UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

NATALI KNORR VALADÃO

**Rastreabilidade de micro-organismos patogênicos ao longo da
produção de leite pasteurizado: ferramenta potencial para a
segurança alimentar**

Pirassununga, 2012

NATALI KNORR VALADÃO

**Rastreabilidade de micro-organismos patogênicos ao longo da
produção de leite pasteurizado: ferramenta potencial para a
segurança alimentar**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para a
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Ciências da
Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto
Fernandes de Oliveira

Pirassununga
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

V136r	<p>Valadão, Natali Knorr</p> <p>Rastreabilidade de micro-organismos patogênicos ao longo da produção de leite pasteurizado : ferramenta potencial para a segurança alimentar / Natali Knorr Valadão. -- Pirassununga, 2012.</p> <p>97 f.</p> <p>Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Alimentos.</p> <p>Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira.</p> <p>1. <i>Listeria monocytogenes</i> 2. <i>Staphylococcus aureus</i> 3. <i>Escherichia coli</i> 4. Micro-organismos indicadores 5. Laticínio. I. Título.</p>
-------	--

Dedico aos meus pais Márcio e Beatriz
e aos meus amigos pelo total apoio.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida maravilhosa que tem me proporcionado.

Ao Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira pela orientação e ideias compartilhadas.

À Dra. Marta Mitsui Kushida pela confiança, ideias compartilhadas, auxílio nas coletas e ao apoio demonstrado neste trabalho.

Ao Dr. Júlio Balieiro pelo auxílio na parte estatística do projeto.

À Estela e Sarah pelo auxílio nas coletas, amizade e companheirismo no decorrer da pesquisa.

Ao especialista de laboratório Marcelo e ao técnico de laboratório Guilherme pela disponibilidade em ajudar.

Às estagiárias Rebeca e Jéssica, pelas diversas ajudas e dedicação durante o período de coletas e de experimento.

Aos proprietários dos laticínios e suas equipes de colaboradores, por possibilitarem a realização dessa pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento da pesquisa.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos pela oportunidade da realização deste trabalho.

À todos que embora não comentados individualmente, me apoiaram e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

“Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena”
Fernando Pessoa

RESUMO

VALADÃO, N. K. **Rastreabilidade de micro-organismos patogênicos ao longo da produção de leite pasteurizado: ferramenta potencial a para segurança alimentar**. 2012. 97p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

O objetivo do presente estudo foi monitorar a incidência de *Staphylococcus aureus*, *Listeria* sp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, coliformes totais, bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas ao longo da produção de leite pasteurizado, desde a ordenha até a obtenção do produto final para estabelecer etapas e locais críticos da produção, bem como avaliar se a presença de *Listeria* sp. constitui um bioindicador de *L. monocytogenes*, e *E. coli* um bioindicador de outros micro-organismos patogênicos. As coletas foram feitas em 5 laticínios (A, B, C, D e E) do Estado de São Paulo, em duplicata, com intervalo de coleta variando de 3 semanas a 7 meses, de acordo com disponibilidade dos laticínios. Coletou-se um total de 236 amostras foram coletadas, sendo 36 de leite (cru e pasteurizado), 162 eram provenientes de superfícies que não tinham contato com o leite e 38 superfícies que entravam em contato com leite. Das 36 amostras de leite analisadas, 13,9% estavam contaminadas com *Listeria* sp. e nenhuma com *L. monocytogenes*; 61,1% continham *E. coli* e 5,6% apresentavam *S. aureus*. Somente o leite do laticínio C apresentou em uma das coletas micro-organismo patogênico (*E. coli*) no leite pasteurizado, indicando falhas no processamento ou no manejo no momento da ordenha. Das 38 amostras de superfícies com contato com o leite (38), 2,6% foram positivas para *Listeria* sp., 50,0% para *E. coli* e 5,3% para *S. aureus*. Das amostras de superfícies sem contato com o leite (162), 13,3% estavam contaminadas com *Listeria* sp., 6,2% com *L. monocytogenes* e 25,9% com *E. coli*. De acordo com o limite estabelecido de aeróbios mesófilos no leite cru pela IN 62, constatou-se que 50,0% do leite cru dos laticínios A, D e E, 100% do leite cru do laticínio B e 33,3% do leite cru do laticínio C estão fora dos padrões estabelecidos pela legislação. Foi comprovado que a *Listeria* sp. não pode ser considerada como bioindicador de *L. monocytogenes* pelo teste Qui-Quadrado ($p < 0,05$). Ao comparar as médias das amostras positivas para os micro-

organismos *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria* sp. e *L. monocytogenes* dos laticínios processadores de leite tipo A com os de leite pasteurizado, somente o *S. aureus* no leite apresentou diferença significativa pelo teste “T” ($p < 0,05$). Além dos pontos críticos de controle (PCC) checados através da Árvore Decisória (pasteurização, superfícies internas de embalagens), outros pontos merecem destaque pela elevada quantidade de patógenos (tanques de armazenamento de leite cru e pisos e paredes de câmaras frias). Os resultados obtidos ressaltam a importância da adoção de ferramentas de gestão da qualidade, como Boas Práticas de Fabricação e APPCC, para que a segurança alimentar seja garantida ao longo da cadeia de produção do leite pasteurizado nos laticínios estudados.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, micro-organismos indicadores, laticínio.

ABSTRACT

VALADÃO, N. K. **Traceability of pathogenic microorganisms along the pasteurized milk production: a potential tool for food safety**. 2012. 97p. M. Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

The aim of this study was to monitor the incidence of *Staphylococcus aureus*, *Listeria* sp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, total coliforms, mesophilic aerobic and psychrotrophic bacteria along the pasteurized milk production, from milking to the final product, to establish steps and critical points of production, as well as to evaluate the presence of *Listeria* sp. as a bioindicator of *L. monocytogenes* and *E. coli* a bioindicator of other pathogenic microorganisms. Duplicate samples were collected in 5 dairy plants (A, B, C, D, E) from the state of São Paulo, within intervals ranging from 3 weeks to 7 months, according to the dairy plants availability. A total of 236 samples were collected, being 36 of milk (raw and pasteurized), 162 from surfaces with no contact with the milk, and 38 from surfaces with contact with milk. Out of 36 milk samples analyzed, 13.9% were contaminated with *Listeria* sp. and none had *L. monocytogenes*; 61.1% were contaminated with *E. coli* and 5.6% with *S. aureus*. Only dairy plant C showed pathogenic microorganism (*E. coli*) in the pasteurized milk in one of the collections, indicating failures in the pasteurization or excessive bacterial load in the raw milk. Out of the 38 samples of surfaces that had contact with milk, 2.6% were positive for *Listeria* sp., 50.0% for *E. coli* and 5.3% for *S. aureus*. As for the samples from surfaces with no contact with milk (162), 13.3% were contaminated with *Listeria* sp., 6.2% with *L. monocytogenes* and 25.9% with *E. coli*. According to the Brazilian regulations for aerobic mesophiles in raw milk by Normative Instruction 62, 50.0% of samples from dairy plants A, D and E, 100% of samples from dairy plant B and 33.3% of samples from dairy plant C were above the tolerance limit adopted. The analysis of *Listeria* sp. could not be considered as a bioindicator of *L. monocytogenes* by chi-square test ($p < 0.05$). When comparing the mean frequencies of positive samples for *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria* sp. and *L. monocytogenes* in the processing dairy plants of type A milk (plants A and B) and the pasteurized one (plants C, D and E), only *S. aureus* in milk showed

significant difference by “T” test ($p < 0.05$). In addition to the critical control points (CCP) checked by a decision tree (pasteurization, internal surfaces of packaging), other points should be highlighted by the high number of pathogens found (bulk raw milk tanks, floors and walls of cold storage rooms). Results of this trial indicate the importance of adoption of quality management tools such as Good Manufacture Practices and HACCP, to ensure food safety along the pasteurized milk production chain in the dairy plants evaluated.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, indicator microorganisms, dairy plant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ágar Baird-Parker com colônias típicas de <i>S. aureus</i> . A seta indica colônias pretas circundadas por um halo de precipitação (interno) e outro transparente (externo).....	22
Figura 2: Etapas de análise no Bax® System.	31
Figura 3: Interpretação dos resultados do Bax® System.	31
Figura 4: Representação esquemática básica do processo do leite tipo A.	37
Figura 5: Representação esquemática básica do processo do leite tipo B e pasteurizado.	38
Figura 6: Coleta de amostras de (A) parede do laticínio e (B) piso do laticínio.	40
Figura 7: Coleta das amostras de (A) estrados no piso do laticínio, (B) rejunte entre azulejos da parede do laticínio, (C) mãos de manipuladores e (D) teteiras.	41
Figura 8: Tela de resposta do Bax® System para <i>Listeria</i> sp. (A) Pico obtido para o <i>primer</i> de <i>Listeria</i> sp. e (B) Pico da presença da bactéria <i>Listeria</i> sp.....	47
Figura 9: Colônias típicas de <i>E. coli</i> (azuis) e de coliformes totais (vermelhas).	48
Figura 10: Frequências médias de amostras positivas para <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Listeria</i> sp. e <i>L. monocytogenes</i> no leite, em laticínios processadores de leite tipo A (laticínios A e B) e pasteurizado (laticínios C, D e E).....	52
Figura 11: Frequências médias de amostras positivas para <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Listeria</i> sp. e <i>L. monocytogenes</i> em superfícies que não entram em contato com o leite, em laticínios processadores de leite tipo A (laticínios A e B) e pasteurizado (laticínios C, D e E).	53
Figura 12: Frequências médias de amostras positivas para <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Listeria</i> sp. e <i>L. monocytogenes</i> em superfícies que entram em contato com o leite, em laticínios processadores de leite tipo A (laticínios A e B) e pasteurizado (laticínios C, D e E).	53
Figura 13: Histograma da frequência de <i>L. monocytogenes</i> em diferentes intervalos de contagem de <i>E. coli</i>	56
Figura 14: Histograma da frequência de <i>S. aureus</i> em diferentes intervalos de contagem de <i>E. coli</i>	57
Figura 15: Fluxograma de processamento do laticínio A.....	59

Figura 16: Fluxograma de processamento do laticínio B.....	61
Figura 17: Fluxograma de processamento do laticínio C.	63
Figura 18: Fluxograma de processamento do laticínio D.	65
Figura 19: Fluxograma de processamento do laticínio E.....	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Equipamentos e acessórios do Bax [®] System.	30
Quadro 2: Médias da contagem de mesófilos da primeira e segunda coleta realizada em cada laticínio	51
Quadro 3: Quantidade de amostras positivas para <i>Listeria</i> sp. e <i>L. monocytogenes</i> . .	58
Quadro 4: Micro-organismos patogênicos encontrados nos pontos coletados no laticínio A.	60
Quadro 5: Micro-organismos patogênicos encontrados nos pontos coletados no laticínio B.	62
Quadro 6: Micro-organismos patogênicos encontrados nos pontos coletados no laticínio C.	64
Quadro 7: Micro-organismos patogênicos encontrados nos pontos coletados no laticínio D.	66
Quadro 8: Micro-organismos patogênicos encontrados nos pontos coletados no laticínio E.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Requisitos microbiológicos, contagem de células somáticas e resíduos químicos em leite cru refrigerado.....	32
Tabela 2: Requisitos microbiológicos e contagem de células somáticas em leite cru refrigerado.	33
Tabela 3: Características das propriedades fornecedoras de leite cru dos laticínios....	36
Tabela 4: Data das coletas realizadas nos laticínios.....	39
Tabela 5: Características das instalações e do processamento dos 5 laticínios.....	45
Tabela 6: Ocorrência de <i>Listeria</i> sp. e <i>L. monocytogenes</i> nas amostras coletadas nos 5 laticínios do Estado de São Paulo.....	46
Tabela 7: Contagem padrão em placas para laticínios processadores de leite tipo A .	49
Tabela 8: Contagem padrão em placas para laticínios processadores de leite pasteurizado	49
Tabela 9: Contagem de mesófilos das superfícies que entram em contato com o leite.	50
Tabela 10: Contagem de mesófilos das superfícies que não entram em contato com o leite.....	50
Tabela 11: <i>E. coli</i> como bioindicador de patógenos em leite.....	54
Tabela 12: <i>E. coli</i> como bioindicador de patógenos em superfícies que não entram em contato com o leite.....	54
Tabela 13: <i>E. coli</i> como bioindicador de patógenos em superfícies que entram em contato com o leite.....	55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Cadeia produtiva e qualidade do leite.....	19
2.2 Microrganismos patogênicos contaminantes do leite.....	21
2.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.2.2 <i>Listeria</i> sp. e <i>Listeria monocytogenes</i>	23
2.3 Micro-organismos indicadores contaminantes do leite.....	25
2.3.1 Bactérias mesófilas e psicotróficas.....	25
2.3.2 Coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	26
2.4 Métodos de análise de micro-organismos patogênicos.....	27
2.4.1 Metodologias de análise.....	27
2.4.2 Métodos rápidos moleculares de detecção de patógenos.....	28
2.5 Programas de qualidade.....	32
3. OBJETIVOS.....	35
3.1 Geral.....	35
3.2 Específicos.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Área de estudo.....	36
4.2 Descrição dos laticínios estudados e a produção de leite pasteurizado.....	36
4.3 Amostragem.....	39
4.3.1 Leite fluido cru dos silos de armazenamento, tanques de expansão e balões de vidro.....	39
4.3.2 Leite pasteurizado.....	39
4.3.3 Amostras ambientais.....	39
4.4 Análises laboratoriais.....	41
4.4.1 Preparação das diluições para <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , mesófilos, psicotróficos e coliformes totais.....	41
4.4.1.1 Quantificação de <i>Escherichia coli</i> e Coliformes Totais.....	42
4.4.1.2 Quantificação de <i>Staphylococcus aureus</i>	42
4.4.1.3 Quantificação de aeróbios mesófilos e aeróbios psicotróficos.....	43
4.4.1.4 Detecção de <i>Listeria</i> sp. e <i>Listeria monocytogenes</i>	43
4.5 Análise de dados.....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 Características dos laticínios amostrados.....	45

5.2 Incidência de micro-organismos patogênicos e indicadores	45
5.3 Efetividade de <i>E. coli</i> como bioindicador de patógenos	54
5.4 <i>Listeria</i> sp. como bioindicador de <i>L. monocytogenes</i>	57
6. CONCLUSÕES	71
7. RECOMENDAÇÕES	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
8. APÊNDICE	85
10. ANEXO	97

1. INTRODUÇÃO

As transformações decorrentes da globalização econômica exigem políticas e ações de desenvolvimento que possam contribuir para as ações da defesa agropecuária no Brasil. As diferentes iniciativas devem visar às diferentes áreas envolvidas, com destaque para a qualidade global, e a inocuidade dos produtos de origem animal, que são os mais envolvidos na veiculação de doenças alimentares em humanos. Dentre os setores envolvidos na produção de alimentos pode-se destacar a cadeia produtiva láctea, que representa uma das mais importantes do complexo agroindustrial brasileiro.

A integração do Mercosul e a consolidação da abertura da economia tiveram repercussões diretas sobre o setor de laticínios. Em 1995 iniciou-se uma mudança estrutural na coleta e no transporte de leite, e os novos sistemas de remuneração ao produtor têm sido fatores determinantes, pois incentiva de forma progressiva a modernização de práticas de manejo do rebanho e também de conservação do leite (SBRISSIA, 2005).

