15$) estavam com contagens acima de 10^6 UFC/mL. Moraes et al., (2005) analisando 42 amostras de leite cru de cinco municípios do estado do Rio Grande do Sul, encontraram presença de coliformes em 97,6% ($N=41$) com contagens variando de 3,36 a 5,48 log.ufc.mL⁻¹ e *E. coli* em 19% ($N=8$), demonstrando falhas na higiene e risco sanitário.

A alta presença de coliformes totais indica falhas no processo de manejo e más condições de higiene e possível presença de bactérias do gênero coliformes incluindo espécies de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *E. coli* e outras (SILVA et al., 2001).

Como não houve a confirmação da presença de *L. monocytogenes* em nenhuma das amostras não foi possível correlacionar a presença da mesma com os fatores de risco analisados nos itens de verificação dos questionários. Dessa forma os itens selecionados descritos na análise estatística (item 5.9) foram cruzados com as contagens de coliformes totais a fim de se obter dados relevantes de como os procedimentos no manejo ordenha podem influenciar as contagens de coliformes.

Comparando os valores das médias de coliformes totais das 4 coletas realizadas entre as propriedades que apresentaram ordenha mecânica e manual e a lavagem dos tetos, não houve diferença significativa ($P>0,05$), semelhante aos resultados de Moraes et al. (2005) e Gottardi et al. (2008) que não encontraram diferenças significativas em relação ao tipo de ordenha (manual ou mecânica) e contagem de coliformes totais ($P>0,05$).

Porém no presente trabalho, a média das contagens de coliformes totais foi significativamente menor ($P<0,05$) entre as propriedades que realizavam procedimentos de pré e pós-dipping, possuíam calçamento na sala de ordenha e utilizavam tanque como sistema de refrigeração do leite, o que pode ser demonstrado na Tabela 16.

Tabela 16 - Médias de coliformes totais em relação à realização ou não das práticas de manejo

Itens verificados	M/DP		
	S	N	P
Realiza pré-dipping	3,46± 1,85	4,43± 2,13	<0,0001
Realiza pós-dipping	3,05± 1,74	4,58± 2,04	<0,0001
Possui calçamento na sala de ordenha	3,81± 2,03	4,55± 2,08	<0,0084
Sistema de refrigeração (tanque)	3,53± 1,93	5,53± 1,73	<0,0001
Sistema de refrigeração (latão)	5,53± 1,73	3,53± 1,93	<0,0001

* S= sim; N= não; M= Média; DP= Desvio padrão; P= nível de significância;

Condições precárias de higiene foram observadas nas três regiões estudadas. Os produtores se comportavam de maneira distinta, variando entre as faixas estabelecidas para a

contagem de coliformes, dados que também são preocupantes e que demonstram produção insatisfatória, sem controle na qualidade e produtores imprevisíveis para o laticínio.

A falta de conscientização por parte dos produtores é um obstáculo grande para a produção leiteira no Brasil, mesmo com os benefícios da refrigeração, esta medida é apenas um passo para a melhoria, pois os parâmetros de condições de ordenha mesmo previstos na legislação não são aplicados de forma correta. Garantir a refrigeração não é garantir a qualidade do leite em sua totalidade. Pesquisas sobre a qualidade do leite após a implantação da IN 51 devem ser aplicadas para avaliar a evolução desse processo, além de pesquisas referentes à caracterização de propriedades leiteiras, bem como pesquisas sobre comportamento de *Listeria monocytogenes* e microbiota competitiva.

6. CONCLUSÕES

1. Não foi detectada a presença de *Listeria monocytogenes* nas amostras de leite cru analisadas e ambiente de ordenha.
2. Foi detectada a presença de *Listeria innocua* em dois pontos do ambiente de ordenha analisados, sendo eles: ralo e piso da sala de ordenha, sugerindo que os mesmos podem ser fontes de contaminação por *Listeria* sp.
3. Das propriedades pesquisadas (N=75), 77,3% (n=58) apresentaram condições insatisfatórias de produção de leite e de higiene de equipamentos e utensílios de ordenha.
4. A média das contagens de coliformes totais foi significativamente menor entre as propriedades que realizavam procedimentos de pré e pós dipping, possuíam calçamento na sala de ordenha e utilizavam tanque como sistema de refrigeração do leite.
5. Lotes de leite com altas cargas de coliformes são recebidos pelos laticínios das três regiões estudadas. A contagem de coliformes totais nas amostras de leite cru analisadas das regiões A, B e C apresentaram 86% (n=85), 75% (n=71) e 72% (n=66), respectivamente, contagens acima de 10^3 NMP/mL.
6. *E. coli* esteve presente em 66% das amostras da região A, em 65% da região B e em 46% da região C.
7. Apesar das exigências das novas normas implementadas pela IN 51, a produção de leite nas regiões estudadas encontram-se em condições insatisfatórias, ficando claro que o produtor rural ainda desconhece os princípios básicos de higiene do leite em relação aos aspectos de contaminação bacteriana e suas implicações na qualidade do leite.