O setor lácteo possui grande importância no cenário econômico brasileiro. O país é o 5º maior produtor de leite do mundo, com uma projeção de produção de quase 31 bilhões de litros no ano de 2011 (USDA/FAS, 2011). Com a produção de 2009 (mais de 29 bilhões de litros) gerou um capital de quase 9 bilhões de dólares (FAO, 2009) gerando mais de 4 milhões de empregos nas unidades produtivas em todo o país, sendo 80% dos estabelecimentos representados por pequenas propriedades prevalecendo o trabalho familiar (BERGAMASCHI, 2010).

O volume de leite produzido em 2009 no mundo segundo dados da EMBRAPA Gado de Leite e da *Food and Agricultural Organization* (FAO) foi de 583,4 bilhões de litros (FAO, 2009; ZOCCAL, 2011). A produção de leite no Brasil tem mostrado uma expansão ao longo dos últimos anos. De 1990 a 2000 a produção nacional cresceu 37% (CARVALHO et al., 2002) e de 2008 para 2009 o crescimento foi de 5,5% (ZOCCAL, 2011).

O Brasil representa um dos países com melhor combinação de fatores de produção para aumentar a oferta de leite e derivados de forma sustentável.

De acordo com Carvalho et al. (2002) a produção de leite tem perspectiva de continuar a crescer nos próximos anos, porém, ainda existem diferenças de qualidade na produção nacional, e necessidade de maior conscientização do pequeno produtor em relação à melhoria da qualidade do produto.

Carvalho et al. (2007) fizeram uma perspectiva para a produção de leite para o ano de 2020 sob 4 perspectivas diferentes. A produção de leite, por exemplo, será maior do que a produzida atualmente, mas poderá variar de 34 a 50 bilhões de litros. Esse valor depende de quanto se investirá no setor lácteo (escala de produção, melhoria na qualidade do leite, grandes ou pequenos produtores, desestímulo a produção, aumento do consumo interno entre outras variáveis).

O conceito de Cadeia Produtiva teve sua origem na escola francesa de economia industrial (BATALHA, 1995). Ele nos leva ao pensamento integrado de toda a produção do alimento, e à crescente preocupação com cada um dos elos da cadeia produtiva contribui com a sanidade animal, rastreabilidade, segurança alimentar, certificações, além de responsabilidades ambientais e sociais.

Dentre os diferentes atributos para conceituar um alimento como de “qualidade”, a segurança no ponto de vista higiênico-sanitário é sem dúvida a mais importante. Alimentos oferecidos aos consumidores não devem causar prejuízos à saúde e, portanto, não devem veicular micro-organismos patogênicos. A adoção de boas práticas na gestão da qualidade sob a ótica do *International Standard for Quality Management System* (ISO) prevê a aplicação dos princípios de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) em toda a cadeia produtiva. Este sistema tem sido exigido de forma cada vez mais intensa por países desenvolvidos como medida de controle de qualidade e segurança alimentar, tendo a rastreabilidade como um dos requisitos exigidos.

O conceito de rastreabilidade é recente no setor de agronegócios e tem sido muito discutido em carnes bovinas, onde se visa, basicamente, identificar a procedência do animal e conseqüentemente, aumentar a qualidade da carne (MACHADO; NANTES, 2000), requisito para atender às exigências dos principais mercados compradores, como por exemplo, países da União Europeia (MENDES, 2006).

Chapaval e Alves (2008) definem a rastreabilidade como uma forma de simplificar a localização de problemas, reduzir o volume de devolução de produtos e estabelecer responsabilidades. Este mesmo conceito pode ser aplicado aos riscos microbiológicos, onde a rastreabilidade de determinados micro-organismos na cadeia, pode permitir a identificação dos locais/etapas críticos, orientar no estabelecimento de limites aceitáveis e na implementação de medidas para seu controle.

Pensar na qualidade higiênico-sanitária envolve necessariamente refletir sobre a qualidade microbiológica dos alimentos e possíveis pontos de contaminação, principalmente aqueles relacionados aos micro-organismos patogênicos. É importante então, conhecer o real perigo que a presença de determinados patógenos no início da cadeia representa para a contaminação do alimento oferecido ao consumidor, ou se ao longo da produção de leite pasteurizado, os patógenos isolados são exclusivamente relacionados a falhas no processo produtivo sem nenhuma relação com a contaminação na fonte produtora.

O rastreamento dos patógenos ao longo da produção de leite, desde a ordenha até obtenção do alimento pronto para o consumo permitirá entender os diferentes fatores envolvidos no risco de sua presença. Assim, políticas adequadas de qualidade, envolvendo ações corretivas e preventivas podem ser implementadas de forma racional, garantindo a efetividade das Boas Práticas de Fabricação (BPF) introduzidas. Permite também direcionar o treinamento de colaboradores, ações diretas no processo, entre outras. Ou seja, torna-se extremamente interessante do ponto de vista da gestão de riscos e implementação de políticas de qualidade.

O Brasil tem necessidade de garantir os critérios de vigilância sanitária, sendo que o controle de patógenos e toxi-infecções alimentares provocadas por bactérias é um ponto chave para o aumento de exportações de alimentos e a rastreabilidade é um ponto fundamental neste processo. Neste cenário, esta proposta de trabalho visa detectar os pontos contaminados tanto por micro-organismos patogênicos quanto por indicadores ao longo do processamento do leite pasteurizado e os resultados serão úteis para melhorar as estratégias de controle para estes perigos microbiológicos nos laticínios.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cadeia produtiva e qualidade do leite

Cadeia produtiva é definida como "rede constituída por diversos atores que geram relações de força coletiva, que influenciam diretamente as estratégias mercadológicas e comerciais, assim como a tomada de decisão de cada um dos atores" (JANK; FARINA; GALAN, 1999).

Na cadeia produtiva do leite, estruturas importantes como as empresas e pessoas envolvidas, como por exemplo, a fazenda produtora, a usina de processamento, a rede distribuidora, constituindo o sistema-ator, são elos importantes na manutenção da qualidade do produto final. O processo de produção, transformação, transporte e comercialização fazem parte desta cadeia produtiva. Esses conceitos básicos permitem decompor a cadeia e decifrar sua complexidade. O conceito de sistema facilita a análise das estratégias dos atores, da influência do esquema global sobre cada componente e dos processos de estruturação (VEIGA; FREITAS; POCCARD-CHAPUIS, 2005).

Segundo estes autores, para poder competir no plano inter e extra setorial, os produtores devem atentar para a gestão da propriedade rural, priorizando os seguintes pontos importantes: capacitação, profissionalismo e competência administrativa e gerencial, que envolvem conhecimento dos fluxos de mercado e de comercialização, com um forte compromisso com a qualidade (matéria-prima, processos de produção, embalagem, transporte etc.).

Desde a saída do úbere da vaca até a sua dispersão nos recipientes de venda ao consumidor (etapas da cadeia produtiva), tudo que entra em contato com o leite é uma fonte de potencial contaminação microbiológica (PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997), a exemplo da etapa de ordenha onde se tem as fezes dos animais, a contaminação ambiental e humana. Nesta etapa também se pode destacar a possível presença de mastite que pode ser clínica e subclínica. A primeira é facilmente identificada, porém atenção especial deve ser dada à subclínica, de difícil identificação, podendo levar à contaminação do

leite (FAGUNDES, 2007). A higiene precária na ordenha, falhas na limpeza e sanitização de equipamentos e no sistema de refrigeração, associados ao resfriamento marginal do leite, pode resultar em problemas com bactérias psicrótróficas (PEREIRA; FONSECA, 1999), entre as quais pode se destacar a *Listeria*.

A qualidade do leite deve ser garantida durante o manejo dos animais, na ordenha de animais sadios, imediata refrigeração do leite na propriedade (ARCURI et al., 2006), no transporte a granel em tanques isotérmicos, na chegada a plataforma de recepção da indústria, no processamento na indústria, envase e distribuição.

No Brasil, em 2002, entrou em vigor a Instrução Normativa 51, que aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade de leite. Nesta instrução, dentre as diversas medidas a serem adotadas para que se tenha um leite seguro e de boa qualidade, foi implementado o resfriamento do leite cru a 4°C, em até 3 horas após a ordenha, na propriedade e o seu transporte a granel, em veículos com carrocerias providas de isolamento térmico até a indústria processadora (BRASIL, 2002). O principal objetivo dessas regulamentações é limitar o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes (CAMARGO, 2010).

Durante o armazenamento e transporte, o leite cru deve estar refrigerado, e nesta temperatura somente as bactérias psicrótróficas podem crescer, como por exemplo, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Clostridium* (SØRHOUG; STEPANIAK, 1997) e *Listeria*.

No laticínio, o leite passa pelo processo de pasteurização HTST (*high temperature short time* – alta temperatura e curto tempo) que é utilizado para minimizar possíveis riscos à saúde destruindo os micro-organismos patogênicos não esporulados e reduzindo significativamente a microbiota banal, aumentando assim, a vida de prateleira do leite e oferecendo um produto seguro ao consumidor (EVANGELISTA, 2001; FELLOWS, 2006; ORDÓÑEZ et al., 2005).

2.2 Microrganismos patogênicos contaminantes do leite

A principal preocupação para os consumidores, indústria de alimentos e o governo é sem dúvida a segurança alimentar, notadamente a segurança do ponto de vista microbiológico.

O leite é uma importante fonte de nutrientes e corre o risco de inadvertidamente sofrer contaminações durante as etapas de coleta, manuseio, processamento e transporte, incluindo os micro-organismos patogênicos. O leite recém-ordenhado de animais sadios possui baixas concentrações de micro-organismos, enquanto os obtidos de animais com mastite ou quando utilizadas práticas deficientes de manipulação, pode sofrer contaminação por uma variedade de micro-organismos patogênicos, entre eles *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Campylobacter* sp. e *Listeria monocytogenes* (DESMARCHELIER, 2001).

2.2.1 *Staphylococcus aureus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos e apresentam maior crescimento sob condições aeróbias (FRANCO; LANDGRAF, 2003). Em plaqueamento em superfície no ágar Baird-Parker, as colônias circulares pretas ou cinza escuras, com bordas perfeitas e rodeadas por uma zona opaca e um halo transparente são tidas como típicas (SILVA et al., 2007), como mostra a Figura 1.

Embora o *S. aureus* seja classificado como um micro-organismo mesófilo, algumas cepas podem se desenvolver em temperaturas de até 6,7°C. Em geral, o crescimento ocorre na faixa de temperatura de 7 a 48°C, e as enterotoxinas são produzidas entre 10 e 46°C. As temperaturas mínimas e máximas de crescimento e de produção de toxinas podem variar de acordo com outros parâmetros, como por exemplo, sais, pH e atividade de água (JAY, 2005).

Figura 1: Ágar Baird-Parker com colônias típicas de *S. aureus*. A seta indica colônias pretas circundadas por um halo de precipitação (interno) e outro transparente (externo).

Fonte: Fagundes (2007).

Apesar de no Brasil a incidência de intoxicações alimentares causadas por *S. aureus* ser desconhecida, estudos indicam que o leite cru e também produtos lácteos, possuem grande importância nos surtos em humanos (TONDO et al., 2000). Zecconi e Hahn (2000) afirmam que *S. aureus* é o micro-organismo patogênico mais frequentemente isolado no leite cru e segundo Zhang, Iandolo e Stewart (1998) é o terceiro mais comum a causar toxinfecções alimentares.

O *S. aureus* é amplamente distribuído nos rebanhos leiteiros, de forma que a probabilidade de contaminação do leite e consequente produção de enterotoxinas são bastante elevadas (FAGUNDES, 2007).

Aproximadamente um terço das cepas de *S. aureus* produzem as enterotoxinas envolvidas com surtos de intoxicação alimentar (HALPIN-DOHNALEK; MARTH, 1989). O fato das enterotoxinas serem termo resistentes é especialmente importante para a indústria de alimentos, já que a maioria dos alimentos processados sofre algum tipo de tratamento térmico durante o processamento. Por exemplo, a pasteurização do leite destruirá a bactéria, mas não inativará a toxina. A ingestão de toxinas do *S. aureus* poderá causar náuseas, vômitos, diarreia e sudorese (FRANCO; LANDGRAF, 2003; NORMANNO et al., 2007).

A capacidade de formar biofilmes é um importante fator de virulência do *S. aureus* (ABRAHAM; JEFFERSON, 2010), pois é um potencial para a

contaminação cruzada entre as superfícies de equipamentos e produtos acabados (MIDELET; CARPENTIER, 2004). Os biofilmes podem ser definidos como comunidades bacterianas estruturadas envoltas de matriz extracelular polimérica própria, aderida a superfícies bióticas ou abióticas (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999) e apresentam grande capacidade de colonização na superfície de utensílios e equipamentos, estabelecendo-se dentro de plantas de processamento, e aumentando a probabilidade de contaminação cruzada e ambiental (JEONG; FRANK, 1994).

Os alimentos normalmente relacionados às intoxicações causadas por *S. aureus* são carnes e produtos à base de carnes, frangos, produtos feito com ovos, saladas com molho, produtos de confeitaria, tortas de creme, bombas de chocolate, sanduiches, leites e derivados (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Brito et al. (1998) isolaram *S. aureus* em 26 dos 33 rebanhos de gado de leite (78,8%) em Minas Gerais e Borges et al. (2008) avaliaram a contaminação por *S. aureus* de uma linha de produção de queijo coalho e encontraram 100% das amostras de leite cru positivas para estafilococos coagulase positiva.

2.2.2 *Listeria* sp. e *Listeria monocytogenes*

Por muitos anos, o gênero *Listeria* foi monoespecífico, contendo somente a espécie *Listeria monocytogenes*. Mas depois de seguidas adições e subtrações, o gênero *Listeria* passou a ter 6 espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* (RYSER; DONNELLY, 2001).

A *L. monocytogenes* é um micro-organismo patogênico conhecido há muito tempo pela microbiologia veterinária, porém tornou-se um dos mais importantes patógenos veiculados a alimentos na década de 80, devido ao surgimento de diversos surtos de listeriose humana (FRANCO; LANDGRAF, 2003), sendo o primeiro devido ao consumo de salada de repolho contaminada em 1981, no Canadá (WARRINER; NAMVAR, 2009).

Os graves surtos que têm ocorrido nas últimas décadas, associados ao consumo de alimentos contaminados, atestam a importância sanitária de *L. monocytogenes* como um dos agentes bacterianos mais estudados nos últimos 20 anos. O surto mais recente de *L. monocytogenes* ocorreu em 2011 nos

Estados Unidos, em que houve 146 casos associados ao consumo de melões de tipo cantaloupe resultando em 30 mortes até 08 de dezembro de 2011 (CDC, 2011).

A ingestão de alimentos contaminados com *L. monocytogenes* é particularmente perigosa para recém-nascidos, causando meningite; para gestante, provocando aborto, nascimento de feto morto ou prematuro; indivíduos com síndrome de imunodeficiência adquirida; cirrose; carcinoma e outras doenças que provocam o comprometimento do sistema imunológico (FORSYTHE, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2003).

A *L. monocytogenes* é facilmente destruída na pasteurização ou na cocção dos alimentos, mas pode contaminar os produtos prontos para consumo depois de seu processamento. Lundén, Tolvanen e Korkeala (2004) e Swaminathan e Gerner-Smidt (2007) relataram casos de listeriose associados ao consumo de alimentos tais como leite cru ou pasteurizado, vegetais crus, queijos, manteiga, peixes crus ou defumados e salsichas.