REFERÊNCIAS

AJZENTAL, A. Caminhos do leite: da ordenha ao consumidor. **Leite e Derivados**, São Paulo, v.3, n. 18, p. 29-40, 1994.

ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S.M.; ANGELO, F.F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n.3, p. 440-446, jun., 2006.

BERQUÓ, E.S.; SOUZA, J.M. P.; GOTLIEB, S.L.D. **Bioestatística**. São Paulo: EPU, 1981.350p.

BILLE, J.; CATIMEL, B.; BANNERMAN, E.; JACQUET, C.; YERSIN, N.M.; CANIAUX, I.; MONGET, E.; ROCOURT, J. *Listeria*, a new and promissing one - day syatem to identify *Listeria* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 58, n. 6, p. 1857-1860. 1992.

BRASIL. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do Leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial**, Brasília, Anexo IV, Seção 1, p. 13, 2002.

_____. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. Brasília, 1993 p. 11937-11960.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Portaria nº 451. **Diário Oficial**, Brasília, p. 8-15, 22 de set., 1997.

_____. Portaria nº 352, de 4 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal. **Diário Oficial** ,Brasília, 4 set. 1997.

_____. Portaria nº 368, de 4 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos elaboradores / industrializadores de alimentos. **Diário Oficial**, Brasília, Seção 1, p. 19697, 1997.

BEHMER, M.L.A. **Tecnologia do leite**. 15.ed, São Paulo: Nobel, 1984.

BRITO, J.R.F.; ARCURI, E.F.; SANTOS, E.M.P.; LANGE, C.C.; SOUZA, G.N.; BRITO, M.A.V.P.; LUCHANSKY, J.B. Fontes de contaminação e controle de *Listeria monocytogenes* em leite e queijos e no ambiente onde eles são produzidos. **Leite e Derivados**, Campinas, v. 16, n.96, p. 89-93, fev., 2007.

BROSCH, R.; CHEN, J.; LUCHANSKY, J.B. Pulsed-field fingerprinting of *Listeriae*: identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.60, n.7, p.2584-2592, July, 1994.

BUCHANAN, R.L.; SMITH, J.L.; LONG, V. Microbial risk assessment: dose- response relations and risk characterization. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 58, n.3, p. 159-172, 2000.

BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.J.; NICOLAU, E.S.; MANSUR, J.R.G.; NEVES, R.B.S. Parameters of microbiological quality of raw milk and water in dairy farms in Goiás state - Brazil. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, 2., 2002 Ribeirão Preto. **Anais...** São Paulo: Instituto Fernando Costa, 2002. 1 CD-ROM.

CASAROTTI, V.T. **Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo Minas frescal comercializados em Piracicaba**. 1993. 109p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

CATÃO, R. M. S., CEBALLOS, O.S. B. *Listeria ssp*, Coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba, Brasil. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 281-287, 2001.

CERQUEIRA, M.M.O.P.; LEITE, M.O. Doenças transmissíveis pelo leite e derivados. **Caderno Escolar Técnico de Veterinária**, Belo Horizonte, v.13, n. 16, p. 39-62, 1995.

CHAE, M. S.; SCHRAFT, H.; HANSEN, L. T.; MACKERETH, R. Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. **Food Microbiology**, London, v. 23; n.3, p. 250–259, May, 2006.

CITADIN, S.A.; POZZA, M. S. S.; POZZA, P.C.; NUNES, R.V.; BORSATTI, L.; MANGONI, J.; Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e fatores associados. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.10, n. 1, p. 52-59, jan./mar. 2009.

COSSART, P. Molecular and cellular basis of the infection by *L. monocytogenes* an overview. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 291, n. 6-7, p. 401-409. Feb., 2002.

COSSART,P.; KOCKS, C. The actin-based motility of the facultative intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 13, n. 3, p. 395-402, 1994.