No Brasil, temos poucos relatos de casos de listeriose e nunca relacionadas com alimentos, sendo a doença sub-diagnosticada e pouco notificada (DESTRO, 2006).

A *Listeria* possui a habilidade de se desenvolver em baixas temperaturas (4°C), permitindo sua multiplicação em alimentos refrigerados (MANGALASSARY et al., 2008) além de suportar repetidos congelamentos e descongelamentos (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Os alimentos podem se contaminar em qualquer etapa da cadeia produtiva e no armazenamento a frio, devido à capacidade de *L. monocytogenes* sobreviver durante períodos de tempo prolongados em diferentes meios (TORRES et al., 2005).

Luber et al. (2011) destacam que os alimentos de maior risco para aquisição da listeriose são os prontos para consumo, estocados à temperatura de refrigeração e com vida de prateleira longa. A contaminação por *L. monocytogenes* pós-processamento, em procedimentos como fatiamento ou embalagem a vácuo, também podem ocorrer, resultando na multiplicação durante a estocagem refrigerada (JOHNSON; DOYLE; CASSENS, 1990).

Além da patogenicidade, a *L. monocytogenes* é capaz de formar biofilmes (CHATURONGKASUMRIT et al., 2011), assim como o *S. aureus*.

2.3 Micro-organismos indicadores contaminantes do leite

Segundo Franco e Landgraf (2003), micro-organismos indicadores são grupos ou espécies de micro-organismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre uma provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial de um alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção e o armazenamento.

Alguns critérios devem ser levados em conta para definir um micro-organismo como indicador, por exemplo, devem ser de fácil e rápida detecção, devem estar sempre presentes quando o patógeno estiver associado, seus números devem correlacionar-se com o do patógeno, devem ser facilmente distinguíveis de outros micro-organismos da microbiota do alimento e não devem estar presentes na microbiota natural do alimento, pois assim sua detecção não indicará, necessariamente, a presença dos patógenos (DOYLE; BEUCHAT; MONTVILLE, 1997).

2.3.1 Bactérias mesófilas e psicrotróficas

A contagem de bactérias mesófilas é o método mais utilizado para se obter informações gerais sobre a qualidade microbiológica dos produtos, práticas de manufatura, matérias-primas utilizadas, condições de processamento, manipulação e vida de prateleira. Não é um indicador de segurança, pois não está intimamente ligado à presença de patógenos ou toxinas (SILVA et al., 2007), mas, considerando-se que todas as bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas, uma alta contagem desses micro-organismos significa que houve condições para que os patógenos se multiplicassem (FRANCO; LANDGRAF, 2003). Em países de clima tropical, a contagem desses micro-organismos é de extrema importância, pois possuem temperatura ótima de crescimento semelhante à temperatura ambiente desses países.

As bactérias psicrotróficas são aquelas capazes de se desenvolver em temperaturas abaixo de 7°C, independentemente da sua temperatura ótima de

crescimento (FONSECA; SANTOS, 2000), sendo os principais agentes de deterioração de leite cru refrigerado e de seus derivados. A ação deterioradora das bactérias psicrófilas se deve principalmente à produção de proteases e lipases, que hidrolisam respectivamente a proteína e a gordura do leite (FORSYTHE, 2002).

2.3.2 Coliformes totais e *Escherichia coli*

Coliforme é um grupo de bactérias encontradas no ambiente (solo, água, vegetação) e no trato intestinal de animais de sangue quente e também são indicadores da qualidade higiênico-sanitária de alimentos, são facilmente destruídos pelo calor e não devem sobreviver a tratamentos adequados. Por isso que, ao serem encontrados em alimentos pasteurizados, são indicadores de falha no processamento ou de contaminação pós-processamento (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

O grupo dos coliformes termo tolerantes, também chamado de coliformes fecais, é 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 tanto no grupo de coliformes totais quanto no dos coliformes termo tolerantes. Seu habitat natural é o trato intestinal de animais de sangue quente, embora possa também ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais (SILVA et al., 2007). É uma bactéria Gram-negativa, não esporulada e anaeróbia facultativa (RAGÀS; AGUT; NONEL, 2010; FRANCO; LANDGRAF, 2003). A presença de *E. coli* em alimentos indica que este teve uma contaminação microbiana de origem fecal (PEREIRA et al., 1999). Deve-se considerar também que 5 linhagens de *E. coli* que são patogênicas para o homem e animais, sendo estas *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAggEC). A ingestão das linhagens citadas causa diarreia acompanhada de dores abdominais, febre, náuseas e vômitos (SILVA, 2004).

Os equipamentos de obtenção de leite podem ser contaminados por coliformes durante a ordenha (FORSYTHE, 2002), devido à limpeza e sanitização deficiente.

No Brasil não há padrões legais para coliformes em leite cru, somente para leite pasteurizado (BRASIL, 2002). A contagem de coliformes é um bom indicador das práticas de higiênico-sanitárias de produção de leite. Altas contagens de coliformes e outras bactérias podem ser decorrentes de ordenhas de vacas sujas, práticas higiênicas inadequadas, limpeza e sanitização inadequadas dos equipamentos ou a qualidade do ar no ambiente de ordenha (JONES, 1999; VERDIER-METZ et al., 2009).

2.4 Métodos de análise de micro-organismos patogênicos

2.4.1 Metodologias de análise

De acordo com Franco (1994), os métodos convencionais apresentam uma grande vantagem com relação aos novos métodos, pois já são utilizados há longo tempo, conferindo grande confiabilidade nas análises. Mas, por outro lado, essas análises necessitam de um longo tempo na sua execução, o volume de trabalho e o custo em termos de vidrarias, equipamentos de laboratório (autoclaves, estufas, geladeiras, etc.) e suprimentos são considerados uma desvantagem de tais métodos. O longo período para a obtenção dos resultados inviabiliza a utilização de métodos convencionais em laboratórios e indústrias de alimentos.

Os métodos convencionais de detecção de *L. monocytogenes* em alimentos utilizam principalmente a capacidade de crescer em baixas temperaturas e a resistência a vários antibióticos, como características de isolamento. A técnica de enriquecimento a frio em meios não seletivos foi inicialmente bastante usada, mas, por causa do longo tempo de refrigeração requerido, foi substituída pelo enriquecimento em meios seletivos. Esses meios geralmente são caldos nutritivos suplementados com vários agentes antimicrobianos (SILVA et al., 2007).

Nos últimos anos, diversos métodos de detecção de *L. monocytogenes* em alimentos foram desenvolvidos, sendo que os métodos *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) da *Food and Drug Administration* (FDA) (HITCHINS, 2011) e o método do *Microbiology Laboratory Guidebook* (MLG) *United States Department of Agriculture* (USDA/FSIS, 2009) são os mais amplamente

utilizados (SILVA et al., 2007).

Há vários métodos disponíveis para a contagem de *S. aureus*, com sensibilidade variável. O meio mais amplamente utilizado para contagem de *S. aureus* é o Ágar Baird-Parker (BP), que combina o telurito de potássio (0,01%), a glicina (1,2%) e o cloreto de lítio (0,5%) como agentes seletivos (SILVA et al., 2007). Existem outros métodos oficializados pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) como o “Petrifilm™ Rapid *S. aureus* Count Plate” e “Petrifilm™ StaphExpress Count Plate” (SILVA et al., 2007).

Para a contagem de *E. coli* em alimentos é recomendado o método de contagem direta em placas de Ágar Vermelho Violeta Bile (VRB), mas existem outros métodos oficializados pela AOAC que são *kits* analíticos como por exemplo o “Petrifilm Coliform Count Plate” (SILVA et al., 2007) e o Compact® Dry EC.

O Compact® Dry EC é um meio para *E. coli* e coliformes totais. O meio contém dois tipos de substratos enzimáticos cromogênicos:

- X-Gal: indicador da produção de beta galactosidase, colônias ficam vermelhas (coliformes totais) e,
- X-Gluc: indicador da produção de beta glucoronidase, colônias azuis (*E. coli*).

A *E. coli* formará colônias azuis e a soma das colônias azuis e vermelhas indica a contagem de coliformes totais.

2.4.2 Métodos rápidos moleculares de detecção de patógenos

Na tentativa de buscar métodos que sejam mais rápidos e sensíveis para a detecção de patógenos e graças aos avanços da biotecnologia, diversos métodos para detecção foram e estão sendo desenvolvidos. Ensaio rápidos que utilizam técnicas imunoquímicas, hibridização e amplificação de ácido nucléico, oferecem mais sensibilidade e especificidade do que os métodos tradicionais, além de reduzir significativamente o tempo para a obtenção dos resultados. Muitos desses métodos possuem um elevado nível de automação, facilitando a análise dos micro-organismos (NORTON, 2002).

De acordo com Fröder (2005), a tecnologia de amplificação do DNA cromossômico (reação de polimerase em cadeia – PCR) atende as exigências

acima. Este método consiste em dois *primers* específicos (pequenos fragmentos de DNA fita simples, com orientações opostas) que copiam a sequência de DNA a ser amplificada (sequência não encontrada em outros gêneros de bactérias) e, pela ação da enzima DNA polimerase, sintetizam uma cópia da região do DNA delimitada por eles. Uma única cópia do DNA alvo pode ser ampliada em torno de 10^7 vezes em 2 a 3 horas (BAILEY, 1998).

Uma das mais recentes tecnologias comerciais que se baseia na PCR é o BAX[®] System da Dupont/Qualicon, podendo ser empregado tanto para alimentos como para amostras ambientais (USER'S GUIDE, 2008).

Comparado a outros métodos alternativos, o BAX[®] apresenta vantagens que o tornam extremamente atrativo, sendo totalmente automatizado. O equipamento e seus acessórios estão apresentados no Quadro 1 e o fluxograma com as etapas de preparação das amostras até a colocação no equipamento está apresentado na Figura 2. Todos os reagentes são comercializados na forma de tabletes, incluídos em um *kit* completo (Quadro 1c) que dispensa qualquer etapa de preparação. Cada *kit* corresponde a um tipo de micro-organismo que deseja ser analisado, como por exemplo, *Listeria* sp., *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp., *E. coli* entre outros. As amostras (de alimento ou ambientais) são combinadas com uma solução de lise e tratadas termicamente, o que leva a quebra da parede celular e liberação do DNA. Os reagentes necessários para a PCR e mais o corante fluorescente "SYBR[®] Green" estão peletezados e pré-distribuídos em tubos de reação (Quadro 1d), e são reidratados com a amostra lisada. Estes tubos são transferidos ao termociclador/detector, onde ocorre a amplificação do fragmento de DNA específico do micro-organismo. O DNA amplificado gera um sinal fluorescente que é interpretado pelo BAX[®]. Os resultados são, então, mostrados no monitor como símbolos positivos ou negativos (USER'S GUIDE, 2008) (Figura 3). O processo de amplificação demora aproximadamente três horas e meia e podem ser analisadas 96 amostras simultaneamente.

Quadro 1: Equipamentos e acessórios do Bax[®] System.

Equipamento e acessórios Bax [®] System	Descrição
<p>a) Termociclador, no qual a amostra com os <i>primers</i>, enzimas e nucleotídeos passam por uma sequência de reações culminando com a amplificação e detecção do DNA alvo.</p>
<p>b) Sistema Operacional que acompanha todo o processo da amplificação, registra os dados e apresenta o resultado final.</p>
<p>c) Kit de análise para <i>Listeria</i> sp. contendo 2 frascos de solução tampão + 1 frasco de agente de lise 1 + 1 frasco de agente de lise 2 + 1 frasco de protease + 96 tubos com os <i>primers</i> + 96 tampas ópticas.</p>
<p>d) Tubo eppendorf com o tablete contendo os <i>primers</i>, nucleotídeos, enzima Taq DNA polimerase e corante SYBR[®] GREEN.</p>
<p>e) Placas de verificação para calibração do equipamento, baseadas na frequência de cada cor.</p>

Fonte: Adaptado de Kushida (2005).

Figura 2: Etapas de análise no Bax[®] System.

Figura 3: Interpretação dos resultados do Bax[®] System.
Fonte: Adaptado de Kushida (2005).

2.5 Programas de qualidade

A Instrução Normativa nº 51 (BRASIL, 2002) foi uma maneira do governo brasileiro impor melhorias na qualidade do leite aprovando regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade dos leites tipo A, B, pasteurizado, cru refrigerado e regulamentando a coleta de leite. Essas melhorias foram impostas de forma gradual para a adequação dos produtores e do laticínio, como mostra a Tabela 1. Em virtude da dificuldade e do não cumprimento da maioria dos produtores de leite, a IN 51 foi prorrogada por mais 6 meses (BRASIL, 2011a), ou seja, os valores que inicialmente seriam válidos a partir de julho de 2011 para os Estados da região Sul, Sudeste e Centro-Oeste, passariam a valer a partir de 1º de janeiro de 2012. Mas, em 29 de dezembro de 2011, foi sancionada a Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2011b), que adia mais uma vez a IN 51, e os novos prazos e valores estabelecidos estão descritos na Tabela 2, não havendo agora diferença entre o leite de mistura dos produtores e leite individual, como havia na IN 51. Sbrissia (2005) afirma que o produtor de leite brasileiro tem sido pouco incentivado a produzir leite com qualidade.

A longo prazo, o objetivo da IN 51 é acabar com a diferenciação dos diversos tipos de leite e ter somente um único tipo e este terá um padrão internacional de qualidade (COSTA, 2005).

Tabela 1: Requisitos microbiológicos, contagem de células somáticas e resíduos químicos em leite cru refrigerado.

Método de Análise	(1)	(2)	(3)
Contagem padrão em placas (UFC/mL)	$\leq 1,0 \times 10^6$	$\leq 7,5 \times 10^5$	$\leq 1,0 \times 10^{5*}$ $\leq 3,0 \times 10^{5**}$
Contagem de células somáticas (CCS/mL)	$\leq 1,0 \times 10^6$	$\leq 7,5 \times 10^5$	$\leq 4,0 \times 10^5$
Resíduos de drogas equivalentes em antibióticos de grupo β -Lactam	$< 0,05 \text{ UI/mL}$	$< 0,05 \text{ UI/mL}$	$< 0,05 \text{ UI/mL}$

(1) De 01/07/2005 até 01/07/2008 regiões: S/SE/CO. De 01/07/2007 até 01/07/2010 regiões: N/NE; (2) A partir de 01/07/2008 até 01/07/2011 regiões: S/SE/CO. A partir de 01/07/2010 até 01/07/2012 regiões: N/NE; (3) A partir de **01/01/2012** regiões: S/SE/CO. A partir de 01/07/2012 regiões: N/NE; * leite individual do produtor; ** leite de mistura dos produtores.
Fonte: BRASIL (2002) e BRASIL (2011a).

Tabela 2: Requisitos microbiológicos e contagem de células somáticas em leite cru refrigerado.

Método de Análise	(1)	(2)	(3)	(4)
Contagem padrão em placas (UFC/mL)	$\leq 7,5 \times 10^5$	$\leq 6,0 \times 10^5$	$\leq 3,0 \times 10^5$	$\leq 1,0 \times 10^5$
Contagem de células somáticas (CCS/mL)	$\leq 7,5 \times 10^5$	$\leq 6,0 \times 10^5$	$\leq 5,0 \times 10^5$	$\leq 4,0 \times 10^5$

(1) De 01/07/2008 até 31/12/2011 regiões: S/SE/CO. De 01/07/2010 até 31/12/2012 regiões: N/NE; (2) A partir de 01/01/2012 até 30/06/2014 regiões: S/SE/CO. A partir de 01/01/2013 até 30/06/2015 regiões: N/NE; (3) A partir de 01/07/2014 até 30/06/2016 regiões: S/SE/CO. A partir de 01/07/2015 até 30/06/2017 regiões: N/NE; (4) A partir de 01/07/2016 regiões: S/SE/CO. A partir de 01/07/2017 regiões: N/NE.