COSSART, P., LECUIT, M. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement bacterial factors, cellular ligands and signaling. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 17, n. 14, p. 3797-3806, 1998.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN SCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 49, p. 711-745, 1995.

DALTON, C.B.; AUSTIN, C.C.; SOBEL, J.; HAYES, P.S.; BIBB, W.F.; GRAVES, L.M.; SWAMINATHAN, B.; PROCTOR, M.E.; GRIFFIN, P.M. Listeriosis from chocolate milk: Linking of an outbreak of febrile gastroenteritis and “sporadic” invasive disease. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 336, n. 2, p. 100-105, 1997.

DESTRO, M.T. ***Listeria monocytogenes* na cadeia produtiva de alimentos: da produção primária ao consumidor final**. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

DESTRO, M.T.; SERRANO, A.M.; KABUKI, D. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, Oxford, v.2, n.2, p. 110-112, Apr. 1991.

DOMINGUES-RODRIGUEZ, L.; GARAYZABAL J.F.F.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; FERRI, E.R.; FERNÁNDEZ, G.S. Isolation of microorganisms of the species *Listeria* from raw milk intended for human consumption. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 31, n. 10, p. 938-941, 1985.

FAO. Disponível em: www.fao.org. Acesso em : 10 out. 2008.

FARBER, J. M. An introduction to the hows and whys of molecular typing. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, n.10, p.1091-1101, Oct., 1996.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food- borne pathogen. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 55, n. 3, p. 476-511, 1991.

FENG, P.C.S., HARTMAN, P.A. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v.43, n. 6, p.1320-1329, 1982.

FENLON, D. R. Growth of naturally occurring *Listeria ssp* in silage: a comparative study of laboratory and farm ensiled grass. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 41, n. 4, p.375, 1986.

FIGUEIREDO E.A.T.; **Ocorrência do gênero *Listeria* e avaliação da diversidade genética de *Listeria monocytogenes* através do random amplified polymorphic DNA (RAPD) e sua distribuição em linha de processamento de leite pasteurizado tipo “C”**. 100 p. Tese. (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2000.

FONSECA, L.F. L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos, 2000.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T.; GELLI, D. Foodborne diseases in Southern South América. In: MILIOTIS, M.; BIER, J. (Ed.) **International handbook of foodborne pathogens**. New York: Marcel Dekker, 2003. p.733-743.

FURLANETO, F.P.D.; ESPERANCINI, M.S.T.; SALLA, D.A.; Caracterização do sistema produtivo de leite na região do médio do Paranapanema - São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 16, 2008, Botucatu. **Anais...** Botucatu: UNESP, 2008.

GARCIA, C.A.; SILVA, N.R.; LUQUETTI, B.C.; MARTINS, I.P.; SILVA, R.T.; VIEIRA, R.C. Influência do ozônio sobre a microbiota do leite “in natura”. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 70, p. 36-50, 2000.

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P.M.; Methods for the isolation and identification of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, n. 5, p. 851-875, 2005.

GOLDFINE, H., WADSWORTH, S. J., Macrophage intracellular signaling induced by *Listeria monocytogenes*. **Microbes and Infection**, Amsterdam, v. 4, n. 13, p. 1335- 1343, 2002

GOLDFINE, H.; KNOB, C.; ALFORD, D.; BENTZ, J. Membrane permeabilization by *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C is independent of phospholipid hydrolysis and cooperative with listeriolysin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.92, n. 7, p. 2979-2983, 1995.

GOTTARDI, C.P.T.; MURICY, M.C.; SCHMIDT, V. Qualidade higiênica de leite caprino por contagem de coliformes e estafilococos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n.3, p. 743- 748, maio / jun. 2008.

GRAVES, L.M.; SWAMINATHAN, B. Pulsenet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 65, n.1-2, p. 55-62, 2001.

GRAVES, L.M.; SWAMINATHAN, B.; HUNTER, S.B. Subtyping *Listeria monocytogenes*. In: RYSER E.T.; MARTH, E. H. **Listeria, Listeriosis, and food safety**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1999.chap.9, p.279-297.

GRAY, M.L. A possible link in the relationship between silage feeding and listeriosis. **Journal American Veterinary Medicine**, Malden, v. 136, p.136 –205. 1960.