Fonte: BRASIL (2011b).

Em 2009 entrou em vigor a Instrução Normativa nº 9 (BRASIL, 2009) que institui procedimentos de controle da *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo de origem animal, como por exemplo, o leite. A IN 9 prevê a colheita das amostras e inspeção no processo de produção. Caso alguma amostra seja positiva para o micro-organismo, o estabelecimento será rigorosamente inspecionado, sofrerá diversas avaliações e revisões de seus registros.

A percepção de qualidade de um alimento é resultado da interpretação de um conjunto de características, tais como as sensoriais (cor, sabor, textura, aparência), as nutricionais (composição de proteínas, vitaminas, minerais, carboidratos) e as higiênico-sanitárias (contaminação microbiana, incluindo patógenos), sendo esta última importante do ponto de vista de saúde do consumidor (SCALCO, 2004).

Para que se consiga alcançar as características desejáveis de qualidade existe a necessidade de se trabalhar com um sistema de gestão da qualidade eficiente e bem definido. Na cadeia agroalimentar a segurança alimentar, notadamente a qualidade higiênico-sanitária, é imprescindível, sendo que os principais programas de qualidade utilizados são as Boas Práticas Agrícolas (BPA), Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimentos Padrões de Higiene Operacional (PPHO), além do programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

A gestão da qualidade na cadeia de produção do leite é de suma importância, não somente para proporcionar melhoria na

qualidade do produto final, que é um ponto inquestionável, mas também no que diz respeito à melhoria nas práticas e procedimentos das atividades que compõem toda a cadeia, a fim de reduzir perdas, desperdícios e, conseqüentemente, custos (SCALCO; SOUZA, 2006).

Assim, para um controle efetivo da qualidade, deve-se conhecer o risco de perigos potenciais, para que medidas preventivas possam ser adotadas.

Franco e Landgraf (2003) afirmam que entre os vários parâmetros que determinam a qualidade de um alimento, os mais importantes são aqueles que definem as suas características microbiológicas. Portanto, do ponto de vista de saúde pública a qualidade microbiológica do leite merece destaque. Segundo Fagundes (2007), no Brasil, embora não existam estatísticas bem definidas sobre doenças associadas ao leite, são frequentes os casos associados ao leite contaminado com micro-organismos patogênicos.

Fagundes (2007) afirma ainda que a qualidade do leite *in natura* que chega à plataforma da indústria deve ser garantida através da ordenha higiênica de animais sadios e bem alimentados, imediata refrigeração do leite na propriedade e transporte a granel em tanques isotérmicos até a indústria.

Para auxiliar os pequenos produtores de leite a produzir um produto com melhor qualidade, já que na maioria das vezes eles não dispõem de recursos para compra de equipamentos de ordenha mecanizada, Moreira et al. (2007) elaboraram um manual que apresenta um *kit* de ordenha manual, onde com passos básicos e materiais não muito elaborados, o ordenhador consegue um leite de ótima qualidade.

As atividades básicas de um sistema de gestão da qualidade na agroindústria de laticínios podem ser divididas em: controle da qualidade da matéria-prima, controle da qualidade do processo, controle da qualidade do produto final, controle da qualidade no transporte e na distribuição e controle da qualidade do produto no ponto de venda (SCALCO; TOLEDO, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Monitorar e comparar a incidência de *Staphylococcus aureus*, *Listeria* sp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, coliformes totais, bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas ao longo da produção de leite pasteurizado, desde a ordenha até a obtenção do produto final.

3.2 Específicos

- Avaliar a ocorrência de *Listeria* sp. e *Listeria monocytogenes* e quantificar *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, coliformes totais, bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas no leite e no ambiente ao longo da produção de leite pasteurizado.
- Verificar a efetividade da quantificação de *E. coli* como bioindicador de patógenos.
- Utilizar os resultados obtidos nos isolamentos dos patógenos para estabelecer os pontos críticos para seu controle.
- Verificar se a presença de *Listeria* sp. é um bioindicador adequado para a possível presença de *L. monocytogenes* ao longo da produção de leite pasteurizado.
- Determinar se o comportamento dos patógenos estudados é similar nos sistemas de produção de leite tipo A e de pasteurizado.
- Utilizar os resultados obtidos para apontar ações preventivas e corretivas, utilizando as ferramentas de gestão da qualidade para controle dos patógenos na cadeia produtiva láctea.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

A pesquisa foi conduzida em 5 laticínios produtores de leite pasteurizado localizados no interior do Estado de São Paulo.

4.2 Descrição dos laticínios estudados e a produção de leite pasteurizado

Os 5 laticínios foram denominados de “A”, “B”, “C”, “D” e “E” sendo os laticínios A e B processadores de leite tipo A, os quais possuíam salas de ordenha mecanizada. Dos laticínios D e E, processadores de leite pasteurizado padronizado, foram visitadas além da planta de processamento, duas fazendas produtoras de leite, para que as amostras fossem coletadas também do ambiente de ordenha. O laticínio C está situado em uma fazenda, sendo esta, a única fornecedora de leite para o laticínio. Todos os laticínios visitados, com exceção do laticínio C, são inspecionados pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF). O laticínio C está em fase de implementação de Serviço de Inspeção Municipal. O formulário de descrição aplicado aos fornecedores de leite visitados encontra-se no Apêndice A.

A Tabela 3 apresenta algumas características das propriedades fornecedoras de leite cru visitadas.

Tabela 3: Características das propriedades fornecedoras de leite cru dos laticínios

Fazendas visitadas	Tipo de ordenha	Pré e pós- <i>dipping</i>	Resfriamento do leite	Piso da sala de ordenha	Produção (L/dia)
A	Mecanizada	Sim	Tanque de expansão	Com calçamento	40.000
B	Mecanizada	Sim	Tanque de expansão	Com calçamento	2.000
C	Mecanizada	Sim	Tanque de expansão	Com calçamento	250
Produtor D ₁	Mecanizada	Sim	Tanque de expansão	Com calçamento	2.000
Produtor D ₂	Balde ao pé	Não	Tanque de expansão	Sem calçamento	200
Produtor E ₁	Mecanizada	Sim	Tanque de expansão	Com calçamento	8.000
Produtor E ₂	Mecanizada	?	Tanque de expansão	Sem calçamento	700

? = durante as duas visitas realizadas, não houve o acompanhamento da ordenha.

Pré-*dipping* e pós-*dipping* = higienização do teto antes e após a ordenha, respectivamente.

Nas duas visitas realizadas ao segundo produtor do laticínio E, a ordenha já havia sido realizada no momento da coleta, não podendo ser verificada a higienização dos tetos antes e depois da ordenha das vacas.

O fluxograma básico da produção de leite tipo A, com os pontos amostrados, está apresentado na Figura 4 e do leite tipo B e pasteurizado na Figura 5.

Figura 4: Representação esquemática básica do processo do leite tipo A. Pontos amostrados: (1) piso da sala de ordenha, mão do manipulador da ordenha, teteiras, leite cru antes e após refrigeração; (2) leite cru refrigerado; (3) e (4) leite pasteurizado; (5) esteiras por onde as embalagens de leite (garrafa ou saco) são transportadas até a sua embalagem secundária (caixas plásticas para sacos ou plástico termo-encolhível para garrafas), caixas plásticas; (6) piso, parede, ralos superfície interna e externa de equipamentos, mãos de manipuladores, mangueiras, portas, maçanetas e rejunte entre os azulejos da parede do laticínio, cortinas plásticas de separação de áreas; (7) piso e parede da câmara fria e estrados.

Leite tipo B e pasteurizado

Figura 5: Representação esquemática básica do processo do leite tipo B e pasteurizado. Pontos amostrados: (1) piso da sala de ordenha, mão do manipulador da ordenha, teteiras, leite cru antes e após refrigeração; (2) leite cru refrigerado e superfície interna do tanque de expansão; (3) e (4) leite cru refrigerado; (5) e (6) leite pasteurizado; (7) esteiras por onde as embalagens de leite (garrafa ou saco) são transportadas até a sua embalagem secundária (caixas plásticas para sacos ou plástico termo-encolhível para garrafas), caixas plásticas; (8) piso, parede, ralos superfície interna e externa de equipamentos, mãos de manipuladores, mangueiras, portas, maçanetas e rejunte entre os azulejos da parede do laticínio, cortinas plásticas de separação de áreas; (9) piso e parede da câmara fria e estrados.

4.3 Amostragem

Em um período de 10 meses – novembro de 2010 a setembro de 2011 – foram realizadas 2 visitas em cada laticínio. O intervalo de cada visita variou de 3 semanas a 7 meses, devido a disponibilidade dos laticínios. A Tabela 4 apresenta o período das coletas.

Tabela 4: Data das coletas realizadas nos laticínios

Laticínio	Período de coleta	
	1ª coleta	2ª coleta
A	jan/2011	mar/2011
B	nov/2010	dez/2010
C	jan/2011	abr/2011
D	nov/2010	jun/2011
E	ago/2011	set/2011

4.3.1 Leite fluido cru dos silos de armazenamento, tanques de expansão e balões de vidro

Foram colhidos, em frascos estéreis, aproximadamente 250mL de leite, diretamente das torneiras previamente higienizadas com álcool 70°GL.

4.3.2 Leite pasteurizado

Foram coletadas amostras de aproximadamente 250mL, em frascos esterilizados, diretamente da tubulação de saída do leite recém pasteurizado ou diretamente das torneiras do silo de armazenamento de leite pasteurizado, sempre higienizado previamente com álcool 70°GL.

4.3.3 Amostras ambientais

As áreas de ordenha e de processamento dos laticínios foram analisadas antes do início de cada coleta para que os pontos a serem amostrados fossem escolhidos. As amostras foram coletadas dos seguintes pontos: ralos (da câmara fria e a área de processamento), pisos (da área de processamento, da câmara fria e das salas de ordenha), paredes (área de

processamento e câmara fria), portas (de entrada pra área de processamento e de entrada pra câmara fria), equipamentos (superfície interna e externa), esteiras de transporte do leite já envasado (superfície inferior e superior), mãos de manipuladores (da área de processamento e da ordenha), teteiras, rejunte entre os azulejos da parede da área de processamento e estrados na área de produção.

As amostras de pisos, paredes, portas e superfície de equipamentos foram coletadas com esponjas em uma área delimitada por um molde estéril de arame com 100cm^2 de área (Figura 6), em 10 pontos, totalizando uma área de $0,1\text{m}^2$ de superfície amostrada. As esponjas estavam previamente umedecidas com 10mL de caldo Letheen. Já para as superfícies como mãos de manipuladores, ralos, rejuntos, esteiras de transporte do leite envasado, foram utilizados *swabs* umedecido em 1mL de caldo Letheen (Figura 7).

Figura 6: Coleta de amostras de (A) parede do laticínio e (B) piso do laticínio.

As amostras foram acondicionadas em recipientes isotérmicos com gelo e transportadas até o Laboratório de Bioprocessos/FZEA/USP para imediata realização das análises. As amostras não foram congeladas para que não houvesse interferência nos resultados.

Figura 7: Coleta das amostras de (A) estrados no piso do laticínio, (B) rejunte entre azulejos da parede do laticínio, (C) mãos de manipuladores e (D) teteiras.

4.4 Análises laboratoriais

4.4.1 Preparação das diluições para *S. aureus*, *E. coli*, mesófilos, psicrótróficos e coliformes totais

As amostras de leite (25mL) foram diluídas em 225mL de Água Peptonada Tamponada (APT) estéril. A partir destas, foram realizadas diluições decimais seriadas em 9mL de APT até 10^{-3} .

No laboratório, *swab* e líquido foram homogeneizados em *vortex*, o *swab* foi retirado do tubo com o auxílio de uma pinça higienizada com álcool 70°GL e flambada, e o volume completado para 10mL com APT. Já para as amostras de superfície onde foi feito o esponjeamento, à esponja (com os 10mL de caldo Letheen) foram adicionados 90mL de APT e em seguida homogeneizados em *stomacher* por 1 minuto e 30 segundos.

4.4.1.1 Quantificação de *Escherichia coli* e Coliformes Totais

O método de análise utilizado foi a inoculação em placas com meio cromogênico Compact® Dry EC (Nissui Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan), com procedimentos realizados de acordo com a recomendação do fabricante (AOAC, 2004).

1mL de cada diluição selecionada foi adicionada no centro de uma placa de Compact® Dry EC e incubada a 35°C por 24 horas. As colônias vermelhas (características do grupo coliforme) e azuis (características de *E. coli*) foram contadas separadamente. A soma das colônias azuis e vermelhas, multiplicada pela recíproca diluição utilizada, representa o grupo de coliformes totais e os resultados foram expressos em log UFC/mL para o leite e log UFC/100cm² para as amostras de superfície (tanto para *swab* quanto para a esponja). A soma das colônias azuis, que representa o grupo de *E. coli*, multiplicada pela recíproca diluição, teve o resultado expresso como log UFC/mL para o leite ou log UFC/100cm² para as superfícies.

4.4.1.2 Quantificação de *Staphylococcus aureus*

As amostras foram inoculadas por plaqueamento em superfície em placas contendo Ágar Baird-Parker (BP) enriquecido com gema de ovo e telurito de potássio, previamente preparadas e secas. Foram selecionadas diluições até 10⁻³ e inoculadas (0,1mL) em duplicata, com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas invertidas a 35°C por 48h. Dado o tempo de incubação, foram contadas as colônias típicas de estafilococos coagulase positiva (colônias pretas com halo precipitado e transparente) e o resultado expresso como log UFC/mL para amostra de leite e log UFC/100cm² para amostra de superfície. Para a confirmação, 3 colônias típicas e 3 atípicas de cada amostra foram selecionadas e transferidas para tubos contendo caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) para enriquecimento e uma alçada do caldo com as células foi transferida para tubo contendo Ágar Trypticase de Soja (TSA) inclinado para manutenção e ambos foram incubados a 35°C por 24 horas. As colônias enriquecidas em BHI foram submetidas às provas de confirmação coagulase, catalase e termonuclease (SILVA et al., 2007).

4.4.1.3 Quantificação de aeróbios mesófilos e aeróbios psicrotróficos

As amostras foram inoculadas por plaqueamento em superfície em placas contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA) previamente preparadas e secas. Foram selecionadas diluições até 10^{-3} e inoculadas (0,1mL) em duplicata, com o auxílio de uma alça de Drigalski. Para micro-organismos aeróbios mesófilos o período de incubação foi de 48 horas a 35°C e para aeróbios psicrotróficos, 10 dias a 7°C.

Dado o tempo de incubação, as colônias foram contadas e o resultado expresso em log UFC/mL para amostra de leite e log UFC/100cm² para amostra de superfície de ambos os micro-organismos.

4.4.1.4 Detecção de *Listeria* sp. e *Listeria monocytogenes*

Para verificar a presença de *Listeria* sp. e *Listeria monocytogenes* nas amostras coletadas foi utilizado o método rápido BAX[®] System da Du Pont. Os resultados são qualitativos (presença/ausência) e os procedimentos realizados de acordo com orientações do fabricante (USER'S GUIDE, 2008).