HAMDI, T.M. ; NAIM, M. ; MARTIN, P. ; JACQUET, C. Identification and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated in raw milk in the region of Algiers (Algeria). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 116, n. 1, p.190-193, 2007.

HARVEY, J; GILMOUR, A. Occurrence of *Listeria* species in raw milk and dairy products produced in Northern Ireland. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 72, n. 2, p. 119-125, 1992.

HARVEY, J.; KEENAN, K.P.; GILMOUR, A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. **Food Microbiology**, London, v.24, n.4, p. 380-392, Jun., 2007.

HAYES, P.; GRAVES, L.W.; SWAMINATHAN, B.; AJELLO, W.G.; MALCOLM, G.B.; WEAVER, E.R.; RANSOM, R.; DEEVER, K.; PLIKAYTIS, B.D.; SCHUCHAT, A; WENGER, J.D.; PINNER, R.W.; BROOME, C.V. The *Listeria* study group. Comparison of three selective enrichment methods for the isolation of *Listeria monocytogenes* from naturally contaminated foods. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 5, n. 12, p. 952-959, 1992.

HITCHINS, A.D. **Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods**. In: US Food and Drug Administration (FDA), Bacteriological Analytical Manual Online. Chapter. 10, revised January 2003. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>. Acesso em: 06 jul 2007.

HO, A. J.; LAPPI, V. R.; WIEDMANN, M. Longitudinal monitoring of *Listeria monocytogenes* contamination patterns in a farmstead dairy processing facility. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 90, n. 5, p. 2517-2524, 2007.

HOFER E, REIS C.M.F, HOFER C.B. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas isoladas de material clínico humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 32-37, 2006.

HOLT, J. J. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Willian & Wilkins, 1994.

HUHN, S.; HAJDENWURCEL, J.R.; MORAES, J.M.; VARGAS, O.L. Qualidade microbiológica do leite cru obtido por meio de ordenha mecânica e ao chegar à plataforma. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândida Tostes”**, Juiz de Fora, v. 35, n. 209, p. 3-8, 1980.

HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numerical index of discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.26, n. 11, p.2465-2466, 1988.

HUSU, J.R.; SEPPANEN, J.T.; SIVELA, S.K.; RAURAMAA, A.L. Contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* on dairy farms. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, Berlin, v. 37, n.4, p. 268-275, 1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Estatística da produção pecuária**. Brasília, 2010.

INTERNATION COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). *Listeria monocytogenes*. In:_____. **Characteristics of microbiological pathogens**. London: Blackie Academic Professional, 1996.chap.8. p.141-182.

IRETON, K., COSSART, P. Host-pathogen interactions during entry and actinbased movement of *Listeria monocytogenes*. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 31, p. 113-138, Dec., 1997.

JAY, J. M. Foodborne Listerioses. In:_____. **Modern food microbiology**. New.York: AVI Book, 1992 .chap.21, p. 510-540.

JONES, G. M. **On-farm tests for drug residues in milk**. Petersburg: Virginia State University, 1999. 6 p.

KABUKY, D.Y. **Rastreamento de *Listeria monocytogenes* em indústrias processadoras de queijo fresco tipo latino, nos Estados Unidos da América, empregando a subtipagem molecular**. Campinas, 2004. 145p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

KATHARIOU, S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 65, n.11, p. 1811-1829, 2002.

KONGO, J. M., MALCATA, F. X., HO, A. J. WIEDMANN, M. Detection and characterization of *Listeria monocytogenes* in São Jorge (Portugal) cheese production. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.89, n.11, p.4456-4461, Nov. 2006.

KUHN, M., GOEBEL, W. Pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. In RYSER E. T., MARTH, E. H. **Listeria, Listeriosis, and food safety**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1999. chap. 5, p. 97-130.

KWANG-SOO, H., SEON-JA, P., SOOK-JAE, S., JUNG-HYUN, P., DUCK-HWA, C. Incidence and Polymerase Chain Reaction Assay of *Listeria monocytogenes* from Raw Milk in Gyeongnam Province of Korea. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 65, n. 1, p. 111–115, 2002.

LANDGRAF, I.M.; KOBATA, A.M.M.; JAKABI, M.; KIRSCHBAUM, C.R.A.; MARCHI, C.R. Surto de meningite neonatal por *Listeria monocytogenes*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.58, n.1, p.63-67, 1999.

LEITE, P.; RODRIGUES, R.; FERREIRA, M.; RIBEIRO, G.; JACQUET, C.; MARTIN, P.; BRITO, L. Comparative characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from Portuguese farmhouse ewe's cheese and from humans. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 2, p.111-121, Feb., 2006.

LINDGREN, S.; PETTERSSON, K.; KASPERSON, A.; JONSSON, A.; LINGVALL, P. Microbial dynamics during aerobic deterioration of silagens. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 36, n. 9, p. 765-774, 1985.

LOGUERCIO, A.P.; SILVA, P.W.; ALEIXO, J.A.G.; COSTA, M. M.; VARGAS, A.C. *Listeria monocytogenes*: um importante patógeno de origem alimentar . **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 80/81, p. 39-48, jan/fev. 2001.

LUKINMAA, S.; AARNISALO, K.; SUIHKO, M.L.; SIITONEN, A. Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates of human and food origin studied by serotyping, automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **Clinical Infectious Disease**, Chicago, v.10, n. 6, p.562-568, 2004.

MACHADO, P.F.; CASSOLI, L.D. Novas tecnologias na avaliação da qualidade do leite. In: TEIXEIRA, J.C.; INÁCIO NETO, A.; DAVID, F.M.; ANDRADE, G.A.; TEIXEIRA, L. F. A. C. **Avanços em Produção e Manejo de Bovinos Leiteiros**. Lavras, v.1, n. 1, p. 161- 179, 2002.

MACKEY, B.M.; BRATCHELL, N. The heat resistance of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.9, n.89, 1999.

MARQUIS, H., DOSHI, V., PORTNOY, D.A. The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O- independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 63, n.11, p. 4531-4534, Nov. 1995.

MASSA, S.; CESARONI, D.; PODA, G.; TROVATELLI, L.D.; The incidence of *Listeria* spp. In soft cheeses, butter and raw milk in the province of Bologna. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 68, n. 2, p.153-156, 1990.

MCLAUCHLIN, J.; MITCHELL, R.T.; SMERDONC, W.J.; AND JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 92, n. 1, p. 15-33, 2004.

MEAD, P.S.; SLUSKER L.; DIETZ .V. ; McCAIG L.F.; BRESSEL, J.S.; SHAPIRO, C. Food-related illness and death in the United States. **Emergence Infection Disease**, Atlanta, v.5, n. 6, p.607-625, 1999.

MEYER-BROSETA, S.; DIOT, A.; BASTIAN, S.; RIVIÈRE, J.; CERF, O. Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.80, n.1, p.1-15, Jan. 2003.

MONTEIRO, A.A.; TAMANINI, R.; SILVA, L.C.C.; MATTOS, M.R.; MAGNANI, D.F.; OVIDIO, L.; NERO, L.A.; BARROS, M.A.F.; PIRES, E.M.F.; PAQUEREAU, B.P.D.; BELOTI, V. Características da produção leiteira da região do agreste do estado de Pernambuco, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 4, p. 665-674, out./dez. 2007

MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**. 5th ed. New York: John Wiley & Sons, 2001. 645 p.

MORAES, C. R.; FUENTEFRIA, M. A.; ZAFFARI, C. B.; CONTE, M.; ROCHA, J. P. A. V.; SPANAMBERG, A.; VALENTE, P.; CORÇÃO, G.; COSTA, M. Qualidade microbiológica de leite cru produzido em cinco municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n.3, p. 259-264, 2005.

MORENO, I.; VIALTA, A.; LERAYER, A.L.S.; SALVA, T.J.G.; VAN DENDER, A G.F.; MACHADO, R. C. Qualidade microbiológica de leites pasteurizados produzidos no estado de São Paulo. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v.13, n. 20, p. 56-61, 1999.

MOURA, S.M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B. D. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 229-237, Aug. 1993.

MURAOKA, W.; GAY, C.; KNOWLES, D.; BORUCKI, M. Prevalence of *Listeria monocytogenes* Subtypes in Bulk Milk of the Paci. C Northwest. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 66, n. 8, p. 1413–1419, 2003.

MUTUKURIMA, A.N.; FERESSEU, S.B.; NARVHJ, J.A.; ABRAHAMSEN, R. K. Chemical and microbiological quality of raw milk, produce by small holder farmer. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 59, n. 8, p. 984-987, 1996.

NASCIMENTO, G.G.F., FIGUEIREDO, S.H.M., UBISSES, D.M., ANTONELLI, E.M. Condições microbiológicas do leite pasteurizado comercializado em Piracicaba. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25 , n.25, p. 13-21, 1991.