Foi utilizado o protocolo 24E, que prevê somente um pré-enriquecimento para a *Listeria* sp. em caldo 24LEB e seu suplemento antibiótico, com incubação por 24 horas a 37°C. Os *swabs* mais caldo Letheen (1mL) foram homogeneizados em *vortex*, em seguida os *swabs* foram retirados dos tubos e o volume completado para 10mL com o caldo 24LEB. As esponjas umedecidas foram completadas para 100mL com caldo 24LEB e homogeneizadas em *stomacher* durante 1 minuto e 30 segundos. Para a análise do leite, amostras de 25mL foram diluídas em 225mL do caldo de cultivo (24LEB). O resultado do equipamento é disponibilizado como presença/ausência de *Listeria* sp. ou de *Listeria monocytogenes*.

Todas as amostras positivas no BAX[®] System para *Listeria* sp. foram analisadas novamente no equipamento para verificar se eram positivas para *Listeria monocytogenes*.

4.5 Análise de dados

Para verificar se houve diferença significativa entre as duas coletas realizadas em cada laticínio, fez-se o teste “T” ao nível de 5% de significância. E para analisar se a *Listeria* sp. pode ser considerada um bioindicador para *L. monocytogenes* fez-se o teste Qui-Quadrado ao nível de 5% de significância.

Foi utilizado o teste “T” ao nível de 5% de significância para analisar se havia diferença com relação à quantidade de *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria* sp. e *L. monocytogenes* encontrada nos laticínios processadores de leite tipo A e pasteurizado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características dos laticínios amostrados

Na Tabela 5 estão apresentadas algumas características dos laticínios (instalações e processamento) com base no questionário aplicado, disponível no Apêndice B.

Tabela 5: Características das instalações e do processamento dos 5 laticínios.

Características	Laticínio				
	A	B	C	D	E
Número de fazendas fornecedoras de leite	1	1	1	300	9
Volume de leite processado/dia (litros)	40.000	2.000	250	80.000	70.000
Número de funcionários	12	6	4	95	140
Tipo de serviço de inspeção	SIF*	SIF	-	SIF	SIF
Área externa do laticínio totalmente calçada	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Lavador de botas na entrada do laticínio	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Utilização de pedilúvio na entrada do laticínio	Não	Não	Não	Sim	Não
Programa APPCC**	Sim	Sim	Não	***	***

* Serviço de Inspeção Federal; ** Análises de Perigo e Pontos Críticos de Controle; *** em fase de implementação; - não possui serviço de inspeção.

5.2 Incidência de micro-organismos patogênicos e indicadores

Foram analisadas 236 amostras no total, sendo 36 amostras de leite (cru e pasteurizado) e 200 amostras ambientais, das quais 162 eram provenientes de superfícies que não tinham contato com o leite (ex.: piso, parede, ralos, estrados sobre o piso, esteiras de transporte das garrafas ou sacos de leite, mãos de manipuladores, rejunte entre os azulejos da parede, portas, maçanetas e superfície externa de equipamentos), e 38 eram de superfícies com contato com o leite (teteiras, latões, superfície interna de mangueiras e de tanques de expansão). Os quadros com a contagem dos micro-organismos e os pontos amostrados de cada coleta nos 5 laticínios encontram-se nos Apêndices de C a M.

Como mostra a Tabela 6, das 236 amostras analisadas, 26 (11,0%) foram positivas para *Listeria* sp. e dessas, 10 (4,2%) foram positivas para *L.*

monocytogenes, sendo 5/36 (13,9%) amostras de leite positivas somente para *Listeria* sp., 1/38 (2,6%) amostras que possuem superfície de contato com o leite foram positivas para *Listeria* sp. e 20/162 (13,3%) amostras que não possuem superfície de contato foram positivas para *Listeria* sp. e 10/162 (6,2%) foram positivas para *L. monocytogenes*. Nenhuma amostra de leite pasteurizado estava contaminada por estes micro-organismos.

Tabela 6: Ocorrência de *Listeria* sp. e *L. monocytogenes* nas amostras coletadas nos 5 laticínios do Estado de São Paulo

Espécie	Número (%)					Total (N=236)
	Laticínio A (N=50)	Laticínio B (N=44)	Laticínio C (N=46)	Laticínio D (N=50)	Laticínio E (N=46)	
<i>Listeria</i> sp.	12 (24,0%)	1 (2,3%)	3 (6,5%)	3 (6,0%)	7 (15,2%)	26 (11,0%)
<i>L. monocytogenes</i>	3 (6,0%)	0 (0,0%)	3 (6,5%)	0 (0,0%)	4 (8,7%)	10 (4,2%)

N= número de amostras analisadas, %=porcentagem.

A tela de resposta do equipamento BAX[®] System da Dupont/Qualicon, o qual indica a presença ou ausência do micro-organismo a ser analisado, é mostrada na Figura 8. O símbolo em verde com um sinal negativo ao centro indica ausência do micro-organismo na amostra e o símbolo vermelho com o sinal positivo indica presença. Nas amostras em que houve erro de sinal (símbolo amarelo com um ponto de interrogação no interior e uma listra vermelha), a análise foi repetida para que este erro fosse eliminado.

Figura 8: Tela de resposta do Bax® System para *Listeria* sp. (A) Pico obtido para o primer de *Listeria* sp. e (B) Pico da presença da bactéria *Listeria* sp.

No Brasil, há descrições de ocorrência de *L. monocytogenes* em leite cru variando de 0 a 37,8% (CAMARGO, 2010), concordando com os resultados obtidos no presente estudo, que teve ausência do micro-organismo nas 28 amostras de leite cru analisadas.

Na Espanha, das 1445 amostras de leite de cabra analisadas por Gaya et al. (1996), 4,57% estavam contaminadas com *Listeria* sp. e 2,56% com *L. monocytogenes*. Pritchard, Flanders e Donnelly (1995) encontraram 21,2% de amostras ambientais positivas (N=378) para *Listeria* sp. e 9,3% positivas para *L. monocytogenes* em 21 laticínios nos Estados Unidos. No Brasil, Barancelli (2010) isolou 15,5% de *Listeria* sp. e 7,1% de *L. monocytogenes* em amostras de leite e ambientais (N=393) em 3 laticínios no Estado de São Paulo. No Estado da Bahia, Silva et al. (2003) isolaram em 218 amostras, incluindo alimento e ambiente, 13 (6,0%) *Listeria* sp. nos dois laticínios analisados, mas somente em um foi encontrado *L. monocytogenes* (0,9%).

Com relação à *Escherichia coli*, das 236 amostras analisadas no presente trabalho, 83 (35,2%) foram positivas para *E. coli* sendo 22/36 (61,1%) amostras de leite, 19/38 (50,0%) amostras que possuem superfície de contato

com o leite e 42/162 (25,9%) amostras que não entram em contato com o leite. A Figura 9 mostra duas placas de Compact® Dry EC com colônias azuis (características de *E. coli*) e colônias vermelhas (características de coliformes totais).

Figura 9: Colônias típicas de *E. coli* (azuis) e de coliformes totais (vermelhas).

O valor para amostras de leite contaminado com *E. coli* (Tabela 11) foi condizente com dados da literatura. Camargo (2010) ao analisar 286 amostras de leite cru, encontrou 116 (59,4%) amostras contaminadas. Mhone, Matope e Saidi (2011) pesquisaram a ocorrência de *E. coli* em leite cru, encontrando 49/120 (40,8%) das amostras contaminadas e em 7/20 (35,0%) de amostras de leite pasteurizado. Catão e Ceballos (2001) encontraram todas as 6 amostras de leite pasteurizado contaminadas por *E. coli*. Duffy et al. (2009) isolaram *E. coli* em 80/298 (26,8%) amostras ambientais em 5 laticínios.

Das mesmas 236 amostras do presente estudo, 9 (3,8%) foram positivas para *S. aureus*, sendo 2/36 (5,6%) amostras de leite, 5/162 (3,1%) amostras que não entram em contato com o leite e 2/38 (5,3%) amostras que entram em contato com o leite.

A ocorrência de *S. aureus* no leite no presente estudo foi condizente com dados da literatura. Fagundes (2007) isolou 33/618 (5,3%) de *S. aureus* em amostras de leite cru. Mørk et al. (2010) encontrou *S. aureus* em 6,2% de amostras de leite de cabra cru (N=5671). De acordo com Sá et al. (2004), as taxas de isolamento no leite podem variar de 9,1 a 85,0%. Jørgensen, Mørk, e Rørvik (2005) isolaram *S. aureus* em 34,7% (N=144) das amostras de leite, de queijos e ambientais numa fazenda produtora de queijos fabricados a partir de

leite cru e Soares et al. (2011) encontram 2/50 (4%) amostras ambientais de um laticínio produtor de queijo.

As diferenças encontradas entre os valores da presente pesquisa e dos outros estudos comparativos podem ser explicados pela diferença geográfica, diferenças de metodologia, análises laboratoriais e higiene ao longo da cadeia láctea.

Os valores pra contagem de mesófilos do leite cru refrigerado deveriam atender as normas da IN 62 e ter no máximo uma contagem de $6,0 \times 10^5$ UFC/mL (5,78 log UFC/mL) e para laticínios processadores de leite tipo A (IN 51), um máximo de $1,0 \times 10^4$ UFC/mL de leite cru (4,0 log UFC/mL). Como mostra a Tabela 7, 100% das amostras de leite cru do laticínio B apresentaram valor maior que os valores estabelecidos pela legislação e no laticínio A, 50% das amostras também não estavam conformes. A Tabela 8 mostra que os laticínios D e E, processadores de leite pasteurizado, apresentaram 50% dos valores acima do previsto pela legislação e o laticínio C, 33,3% das amostras de leite não estavam dentro dos padrões da legislação.

Tabela 7: Contagem padrão em placas para laticínios processadores de leite tipo A.

Mesófilos (Log UFC/mL de leite cru)	Laticínio A N=6	Laticínio B N=4	TOTAL N=10
>2-3	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
>3-4	3 (50,0%)	0 (0,0%)	3 (30,0%)
>4*	3 (50,0%)	4 (100,0%)	7 (70,0%)

N= número de amostras de leite cru, %=porcentagem.

* Limite estabelecido pela IN 51 (BRASIL, 2002).

Tabela 8: Contagem padrão em placas para laticínios processadores de leite pasteurizado.

Mesófilos (Log UFC/mL de leite cru)	Laticínio C N=6	Laticínio D N=6	Laticínio E N=6	TOTAL N=18
>2-3	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
>3-4	2 (33,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (11,1%)
>4-5,78	2 (33,3%)	3 (50,0%)	3 (50,0%)	8 (44,4%)
>5, 78*	2 (33,3%)	3 (50,0%)	3 (50,0%)	8 (44,4%)

N= número de amostras de leite cru, %=porcentagem.

* Limite estabelecido pela IN 62 (BRASIL, 2011b).

Evancho et al. (2001) consideram que superfícies que entram em contato com o alimentos estão adequadamente limpas e sanitizadas quando não há mais de 100 UFC (2 log UFC) por utensilio ou por superfície de

equipamento amostrada. Como mostra a Tabela 9, somente 13,2% (N=38) das superfícies analisadas que entram em contato com o leite (teteiras, tanques de expansão e latões que armazenavam leite) estavam adequadamente higienizadas. Silva Jr. (2002) adota valores mais rigorosos; em superfícies de equipamentos e utensílios para preparação de alimentos o limite é de 50 UFC, e para utensílios como mesa, o máximo permitido é de 100 UFC.

Tabela 9: Contagem de mesófilos das superfícies que entram em contato com o leite.

Mesófilos (log UFC/superfície amostrada)	Laticínios					TOTAL N=38
	A N=6	B N=5	C N=13	D N=8	E N=6	
<2*	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (7,7%)	0 (0,0%)	4 (66,7%)	5 (13,2%)
>2-4	2 (33,3%)	1 (20,0%)	3 (23,1%)	1 (12,5%)	0 (0,0%)	7 (18,4%)
>4-6	1 (16,7%)	2 (40,0%)	4 (30,7%)	1 (12,5%)	2 (33,3%)	10 (26,3%)
>6	3 (50,0%)	2 (40,0%)	5 (38,5%)	6 (75,0%)	0 (0,0%)	16 (42,1%)

N= número de amostras de leite cru; %=porcentagem; * Limite aconselhado por Evancho et al. (2001).

Não há na legislação um valor de contagem de UFC para superfícies que não entram em contato com o alimento, mas é louvável que este valor seja o menor possível, evitando-se desta maneira uma possível contaminação do alimento produzido no local mal higienizado, fazendo com que o produto apresente uma vida útil reduzida. A Tabela 10 apresenta os valores da contagem de mesófilos para superfícies que não entram em contato com o leite (pisos, paredes, ralos, etc.). Como se pode observar, mais de 60% das superfícies possuem mais de 4 log UFC/superfície amostrada.

Tabela 10: Contagem de mesófilos das superfícies que não entram em contato com o leite.

Mesófilos (log UFC/superfície amostrada)	Laticínios					TOTAL N=162
	A N=36	B N=33	C N=25	D N=34	E N=34	
<2	2 (5,5%)	4 (12,1%)	2 (8,0%)	8 (23,5%)	4 (11,7%)	20 (12,3%)
>2-4	9 (25,0%)	10 (30,3%)	5 (20,0%)	9 (26,5%)	11 (32,4%)	44 (27,2%)
>4-6	10 (27,8%)	10 (30,3%)	8 (32,0%)	6 (17,6%)	8 (23,5%)	42 (25,9%)
>6	15 (41,7%)	9 (27,3%)	10 (40,0%)	11 (32,4%)	11 (32,4%)	56 (34,6%)

N= número de amostras de leite cru, %=porcentagem.

Para estabelecer se houve diferença na contagem de mesófilos em cada repetição das coletas realizadas nos laticínios, foi feito o teste “T” ao nível de

5% de significância para 3 grandes grupos: amostras de leite, superfícies que entram em contato com o leite e superfícies que não entram em contato, totalizando 15 comparações, como mostra o Quadro 2. Em nenhuma das comparações das médias houve diferença significativa, ou seja, estatisticamente, a média de mesófilos obtida na primeira coleta e na segunda, não difere entre si, podendo-se concluir que a higienização durante as duas coletas foi semelhante.

Quadro 2: Médias da contagem de mesófilos da primeira e segunda coleta realizada em cada laticínio.

Amostra (contagem de mesófilos)	Coleta	Laticínio A	Laticínio B	Laticínio C	Laticínio D	Laticínio E
Leite (log UFC/mL)	1 ^a	3,31± 0,89 ^a	4,67± 2,34	4,62± 1,87	5,49± 1,06	5,89± 0,13
	2 ^a	4,71± 2,03	4,77± 2,40	4,92± 1,59	5,57± 1,07	6,20± 1,44
¹ Superfície sem contato com o leite (log UFC/sup.)	1 ^a	5,32± 1,91	4,75± 1,87	4,69± 2,02	4,97± 2,18	4,47± 2,13
	2 ^a	5,76± 2,17	4,51± 2,01	5,83± 1,70	4,43± 2,23	5,28± 1,92
² Superfície com contato com o leite (log UFC/sup.)	1 ^a	4,50± 1,53	5,17± 1,38	5,73± 1,71	7,56± 0,50	2,03± 0,06
	2 ^a	6,45± 2,36	6,00± 1,83	4,84± 2,21	5,90± 1,76	4,05± 1,93

^a Valores expressos em média ± desvio padrão. Médias dentro de uma mesma célula não diferem entre si pelo teste “T” ao nível de 5% de significância.

¹ Sem contato: pisos, paredes, ralos, mão de manipuladores, esteiras de transporte do leite já embalado (em sacos ou em garrafas), caixas plásticas para acomodação dos sacos plásticos, superfície externa de equipamentos, maçanetas, rejunte entre os azulejos do laticínio, estrados sobre o piso do laticínio

² Com contato: teteiras, superfície interna da tanques de expansão, latões e mangueiras.

Para determinar se o comportamento dos micro-organismos patogênicos estudados é similar nos sistemas de produção de leite tipo A e pasteurizado, analisou-se 3 grandes grupos: leite (Figura 10), superfícies amostradas que não entram em contato com o leite (Figura 11) e superfícies que entram em contato com o leite (Figura 12) e em seguida foi feito o teste T, com nível de 5% de significância.

Esperava-se encontrar diferença significativa entres os 2 sistemas de produção, já que do leite tipo A exige-se uma qualidade microbiológica muito superior do que do leite pasteurizado, mas não houve diferença significativa entre os 2 sistemas.

No leite (Figura 10), por exemplo, somente a média da quantidade de *S. aureus* pôde ser considerada estatisticamente diferente pelo teste T ao nível de 5% de significância.

Figura 10: Frequências médias de amostras positivas para *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria* sp. e *L. monocytogenes* no leite, em laticínios processadores de leite tipo A (laticínios A e B) e pasteurizado (laticínios C, D e E). Barras de um mesmo micro-organismo seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste “T” ($p < 0,05$).

Com relação às superfícies que não entram em contato com o leite (Figura 11), os laticínios apresentaram valores de médias muito similares para *E. coli*, *Listeria* sp. e *L. monocytogenes*, mas nenhum dos micro-organismos apresentou diferença significativa pelo teste T ao nível de 5% de significância.

Pelo leite tipo A ser o de melhor qualidade, esperava-se que o ambiente em que ele é processado fosse o mais higienizado possível, mas não é o que se observa ao se analisar a Figura 11. Tanto os laticínios processadores de leite tipo A quanto os de leite pasteurizado apresentaram os quatro tipos de micro-organismos pesquisados nas superfícies que não entram em contato com o leite.

Figura 11: Frequências médias de amostras positivas para *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria sp.* e *L. monocytogenes* em superfícies que não entram em contato com o leite, em laticínios processadores de leite tipo A (laticínios A e B) e pasteurizado (laticínios C, D e E). Barras de um mesmo micro-organismo seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste “T” ($p < 0,05$).

A Figura 12 apresenta as médias das amostras positivas dos 4 micro-organismos em superfícies que possuem contato com o leite, como por exemplo, teteiras, latões de leite, superfície interna de mangueiras e tanques de expansão. Também não houve diferença significativa entre os laticínios processadores de leite tipo A e pasteurizado para os micro-organismos mostrado pela Figura 12, pelo teste T ao nível de 5% de significância.

Figura 12: Frequências médias de amostras positivas para *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria sp.* e *L. monocytogenes* em superfícies que entram em contato com o leite, em laticínios processadores de leite tipo A (laticínios A e B) e pasteurizado (laticínios C, D e E). Barras de um mesmo micro-organismo seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste “T” ($p < 0,05$).

As superfícies analisadas que o leite entrou em contato estavam localizadas antes do processo de pasteurização, com exceção do tanque aberto no laticínio C que armazena o leite pasteurizado para posterior envase, em que foi possível coletar a amostra da superfície interna deste tanque.

5.3 Efetividade de *E. coli* como bioindicador de patógenos

Não foram encontrados dados na literatura sobre o uso de *E. coli* como bioindicador de patógenos, somente como bioindicador de contaminação fecal. Por isso investigou-se se há alguma relação entre a quantidade de *E. coli* encontrada com a presença ou ausência de *S. aureus* e *L. monocytogenes* nas amostras de leite (Tabela 11), nas amostras que não entram em contato com o leite (Tabela 12) e amostras que possuem superfície de contato com o leite (Tabela 13).

Tabela 11: *E. coli* como bioindicador de patógenos em leite.

<i>E. coli</i> (log UFC/mL)	N = 36	<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
		+	-	+	-
<1	14	0 (0%)	14 (100%)	0 (0%)	14 (100%)
>1-2	11	1 (9,1%)	10 (90,9%)	0 (0%)	11 (100%)
>2-3	6	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	6 (100%)
>3-4	2	1 (50,0%)	1 (50,0%)	0 (0%)	2 (100%)
>4-5	1	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)
>5-6	1	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)
>6	1	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)

N=número de amostras analisadas, + = número de amostras positivas, - = número de amostras negativas e %=porcentagem.

Tabela 12: *E. coli* como bioindicador de patógenos em superfícies que não entram em contato com o leite.

<i>E. coli</i> (log UFC/superfície)	N=162	<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
		+	-	+	-
<1	120	4 (3,3%)	116 (96,7%)	3 (2,5%)	117 (97,5%)
>1-2	4	0 (0,0%)	4 (100%)	1 (25,0%)	3 (75,0%)
>2-3	10	0 (0,0%)	10 (100%)	0 (0,0%)	10 (100%)
>3-4	9	0 (0,0%)	9 (100%)	1 (11,1%)	8 (88,9%)
>4-5	8	1 (12,5%)	7 (87,5%)	1 (12,5%)	7 (87,5%)
>5-6	3	0 (0,0%)	3 (100%)	0 (0,0%)	3 (100%)
>6	8	0 (0,0%)	8 (100%)	4 (50,0%)	4 (50,0%)

N=número de amostras analisadas, + = número de amostras positivas, - = número de amostras negativas e %=porcentagem.

Tabela 13: *E. coli* como bioindicador de patógenos em superfícies que entram em contato com o leite.

<i>E. coli</i> (log UFC/superfície)	N=38	<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
		+	-	+	-
<1	19	0 (0,0%)	19 (100%)	0 (0,0%)	19 (100%)
>1-2	2	0 (0,0%)	2 (100%)	0 (0,0%)	2 (100%)
>2-3	6	1 (16,7%)	5 (83,3%)	0 (0,0%)	6 (100%)
>3-4	7	1 (14,3%)	6 (85,7%)	0 (0,0%)	7 (100%)
>4-5	3	0 (0,0%)	3 (100%)	0 (0,0%)	3 (100%)
>5-6	0	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
>6	1	0 (0,0%)	1 (100%)	0 (0,0%)	1 (100%)

N=número de amostras analisadas, + = número de amostras positivas, - = número de amostras negativas e %=porcentagem.

O histograma da Figura 13 apresenta a frequência de *L. monocytogenes* dentro de cada intervalo estabelecido de contagem de *E. coli* (<1, >2-3, >3-4, >4-5, >5-6, >6 log UFC/superfície). A *L. monocytogenes* foi encontrada somente em amostras de superfície que não entram em contato com o leite, representadas pelas barras na cor rosa. Pode-se observar um comportamento quadrático da quantidade de *L. monocytogenes* através da linha de tendência traçada. Quando não há a presença de *E. coli* na amostra (intervalo <1 log UFC/superfície), encontrou-se uma grande quantidade proporcional de *L. monocytogenes*, o que pode indicar a formação de biofilmes deste patógeno nos locais analisados, pois em biofilme a bactéria é mais resistente a condições de estresse e a sanitizantes (PAN; BREIDT JR; KATHARIOU, 2006). O maior número proporcional de *L. monocytogenes* foi encontrado quando a quantidade de *E. coli* no meio estava muito elevada (>6 log UFC/superfície), concluindo-se que no meio havia substrato suficiente para que as duas bactérias se desenvolvessem, e que em contagens intermediárias de *E. coli* (de >1 até 6 log UFC/superfície) há uma competição entre estes 2 micro-organismos fazendo com que não haja grande desenvolvimento da *Listeria monocytogenes*. Mellefont, McMeekin e Ross (2008) estudaram a interação de *L. monocytogenes* com *E. coli* em diferentes níveis de concentração (nível alto $\approx$ 6 log UFC/mL, nível igual $\approx$ 4 log UFC/mL e nível baixo $\approx$ 3 log UFC/mL). As comparações de crescimento foram entre nível alto de *L. monocytogenes* com baixo de *E. coli*, com as duas bactérias em nível igual e com nível alto de *E. coli* e baixo de *L. monocytogenes*. Esses autores concluíram que nenhum nível de *L. monocytogenes* afetou o crescimento de *E. coli* e supuseram que os

substratos necessários para este crescimento não se esgotaram. Em estudo realizado por Catão e Ceballos (2001) a *Listeria* sp. esteve presente em 73,3% das amostras de leite cru, sendo que 51,5% foram identificadas como *Listeria monocytogenes*. Os leites com presença de *Listeria* sp. também apresentaram elevados níveis de contaminação fecal.

Figura 13: Histograma da frequência de *L. monocytogenes* em diferentes intervalos de contagem de *E. coli*.

O histograma de frequência de *S. aureus* dentro de intervalo estabelecidos de *E. coli* (<1, >2-3, >3-4, >4-5, >5-6, >6 log UFC/superfície ou mL) está apresentado na Figura 14. Em todos os tipos de amostras (leite, superfícies que não entram em contato com o leite e superfícies que entram em contato) houve o isolamento de *S. aureus*. No presente estudo, a presença de *S. aureus* possuiu comportamento quadrático e pode-se supor que acima de 5 log UFC *E. coli*/superfície ou mL não se detecta *S. aureus*, isso leva a suposição de uma possível competição entre os micro-organismos, sendo o *S. aureus* um mal competidor (DALY et al., 1973), ou seja, quanto maior a quantidade de *E. coli* encontrada, menor a detecção de *S. aureus*. De acordo com Geisen, Lücke e Kröckel (1992), a competição por nutrientes acontece quando uma quantidade limitada é importante para o desenvolvimento de 2 ou mais competidores, então, o micro-organismo capaz de se desenvolver mais rapidamente (mais adaptado ao substrato), prevalecerá. Powell et al. (2006) afirmam que são escassos dados experimentais sobre o crescimento de patógenos em condições competitivas e sugere mais estudos sobre a

interferência de populações microbianas mistas no crescimento dos micro-organismos patogênicos. Quando a superfície sem contato com o leite não apresentava a presença de *E. coli*, houve uma grande quantidade de *S. aureus* isolada do ambiente (quase 50% da quantidade total de *S. aureus*) indicando uma possível formação de biofilme nesses locais analisados, já que o *S. aureus* tem a capacidade de formar biofilmes (MARTÍ et al., 2010).

Figura 14: Histograma da frequência de *S. aureus* em diferentes intervalos de contagem de *E. coli*.

5.4 *Listeria* sp. como bioindicador de *L. monocytogenes*

Em um estudo realizado entre 1990 e 1991 por Tompkin et al. (1992), 18 mil amostras ambientais de 12 fábricas processadoras de alimentos prontos para consumo de carne e frango, foram analisadas para a presença de *Listeria* sp. e *L. monocytogenes*. Os autores encontraram 2101 amostras positivas para *Listeria* sp. e mais de 870 positivas para *L. monocytogenes*, mas o percentual de amostras positivas para *Listeria monocytogenes* em relação a positivas para *Listeria* sp. variou consideravelmente entre as plantas de processamento, de 5% até 96%, não sendo um consenso na opinião de Tompkin (2002) considerar a *Listeria* sp. como indicador de *L. monocytogenes*.

D'amico e Donnelly (2009), analisaram 236 amostras ambientais de pequenas fábricas processadoras de queijo, sendo que 86 amostras tinham

superfície de contato com o alimento e 150 não tinham nenhum contato. 25 (10,6%) das amostras analisadas foram positivas para *Listeria* sp. e 12 (5,1%) para *L. monocytogenes* e eles afirmam que a presença de *Listeria* sp. pode servir de indicador para uma possível presença de *L. monocytogenes*.

Das 236 amostras, 210 (89,0%) foram negativas para *Listeria* sp. e 26 (11,0%) positivas. Como mostra o Quadro 3, das 26 amostras positivas para *Listeria* sp., 10 (4,2%) foram positivas para *L. monocytogenes*. Ao se fazer uma análise para saber qual a probabilidade de a *Listeria* sp. encontrada ser *L. monocytogenes* e aplicando-se o teste Qui-Quadrado, ao nível de 5% de significância, obteve-se que a chance de se encontrar *L. monocytogenes* através da análise de *Listeria* sp. de era de 50%, um valor relativamente baixo, não sendo aconselhável utilizar a *Listeria* sp. como um bioindicador para *L. monocytogenes*.

Quadro 3: Quantidade de amostras positivas para *Listeria* sp. e *L. monocytogenes*.

<i>Listeria</i> sp. <i>L. monocytogenes</i>	+
+	10 (4,2%)
-	16 (6,8%)

5.5 Análise dos pontos críticos de controle

Os fluxogramas básicos do processamento de leite dos 5 laticínios, com os pontos críticos de controle microbiológicos e os pontos coletados, estão apresentados da Figura 15 até a Figura 19, e os pontos contaminados por micro-organismos patogênicos em cada laticínio estão especificados do Quadro 4 ao Quadro 8.

Figura 15: Fluxograma de processamento do laticínio A. (1) leite cru sem refrigeração, mão do manipulador da ordenha, piso da sala de ordenha, teteiras; (2) leite cru refrigerado; (3) leite pasteurizado; (4) superfície superior e inferior da esteira que transporta as garrafas com leite; (5) esteira em que as garrafas são embaladas em fardos por plástico termo-encolhível; (6) caixas plásticas onde o leite em saco é armazenado; (7) piso e parede; (8) estrados no piso do laticínio, piso, parede, rejunte entre os azulejos da parede, cortina plástica que separa a área de envase da antecâmara, latão onde o leite, com problema na embalagem, é colocado para ser reprocessado, ralo, mão de manipuladores. PCC 1 = contaminação cruzada entre leite pasteurizado e leite cru e falhas no binômio tempo X temperatura; PCC 2 e PCC 3 = embalagem contaminada contaminará o leite.

Quadro 4: Micro-organismos patogênicos encontrados nos pontos coletados no laticínio A.

Ponto coletado	Figura 15	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>Listeria</i> sp.		<i>L. monocytogenes</i>	
		1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª
Leite do silo externo ao laticínio com leite refrigerado	(2)		+			+	+		
Leite cru antes do pasteurizador no laticínio	(2)	+	+			+	+		
Caixa plástica onde os sacos de leite são acomodados para transporte	(6)						+		
Mão do manipulador 1 da ordenha	(1)	+	+						
Mão do manipulador 2 do laticínio	(8)			+		+			
Teteira 2	(1)	+							
Ralo do laticínio	(8)		+			+	+		
Piso do laticínio	(8)			+		+		+	
Piso da câmara fria	(7)	+	+	+		+	+	+	+
Embaixo da esteira de envase das garrafas	(4)		+						
Esteira em que as garrafas são unidas em fardos	(5)		+						
Latão (onde o leite durante o envase é descartado por falha na embalagem)	(8)		+				+

Figura 16: Fluxograma de processamento do laticínio B. (1) piso da sala de ordenha, teteiras; (2) leite cru refrigerado; (3) leite pasteurizado; (4) caixas plásticas onde o leite em saco é armazenado; (5) piso, parede, estrados no piso da câmara fria e superfície externa da embalagem do saco de leite; (6) maçanetas das portas no laticínio, piso, parede, rejunte entre os azulejos da parede, ralos e mãos de manipuladores; (7) piso e parede. PCC 1 = contaminação cruzada entre leite pasteurizado e leite cru e falhas no binômio tempo X temperatura; PCC 2 = embalagem contaminada contaminará o leite.