NERO, L. A. *Listeria monocytogenes e Salmonella spp em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil:* ocorrência e fatores que interferem na sua detecção. 2005. 141 p. Tese (Doutorado em Microbiologia de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A. F.; PINTO, J. P. A.; ANDRADES, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M.; Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n.1, p. 191-195, jan./mar. 2005.

NORTON, D.M.; McCAMEY, M.A.; KENNETH L.G.; SCARLETT, J.M.; BOOR, K.J.; WIEDMANN, M. Molecular studies on the ecology of *Listeria monocytogenes* in the smoked fish processing industry. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, n. 1, p. 198-205, Jan, 2001.

OH, D.H.; MARSHALL, D.L. Influence of packaging method, lactic and monolaurin on *Listeria monocytogenes* in crawfish tail meat homogenate. **Food Microbiology**, London, v. 12, n. 9, p. 159-163, 1995.

OLIVEIRA, C.A.F.; FONSECA, L.F.L.; GERMANO, P.M.L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 62, p. 10-21, 1999.

PADILHA, M.F.R.; FERNANDES, Z.F.; LEAL, T.C.A.; LEAL, N.C.; ALMEIDA, A.M.P.; Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 34, n.2, p.167-171, mar./abr.2001.

PAGOTTO, F.; CORNEUM, N.; FARBER, J. *Listeria monocytogenes* infections. In: _____. **Foodborne and intoxications**. 3rd ed. New York: Elsevier, 2006. p. 313-340.

PAHLOW, G.; MUCK, R. E.; DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; SPOELSTRA, S. F. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D, R.; MUCK, R. E.; HARISSON, J. H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 31-94.

PAPAGEORGIOU, D.K.; MARTIN, E.H. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening and storage of feta cheese. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 52, n.2, p. 82-87, 1989.

PERIN, M.; BEMER, M.; DELAMARE, C. Fatal case of *Listeria innocua* Bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n. 11, p. 5308-5309, 2003.

PONSANO, E.H.G.; PINTO, M.F.; JORGE, A.F.L. Variação sazonal e correlação entre propriedades d3 leite utilizados na avaliação da qualidade. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 64, p. 35-38, 1999.

PORTO, E.; EIROA, M.N.U. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in vegetables. **Dairy Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.21, n.4, p.12-16, 2001.

RADOSTITS, O.M.; BLOOD, D.C.; GAY, C.C. Diseases caused by bacteria. In: RADOSTITS, O.M.; BLOOD, D.C.; GAY, C.C. (Ed.). **Veterinary medicine**. London: Baillière Tindall, 1994. chap.16, p. 660-666.

RESEARCH FOUNDATION/RISK SCIENCE INSTITUTE. Expert panel on *Listeria monocytogenes* in foods. Achieving continuous improvement in reduction in foodborne listeriosis – a risk based approach. **Journal of Food Protection**, Ames, v.68, n.9, p.1932-1994, 2005.

RIEDEL, G. **Controle sanitário dos alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1992.

ROCOURT, J. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis, and food safety**. 2th ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p.1-20.

ROCOURT, J., JACQUET, C.; REILLY, A. Epidemiology of human listerioses and seafood. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 62, n. 3, p.197-209, 2000.

RYSER E.T.; DONNELLY, C.W. *Listeria*. In: Downes F.P.; ITO,K (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination on foods**. 4th ed. Washington(DC): American Public Heath Association; 2001. p.343-356.

RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis, and food safety**. New York: Marcel Dekker, 1991. 632p.

SANAA, M.; POUTREL, J.L.; MENARD, F.S. Risk Factors Associated with Contamination of Raw Milk by *Listeria monocytogenes* in Dairy Farms. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.76, n.10, p. 2891-2898, 1993.

SANTA CATARINA. Secretaria do Estado da Saúde. Sistema Único de Saúde. Laboratório Central de Saúde Pública. **Manual de orientação para a coleta de água e amostras ambientais**. Florianópolis: LACEN, 2000.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; MORAES, L.B.; GUSMÃO, V.V.; PEREIRA, M.S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção : Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 22, n.2, p. 145-154, jul/dez. 2001.

SCHLECH, W.F. Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, Chicago, v. 42, n 4, p. 176-178, 1988.

SLUTSKER, L.; SHUCHAT, A. Listeriosis in humans. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H.; (Ed.). **Listeria, Listeriosis and food safety**. 2th ed. Marcel Dekker, New York, p. 75-95, 1999.

SEELINGER, H.P.R.; HOHNE, K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In: BERGANT, T., MORRIS, J. (Ed.). **Methods in microbiology**. New York: Academic, 1979, p.330-348.

SHARP, M.W. Bovine mastitis and *Listeria monocytogenes*. **Veterinary Record**, London, v. 125, n. 20, p.125-512. 1989.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001.

SILVA, B.C.; ALMEIDA, A.C.; PIRES JUNIOR, O.S.; DUARTE, E.R.; ALVES, R.C.; TEXEIRA, L.M. Caracterização sanitária de propriedades leiteiras na região de Francisco Sá, MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 9., 2008, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: Associação Brasileira de Zootecnia, 2008.

SKOGAARD, N.; MORGEN, C. A.; Detection of *Listeria ssp* in faeces from animals, in feeds and in raw foods of animal origin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.6, n. 3, p. 229- 242, 1988.

SOUZA, M. R., RODRIGUES, R., FONSECA, L. M., CERQUEIRA, M. M. O. P. Pasteurização do leite. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária**, Belo Horizonte, 3, n. 13, p.85-93, 1995.

SPECK, M. L. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3rd th. Washington : American Public Health Association, 1992. 1219p.

SPEXOTO, A.A. **Aplicação do Sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) em propriedades leiteiras**. 2003. 157p. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2003.

STEELE, M. L.; McNAB, W. B.; POPPE, C.; GRIFFITHS, M. W.; CHEN, S.; DEGRANDIS, S. A.; FRUHNER, L. C.; LARKIN, C. A.; LYNCH, J. A.; ODUMERU, J. A. Survey of Ontario bulk tank raw milk from food-borne pathogens. **Journal of Food Protection**, Ames, v.60, n.11, p.1341-1346, 1997.

TAVARES, S.G. **Avaliação das condições microbiológicas do leite pasteurizado tipos A, B e C, comercializados na cidade de Piracicaba, SP**. 1996. 84p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

TAVERNA, M. **Reflexões sobre a qualidade do leite**. Passo Fundo: Ed. Universitária – Universidade de Passo Fundo, 2004. 331p.

TEBALDI, V.M.R.; OLIVEIRA, T.L.C.; BOARI, C.A.; PICCOLI, R.H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por tanque de expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.3, p.753 – 760. jul./ set. 2008.

TILNEY, L.G., PORTNOY, D.A. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 109, n.4, p. 1597-1608, Oct., 1989.

TKAEZ, M.; PEDRASSANI, D.; FEDALTO, L.M.; THIEM, E.M.B. Níveis microbiológicos e físico-químicos do leite in natura de produtores do estado de Santa Catarina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: [s.n.], 2004.

TOMPKIN, R.B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 65, n.4, p.709-725, Apr., 2002.

VALK, H.; VAILLANT, V.; JACQUET, C.; ROCOURT, J.; LE QUERREC, F.; STAINER, F.; QUELQUEJEU, N.; PIERRE, O.; DESENCLOS, J.C.; GOULET, V. Two consecutive nationwide outbreaks of Listeriosis in France, October 1999- February 2000. **American Journal of Epidemiology**, Washington, v. 154, n.10, p.944-950, 2001.

VARGAS, O.L. A comercialização de leite cru e a segurança do consumidor. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v.50, n. 291, p. 3-17, 1995.

VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZALEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.14, n.3, p.584-640, 2001.

VITAS, A.I.; AGUADO, V.; GARCIA-JALON, I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 90, n. 3, p. 349–356, 2004.

WAAK, E.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in Farm Bulk Tanks and in Dairy Plant Receiving Tanks. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, n. 7, p. 3366-3370, Jul., 2002.

WAGNER, M.; ELISKASES-LECHNER, R.; RIECK, P.; HEIN, I.; ALLERGERGER, F. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from 50 small-scale Austrian cheese factories. **Journal of Food Protection**, Ames, v.9, n.6, p.1297-1303, 2006.

WELLS, J.G.; SHIPMAN, L. D.; GREENE, K.D.; SOWERS, R.G.; GREEN, J.H.; CAMERON, D.N.; DOWNES, F. P.; MARTIN, M.L.; GRIFFIN, P. M.; OSTROFF, S.M. Isolation of *Escherichia coli* serotype 0157: H7 and other Shiga-like-toxin producing *E. coli* from dairy cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, n. 5, p. 985-989, 1991.