Quadro 5: Micro-organismos patogênicos encontrados nos pontos coletados no laticínio B.

Ponto coletado	Figura 16	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>Listeria sp.</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
		1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª
Leite cru refrigerado estocado em tanque de expansão durante o final de semana para processamento na segunda-feira	(2)	+	+						
Leite cru refrigerado (logo após ordenha)	(2)	+	+						
Mão do manipulador 1 do laticínio	(6)	+							
Teteira 1	(1)	+	+	+					
Teteira 2	(1)	+	+						
Teteira 3	(1)	+							
Piso da ordenha	(1)	+	+			+			
Piso do laticínio	(6)	+							
Caixa plástica onde os sacos de leite são acomodados para transporte	(4)		+						
Ralo na entrada da câmara fria	(6)		+						
Piso da câmara fria	(5)		+						
Piso da sala de tanques de expansão no laticínio	(7)		+

Figura 17: Fluxograma de processamento do laticínio C. (1) leite cru sem refrigeração, piso da sala de ordenha, teteiras e mão do manipulador; (2) leite cru refrigerado e superfície interna do tanque de expansão; (3) superfície interna do tanque isotérmico de transporte; (4) superfície interna do tanque encamisado e leite cru refrigerado; (5) superfície interna do tanque encamisado e leite pasteurizado; (6) caixas plásticas onde o leite em saco é armazenado; (7) piso, parede e maçaneta da porta; (8) piso, parede, porta, rejunte entre os azulejos da parede, ralos, superfície externa dos equipamentos e mãos de manipuladores. PCC 1 = contaminação cruzada entre leite pasteurizado e leite cru e falhas no binômio tempo X temperatura; PCC 2 = superfície interna do tanque encamisado; PCC 3 = embalagem contaminada contaminará o leite.

Quadro 6: Micro-organismos patogênicos encontrados nos pontos coletados no laticínio C.

Ponto coletado	Figura 17	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>Listeria sp.</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
		1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª
Leite cru sem refrigeração (logo após ordenha)	(1)	+	+						
Leite cru refrigerado estocado em tanque de expansão durante o final de semana para processamento na segunda-feira	(2)	+	+						
Leite pasteurizado	(5)		+						
Tanque com leite cru refrigerado no laticínio	(4)	+							
Latão onde o leite foi transportado ao laticínio	(3)	+							
Mão do manipulador da ordenha	(1)	+	+						
Teteira 1	(1)		+						
Teteira 2	(1)	+	+						
Piso da câmara fria	(7)	+	+			+	+	+	+
Piso da ordenha	(1)	+	+			+			
Parede da câmara fria	(7)					+	+	+	+

Figura 18: Fluxograma de processamento do laticínio D. (1) piso da sala de ordenha, teteiras e mão do manipulador; (2) leite cru refrigerado; (3) piso da sala de ordenha e teteiras; (4) leite cru refrigerado; (5) leite cru refrigerado; (6) leite pasteurizado; (7) superfície superior da esteira que transporta os sacos de leites; (8) piso, parede, ralo e porta; (9) piso, parede, porta, rejunte entre os azulejos da parede, ralos, superfície externa dos equipamentos e mãos de manipuladores. PCC 1 = contaminação cruzada entre leite pasteurizado e leite cru e falhas no binômio tempo X temperatura; PCC 2 = embalagem contaminada contaminará o leite.

Quadro 7: Micro-organismos patogênicos encontrados nos pontos coletados no laticínio D.

Ponto coletado	Figura 18	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>Listeria sp.</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
		1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Leite cru do tanque de expansão do produtor D ₁	(2)	+							
Leite cru do tanque de expansão do produtor D ₂	(4)	+							
Leite cru do silo de armazenamento no laticínio	(5)	+	+	+	+	+			
Mão do manipulador da ordenha (Produtor D ₁)	(1)	+	+						
Teteira 1 (Produtor D ₁)	(1)	+	+						
Teteira 2 (Produtor D ₁)	(1)	+	+						
Mão do manipulador da ordenha (Produtor D ₂)	(3)		+						
Teteira (Produtor D ₂)	(3)	+	+						
Piso do laticínio	(9)	+							
Piso da ordenha (Produtor D ₁)	(1)		+						
Piso da ordenha (Produtor D ₂)	(3)	+	+						
Latão da ordenha "balde ao pé" (Produtor D ₂)	(3)	+							
Piso da ordenha (Produtor D ₁)	(1)	+				+			
Porta de entrada do laticínio	(9)	+				+			

Devido a alta demanda de iogurte no laticínio E durante o período das coletas, não foi possível coletar amostras de leite pasteurizado, pois a pasteurização do leite era feita juntamente com açúcares e estabilizantes para o processo de produção do iogurte, como mostra a Figura 19.

Figura 19: Fluxograma de processamento do laticínio E. (1) piso da sala de ordenha, teteiras e mão do manipulador; (2) leite cru refrigerado; (3) piso da sala de ordenha e teteiras; (4) leite cru refrigerado; (5) leite cru refrigerado; (6) piso, parede e porta; (7) piso, parede, porta, rejunte entre os azulejos da parede, ralos, superfície externa dos equipamentos, estrados no piso do laticínio, esteira de envase das garrafas de leite (superfície superior e inferior) e mãos de manipuladores. PCC 1 = contaminação cruzada entre leite pasteurizado e leite cru e falhas no binômio tempo X temperatura.

Quadro 8: Micro-organismos patogênicos encontrados nos pontos coletados no laticínio E.

Ponto coletado	Figura 19	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>Listeria</i> sp.		<i>L. monocytogenes</i>	
		1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Leite cru do tanque de expansão do produtor E ₁	(2)	+	+						
Leite cru do tanque de expansão do produtor E ₂	(4)	+	+						
Leite cru do silo de armazenamento no laticínio	(5)	+							
Mão do manipulador 2 do laticínio	(3)			+					
Ralo do laticínio	(7)					+	+		+
Equipamentos do laticínio (superfície externa)	(7)					+		+	
Piso da câmara fria	(6)	+							
Parede do laticínio	(7)		+			+	+		+
Piso do laticínio	(7)					+		+	
Piso da ordenha (Produtor E ₁)	(1)								
Piso da ordenha (Produtor E ₂)	(3)	+							
Mão do manipulador da ordenha (Produtor E ₁)	(1)		+						
Teteira 1 (Produtor E ₁)	(1)		+		+				
Embaixo da esteira de envase das garrafas	(7)		+						
Estrados no laticínio	(7)		+						
Piso da câmara fria	(6)		+				+		

Analisando os fluxogramas do processo dos laticínios (Figuras 15 a 19), fez-se um rastreamento de micro-organismos considerados importantes para a indústria de leite e seus derivados, em pontos estratégicos ao longo da cadeia produtiva do leite pasteurizado para que se pudessem identificar pontos que merecessem maior atenção.

Através da Árvore Decisória (Anexo 1) pôde-se estabelecer quais são os pontos críticos de controle (PCC's) de cada laticínio, e estes pontos estão apresentados nas Figuras de 15 a 19. Um dos pontos considerados como crítico de controle foi a pasteurização. Para que o leite seja pasteurizado adequadamente é fundamental que se tenha um registro constante do binômio tempo X temperatura. Apesar das bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* serem facilmente destruídas pela pasteurização, o *S. aureus* é capaz de produzir toxinas, que não são destruídas pela pasteurização, e assim como a *L. monocytogenes*, também é capaz de formar biofilme. Uma forma simples e eficaz de controlar a pasteurização é a utilização do Controle Estatístico do Processo (CEP), que tem por objetivo aprimorar e controlar o processo por meio da identificação das diferentes fontes de variabilidade do processo. Outro ponto importante do CEP é que se deve sempre estar focado

na causa do problema, e não no efeito, ou seja, focar em como não ter estes micro-organismos na indústria e se já estiverem presentes, como eliminá-los. Em nenhum laticínio amostrado verificou-se o uso desta ferramenta da gestão da qualidade.

Outros dois pontos identificados como críticos de controle foram as embalagens em que o leite é envasado e também o tanque de armazenamento de leite pasteurizado do laticínio C, pois este possui uma tampa facilmente removível e é aberta com frequência pelos funcionários do laticínio.

Pontos que não são considerados críticos de controle, mas que pela análise dos Quadros de 4 a 8, chamam a atenção pela quantidade de pontos positivos para os micro-organismos patogênicos são principalmente os silos ou tanques de expansão para armazenamento de leite cru e também, as câmaras frias (pisos e paredes). Nos laticínios C, D e E o leite é recolhido nas propriedades por caminhões isotérmicos a cada dois dias (48 horas). Mesmo estando sob refrigeração, este é um período relativamente elevado para o leite ficar armazenado, principalmente por sabermos, através das análises realizadas, que este leite possui altas contagens de micro-organismos mesófilos e psicrótrófos. Utilizando a ferramenta “5W2H” (*What* – o que será feito; *Why* – por que será feito; *Where* – onde será feito; *When* – quando será feito; *Who* – por quem será feito; *How* – como será feito; *How much* – quanto custará fazer) se consegue identificar quais são as inadequações e riscos de contaminação e estabelecimento, principalmente, de medidas preventivas (PERIARD, 2009).

O ambiente de processo mostrou-se também suscetível a encontrar micro-organismos patogênicos, sendo fundamental a elaboração de um bom plano de ação para uma higienização adequada, validando os procedimentos de limpeza e elaboração de Procedimentos Operacionais Padrão (POP/PPHO) rigorosos e confiáveis, principalmente nos locais de armazenamento refrigerado de produtos finais, que representa um ponto importante de contaminação pós-processo.

Ao comparar a contaminação encontrada no laticínio A (Quadro 4) com os valores do laticínio B (Quadro 5), ambos processadores de leite tipo A, observa-se um nível de contaminação bem menor no laticínio B. Uma possível explicação para este fato é o uso de ozônio para a descontaminação ambiental

do laticínio. O ozônio é uma molécula fortemente oxidante e reativa. Por ser bactericida, investiga-se uma grande variedade de micro-organismos, na forma de células vegetativas ou esporos, em ambientes industriais e também nos alimentos (CHIATTONE; TORRES; ZAMBIAZI, 2008).

As empresas precisam elaborar um plano periódico de análises microbiológicas principalmente a que diz respeito à presença de micro-organismos patogênicos.

É fundamental que os laticínios estabeleçam metas para melhora da qualidade, não só do leite, mas também do ambiente. Uma ferramenta importante de gestão da qualidade para auxiliar nesse controle de metas é o PDCA (*plan - do - check - action* → planejar – implementar – monitorar – agir), em que metas são estabelecidas inicialmente, em seguida tem-se o treinamento das pessoas envolvidas no processo, a execução das tarefas e a coleta dos dados e depois a fase de checar se os resultados esperados foram alcançados. Caso as metas não tenham sido atingidas, é necessário agir para reparar os erros (BERTOLINO, 2010).

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados, pode-se concluir que:

- A contagem de aeróbios mesófilos ultrapassou o limite estabelecido pela atual IN 62, o que mostra a dificuldade da maioria dos produtores de leite para se adequar nos padrões higiênico-sanitários estabelecidos pela legislação em vigor.

- A contagem de aeróbios psicrotróficos tanto no leite como em superfícies que entram ou não em contato com o leite, foi bastante elevada.

- A *E. coli* não pode ser considerada como um bioindicador de *L. monocytogenes* e de *S. aureus*.

- A higiene dos ambientes nas duas coletas realizadas em cada laticínio, com relação às bactérias aeróbias mesófilas, pôde ser considerada semelhante, já que não houve diferença significativa pelo teste T ao nível de 5% de significância.

- Nos 5 laticínios as superfícies sem contato com os alimentos foram as que apresentaram maior contaminação para *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria* sp. e *L. monocytogenes*.

- *L. monocytogenes* foi encontrada somente em superfícies que não entram em contato com o leite.

- Não houve diferença significativa entre os laticínios processadores de leite tipo A e leite pasteurizado com relação a quantidade de *E. coli*, *Listeria* sp. e *L. monocytogenes* no leite e em superfícies que possuem ou não contato com o leite.

- Os pontos críticos de controle identificados na pesquisa são: pasteurização, embalagens primárias e no caso do laticínio C, o tanque de armazenamento do leite pasteurizado.

- A contagem de *Listeria* sp. não pode ser considerada como um bioindicador de *Listeria monocytogenes*.

- Os resultados obtidos ressaltam a importância da adoção de ferramentas de gestão da qualidade, como 5W2H, PDCA, CEP, BPF e APPCC, para que a segurança alimentar seja garantida ao longo da cadeia de produção do leite pasteurizado nos laticínios estudados.

7. RECOMENDAÇÕES

- Atuação mais intensiva do governo junto aos produtores de leite (palestras, trabalhos a campo) para uma expressiva melhora na qualidade do leite, já que um produto inicialmente de má qualidade não pode gerar um de boa qualidade.

- Pagamento do leite pela qualidade e não somente pela quantidade, prática frequente dos laticínios, incentivando desta maneira a produção de um leite de melhor qualidade.

- Cursos e treinamentos de produtores de leite indicando quais são os produtos, diluições, tempo e temperatura de higienização mais adequados à limpeza do ambiente e sistema de ordenha, onde armazenar teteiras no caso de ordenha “balde ao pé” e como higienizar os latões.

- Os laticínios deveriam investir mais nas diversas ferramentas de qualidade disponíveis para aumentar a qualidade dos seus produtos evitando desta maneira, possíveis surtos.

- Pesquisas futuras com foco na validação dos procedimentos de limpeza e higienização de equipamentos e ambientes na indústria de alimentos, como por exemplo, o uso de ozônio, daria um suporte maior no controle de micro-organismos na indústria, principalmente os patogênicos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, N.M.; JEFFERSON, K.K. A low molecular weight componente of sérum inhibits biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v.49, n.6, p.388-391, 2010.

ARCURI, E.F. et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n.3, p.440-446, 2006.

AOAC - Association of Official Analytical Chemistis. **Research Institute hereby certifies that the performance of the test kit designated as: Compact Dry**. December, 2004

BAILEY, J. S. Detection of *Salmonella* cells within 24 to 26 hours in poultry samples with the polymerase chain reaction BAX System. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.61, n.7, p.792-795, 1998.

BARANCELLI, G.V. **Ocorrência e caracterização sorológica e genotípica de *Listeria monocytogenes* em indústrias de queijo do Estado de São Paulo**. 2010. 115p. Tese (Doutor em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

BATALHA, M.O. As Cadeias de produção agroindustriais: uma perspectiva para o estudo das Inovações Tecnológicas. **Revista de Administração**, São Paulo, v.30, n.4, p.43-50, 1995.

BERGAMASCHI, M. **Produção de leite gera valor agregado e empregos em todas as regiões do país**. Milk Point, 2010. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/mercado/espaco-aberto/producao-de-leite-gera-valor-agregado-e-empregos-em-todas-as-regioes-do-pais-67748n.aspx>>. Acesso em: 29 jan. 2012.