WIEDMANN, M. Detection and characterization of *Listeria monocytogenes*. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 85, n.2, p. 524-531, 2002.

WONG, A.C. Biofilms in food processing environments. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 81, n. 10, p. 6-65, 1998.

ANEXOS

Anexo (A) Questionário de Caracterização das propriedades leiteiras

Itens de Verificação	Resposta	103
ORDENHA		
Tipo de ordenha	Manual () Balde ao pé () Canalizado ()	
Produção diária de leite	_____ Litros	
Roupa própria para ordenha (padrão:SIM)	Sim Não	
É realizada tricotomia dos pêlos do úbere? (padrão:SIM)	Sim Não	
É realizado pré-dipping? (padrão:SIM)	Sim Não	
É utilizado papel toalha para secagem dos tetos? (padrão: SIM)	Sim Não	
É reutilizado? (padrão: NÃO)	Sim Não	
Os ordenhadores usam luvas? (padrão:SIM)	Sim Não	
Os ordenhadores mantêm as mãos limpas? (padrão:SIM)	Sim Não	
É realizado o pós-dipping? (padrão:SIM)	Sim Não	
O local é iluminado adequadamente? (padrão:SIM)	Sim Não	
Há calçamento no curral de espera? (padrão:SIM)	Sim Não	
O curral de espera é limpo (seco, sem acúmulo de esterco)? (padrão:SIM)	Sim Não	
O chão da sala de ordenha é lavado freqüentemente? (padrão:SIM)	Sim Não	
O chão é lavado entre as ordenhas? (padrão:SIM)	Sim Não	
Há moscas no curral de espera, de saída e sala de ordenha? (padrão:NÃO)	Sim Não	
O chão do curral de espera e saída são lavados entre as ordenhas? (padrão:SIM)	Sim Não	
EQUIPAMENTOS/UTENSÍLIOS		
Há água quente para limpeza dos equipamento/utensílios? (padrão:SIM)	Sim Não	
Pré- Enxágüe: é utilizado água quente (40°C)? (padrão:SIM)	Sim Não	
É utilizado detergente alcalino (pH >11 e cloro = 140 ppm)? (padrão:SIM)	Sim Não	
Enxágüe ácido: é realizada limpeza com água morna por 5 minutos com adição de detergente ácido (pH<3)? (padrão:SIM)	Sim Não	
Na pré-ordenha é passada água clorada (100 a 200 ppm) por 5 minutos? (padrão:SIM)	Sim Não	
TANQUE DE LEITE		
A temperatura do leite no resfriador está entre 4°C e 7°C? (padrão:SIM)	Sim Não	
Há odor no resfriador? (padrão:NAO)	Sim Não	
É realizada agitação no resfriador? (padrão:SIM)	Sim Não	
Esse ciclo é automático? (padrão:SIM)	Sim Não	
A higienização do resfriador é feita diariamente? (padrão:SIM)	Sim Não	
É feita a Pré-lavagem do tanque: um ciclo de água morna (35-45°C)? (padrão:SIM)	Sim Não	
Ciclo de limpeza: é utilizado detergente alcalino (pH >11 e cloro = 130 ppm) na limpeza com água quente (50°C)? (padrão:SIM)	Sim Não	
Enxágüe ácido: é realizada limpeza com água morna com adição de detergente ácido (pH<3)? (padrão:SIM)	Sim Não	
É feita a sanitização com solução de iodo (25 ppm) ou cloro (130 ppm) sem enxágüe? (padrão:SIM)	Sim Não	
É utilizada escova própria para limpeza do resfriador? (padrão:SIM)	Sim Não	
A pessoa entra no resfriador para realizar a lavagem? (padrão:NAO)	Sim Não	
Se sim, há uma bota especial para este fim? (padrão:SIM)	Sim Não	
O leite é recolhido diariamente? (padrão:SIM)	Sim Não	
ALIMENTAÇÃO		
Uso de silagem	Sim Não	

Fazenda: _____ Região: A B C Data: _____

Em qual grupo esta propriedade se enquadra?() GRUPO 1 - 76 A 100% de atendimento dos itens () GRUPO 2 - 51 A 75% de atendimento dos itens ou () GRUPO 3 - 0 A 50% de atendimento dos itens

Anexo (B) Protocolo de isolamento de *L. monocytogenes*