BERTOLINO, M.T. **Gerenciamento da qualidade na indústria alimentícia: ênfase na segurança de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

BORGES, M.F.; NASSU, R.T.; PEREIRA, J.L; ANDRADE, A.P.C.; KUAYE, A.Y. Perfil da contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.5, p.1434-1438, 2008.

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 da União**, Poder Executivo, Brasília, DF. 20 set. 2002. Seção 1, p.13.

BRASIL. Instrução Normativa nº 09, de 08 de abril de 2009. Institui os procedimentos para controle de *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF. 09/04/2009. Seção 1, p.9.

BRASIL. Instrução Normativa nº 32, de 30 de junho de 2011. Prorroga por 6 meses a vigência dos prazos estabelecidos para a adoção de novos limites microbiológicos e de células somáticas, que entrariam em vigor a partir de 1º de julho de 2011 para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, dispostos na Tabela 2 do Anexo IV da Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF. 01/07/2011. Seção 1, p.4. (BRASIL, 2011a).

BRASIL. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado e de leite pasteurizado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF. Seção 1, p.6. (BRASIL, 2011b).

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SOUZA, H.M.; VARGAS, O.L. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.18, n.1, p.39-44, 1998.

CAMARGO, T.M. **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**. 2010. 105 p. Dissertação (Mestre em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

CARVALHO, L.A.; NOVAES, L.P.; MARTINS, C.E.; ZOCCAL, R.; MOREIRA, P.; RIBEIRO, A.C.C.L.; LIMA, V.M.B. **Sistema de Produção de Leite (Cerrado)**. EMBRAPA GADO DE LEITE. 2002. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/introducao.html>>. Acesso em: 23 nov. 2011.

CARVALHO, M.P.; MARTINS, P.C.; WRIGHT, J.T.C.; SPERS, R.G. **Cenários para o leite no Brasil em 2020**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2007.

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

CDC - Center for Diseases Control and Prevention. **Investigation Update: Multistate outbreak of listeriosis linked to whole cantaloupes from Jensen Farms, Colorado**, 2011. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/120811/index.html>>. Acesso em: 29 jan. 2012.

CHAPAVAL, L; ALVES, F.S.F. **Rastreabilidade na Produção de Leite de Cabra: Diferencial para um Agronegócio Sustentável**. EMBRAPA Caprinos, 2008. Disponível em: <<http://www.pecnordeste.com.br/pecnordeste/doc/caprinovionocultura/Lea%20Chapaval.pdf>>. Acesso em: 23 nov. 2011.

CHATURONGKASUMRIT, Y.; TAKAHASHI, H.; KEERATIPBUL, S.; KUDA, T.; KIMURA, B. The effect of polyesterurethane belt surface roughness on *Listeria monocytogenes* biofilm formation and its cleaning efficiency. **Food Control**, Guildford, v.22, n.12, p.1893-1899, 2011.

CHIATTONE, P.V.; TORRES, L.M.; ZAMBIAZI, R.C. Aplicação do ozônio na indústria de alimentos. **Alimentos e nutrição**, Araraquara, v.19, n.3, p.341-349, 2008.

COSTA, E.O. Programa nacional de melhoria de qualidade do leite (PNMQL). **Revista Nappama**, São Paulo, v.8, n.2, p.18-21, 2005.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, Washington, v.284, n.5418, p.1318-1322, 1999.

DALY, C.; CHANCE, M.; SANDINE, W.E.; ELLIKER, P.R. Control of *Staphylococcus aureus* in sausage by starter cultures and chemical acidulation. **Journal of Food Science**, Chicago, v.38, p.426-430, 1973.

D'AMICO, D.J.; DONNELLY, C.W. Detection, isolation, and incidence of *Listeria* spp. in small-scale artisan cheese processing facilities: a methods comparison. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.72, n.12, p.2499-2507, 2009.

DESMARCHELIER, P.M. Pathogenic microbiological contaminants of milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**. v.56, n.2, p.123-125, 2001.

DESTRO, M. T. ***Listeria monocytogenes* na cadeia produtiva de alimentos: da produção primária ao consumidor final**. 2006. 81p. Tese (Livre docência) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 2.ed. Washington: Editora, 1997.

DUFFY, L.L.; O'CALLAGHAN, D.; MCAULEY, C.M.; FEGAN, N.; CRAVEN, H.M. Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from Australian dairy powder factory environments. **International Dairy Journal**, Barking, v.19, n.3, p.178-179, 2009.

EVANCHO, G.M.; SVEUM, W.H.; MOBERG, L.J.; FRANK, J.F. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: DOWNES, F.P.; ITO, K (eds.), **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4ed. Washington: American Public Health Association (APHA), Chapter 3, 2001.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

FAGUNDES, H. **Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* H157:O7 em rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo**. 2007. 107p. Tese (Doutor em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAOSTAT database**. 2009. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 23 nov. 2011.

FELLOWS, P.J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e Prática**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

FRANCO, B.D.G.M. **Métodos rápidos de análise microbiológica de alimentos: estudo crítico e avaliação de novas metodologias**. 1994. 133p. Tese (Livre-docência) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003.

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

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

FRÖDER, H. **Emprego de um método molecular para avaliar a presença de *Listeria monocytogenes* em saladas de hortaliças folhosas minimamente processadas**. 2005. 93p. Dissertação (Mestre em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

GAYA, P.; SARALEGUI, C.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Occurrence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in raw caprine milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.79, n.11, p.1936-1941, 1996.

GEISEN, R.; LÜCKE, F.K.; KRÖCKEL, L. Starter and protective cultures for meat and meat products. **Fleischwirtschaft**, Frankfurt, v.72, n.6, p.894-898, 1992.

HALPIN-DOHNALEK, M.I.; MARTH, E.H. *Staphylococcus aureus*: Production of extracellular compounds and behavior in foods – a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.52, n.4, p.267-282, 1989.

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 April 2011. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071400.htm>>. Acesso em: 15 nov. 2011.

JANK, M. S.; FARINA, E. M. Q.; GALAN, V. B. **O agribusiness do leite**. São Paulo: Milkbuzz, 1999.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JEONG, D.K.; FRANK, J.F. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.57, p.576-586, 1994.

JOHNSON, J.L.; DOYLE, M.P; CASSENS, R.G. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.53, p.81-91, 1990.

JONES, G.M. **On-farm tests for drug residues in milk**. Petersburg: Virginia State University, 1999. Disponível em: <<http://pubs.ext.vt.edu/404/404-401/404-401.html>>. Acesso em: 19 nov. 2011.

JØRGENSEN, H.J.; MØRK, T.; RØRVIK, L.M. The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.88, n.11, p.3810-3817, 2005.

KUSHIDA, M.M. **Validação de métodos laboratoriais: avaliação do Sistema BAX[®] de análise de *Salmonella* sp. em alimentos por reação de polimerase em cadeia (PCR)**. 2005. 194f. Tese (Doutor em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

LUBER, P.; CRERAR, S.; DUFOUR, C.; FARBER, J.; DATTA, A.; TODD, E.C.D. Controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Working towards global scientific consensus and harmonization – Recommendations for improved prevention and control. **Food Control**, Guildford, v.22, n.9, p.1535-1549, 2011.

LUNDÉN, J.; TOLVANEN, R.; KORKEALA, H. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87, (E. Suppl.):E6-E12, 2004.

MACHADO, J.G.C.F; NANTES, J.F.D. Utilização da identificação eletrônica de animais e da rastreabilidade na gestão da produção da carne bovina. **Revista Brasileira de Agroinformática**, Lavras, v.3, n.1, p.41-50, 2000.

MANGALASSARY, S.; HAN, I.; RIECK, J.; ACTON, J.; DAWSON, P. Effect of combining nisin and/or lysozyme with in-package pasteurization for control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat turkey bologna during refrigerated storage. **Food Microbiology**, London, v.25, n.7, p.866-870, 2008.

MARTÍ, M.; TROTONDA, M.P.; TORMO-MÁS, M.A.; VERGARA-IRIGARAY, M.; CHEUNG, A.L.; LASA, I.; PENADÉS, J.R. Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **Microbes and Infection**, v.12, n.1, p.55-64, 2010.

MELLEFONT, L.A.; MCMEEKIN, T.A.; ROSS, T. Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.121, n.2, p.157-168, 2008.

MENDES, R.E. O impacto financeiro da rastreabilidade em sistemas de produção de bovinos no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.5, p.1524-1528, 2006.

MHONE, T.A.; MATOPE, G.; SAIDI, P.T. Aerobic bacterial, coliform, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* counts of raw and processed milk from selected smallholder dairy farms of Zimbabwe. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.151, n.2, p.223-228, 2011.

MIDELET, G.; CARPENTIER, B. Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.97, n.2, p.262-270, 2004.

MØRK, T.; KVITLÉ, B.; MATHISEN, T.; JØRGENSEN, H.J. *Bacteriological and molecular investigations of Staphylococcus aureus* in dairy goats. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.141, n.1-2, p.134-141, 2010.

MOREIRA, M.S.P. et al. **Kit Embrapa de ordenha manual**®. Embrapa Gado de Leite, 2007. Disponível em: <
<http://www.cnp.gl.embrapa.br/jornaleite/CartilhaKitOrdenha.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2012.

NORMANNO, G.; LA SALANDRA, G.; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N.C.; CORRENTE, M.; PARISI, A.; SANTAGADA, G.; FIRINU, A.; CRISSETTI, E.; CELANO, G.V. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, n.3, p.290-296, 2007.

NORTON, D.M. Polymerase chain reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: toward real-time screening for food and environmental samples. **Journal of AOAC International**, Arlington, v.85, n.2, p.505-515, 2002.

ORDÓÑEZ, J.A. et al. **Tecnologia de alimentos**: Componentes dos alimentos e processos. v.1. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PAN, Y.; BREIDT JR, F.; KATHARIOU, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.72, n.12, p.7711-7717, 2006.

PELCZAR JR, M.J.; CHAN, E.C.S; KRIEG, N.R. **Microbiologia**: Conceitos e aplicações. v.2, 2.ed. São Paulo: Person Education, 1997.

PEREIRA, C.C.; FONSECA, L.F.L. Porque a qualidade microbiológica do leite é importante? **Revista Balde Branco**, n.418, p.40-44, 1999.

PEREIRA, M.L.; GASTELOIS, M.C.A.; BASTOS, E.M.A.F.; CAIAFFA, W.T.; FALEIRO, E.S.C. Enumeração de coliformes fecais na presença de *Salmonella* sp. em queijo Minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.51, n.5, p.427-431, 1999.

PERIARD, G. **O que é o 5W2H e como ele é utilizado?** 2009. Disponível em: < <http://www.sobreadministracao.com/o-que-e-o-5w2h-e-como-ele-e-utilizado/>>. Acesso em: 31 jan. 2012.

POWELL, M.R.; TAMPLIN, M.; MARKS, B.; CAMPOS, D.T. Bayesian synthesis of a pathogen growth model: *Listeria monocytogenes* under competition. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.109, n.1-2, p.34-46, 2006.

PRITCHARD, T.J.; FLANDERS, K.J.; DONNELLY, C.W. Comparison of the incidence of *Listeria* on equipment versus environmental sites within dairy processing plants. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.26, n.3, p.375-384, 1995.

RAGÀS, X.; AGUT, M.; NONEL, S. Singlet oxygen in *Escherichia coli*: new insights for antimicrobial photodynamic therapy. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.49, n.5, p.770-776, 2010.

RYSER, E.T.; DONNELLY, C.W. *Listeria*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K (eds.), **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4ed. Washington: American Public Health Association (APHA), Chapter 36, 2001.

SÁ, M.E.P. et al. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.41, n.5, p.321-326, 2004

SBRISSIA, G.F. **Sistema agroindustrial do leite: custos de transferência e preços locais**. 2005. 72f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

SCALCO, A.R. **Proposição de um modelo de referência para gestão da qualidade na cadeia de produção de leite e derivados**. 2004. 225f. Tese (Doutora em Engenharia de Produção) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

SCALCO, A.R.; SOUZA, R.C. Qualidade na cadeia de produção de leite: diagnóstico e proposição de melhorias. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, Lavras, v.8, n.3, p.368-377, 2006.

SCALCO, A.R.; TOLEDO, J.C. Gestão da qualidade em laticínios do Estado de São Paulo: situação atual e recomendações. **Revista de Administração**, São Paulo, v.37, n.2, p.17-25, 2002.

SILVA, I.M.M.; ALMEIDA, R.C.C.; ALVES, M.A.O.; ALMEIDA, P.F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.81, n.3, p.241-248, 2003.

SILVA, N. **Escherichia coli O157:H7 em alimentos**. 2004. 106p. Tese (Doutora em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3.ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007.

SILVA JR, E.A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 5 ed. São Paulo: Varela. 2002.

SOARES, J.C.; MARQUES, M.R.; TAVARIA, F.K.; PEREIRA, J.O.; MALCATA, F.X.; PINTADO, M.M. Biodiversity and characterization of *Staphylococcus* species isolated from a small manufacturing dairy plant in Portugal. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.146, n.2, p.123-129, 2011.

SØRHOUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrops and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**. Cambridge, v.8, n.2, p.35-41, 1997.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, Paris, v.9, n.10, p.1236-1243, 2007.

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

TOMPKIN, R.B.; CHRISTIANSEN, L.N.; SHAPARIS, A.B.; BAKER, R.L.; SCHROEDER, J.M. Control of *Listeria monocytogenes* in processed meats. **Food Australia**, North Sydney, v.44, n.8, p.370-376, 1992.

TONDO, E.C.; GUIMARÃES, M.C.M.; HENRIQUES, J.A.P.; AYUB, M.A.Z. Assessing and analysing contamination of dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.46, n.12, p.1108-1114, 2000.

TORRES, K. et al. Patogenesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonotico emergente. **Revista MVZ Córdoba**, Córdoba, v.10, n.01, p.511-543, 2005.

USDA/FAS. Dairy: World markets and trade. In: United States Department of Agriculture (USDA)/Foreign Agricultural Service (FAS), July 2011. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/dairy.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2011.

USDA/FSIS. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg, and environmental samples. In: United States Department of Agriculture (USDA)/Food Safety and Inspection Service (FSIS), **Microbiology Laboratory Guidebook**. Chapter MLG 8.07, revised March 2009. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_8_07.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2011.

USER'S GUIDE. **BAX®System PCR assay with automated detection for bacterial screening**. Wilmington, DE.: Du Pont Qualicon, 2008.

VEIGA, J.B.; FREITAS, C.M.K.H.; POCCARD-CHAPUIS, R. **Criação de gado leiteiro na Zona Bragantina**. Embrapa Amazônia Oriental, Dez. 2005.

Disponível em:

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/GadoLeiteiro/ZonaBragantina/paginas/cadeia.htm>>. Acesso em: 17 nov. 2008.

VERDIER-METZ, I.; MICHEL, V.; DELBÈS, C.; MONTEL, M. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? **Food Microbiology**, Amsterdam, v.26, n.3, p.305-310, 2009.

WARRINER, K.; NAMVAR, A. What is the hysteria with *Listeria*? **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.20, n.6-7, p.245-254, 2009.

ZHANG, S; IANDOLO, J.J.; STEWART, G.C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). **Microbiology Letters**, Amsterdam, v.168, n.2, p.227-233, 1998.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health. **Bulletin of IDF**, v.345, p.15-18, 2000.

ZOCCAL, R. **Produção de leite, vacas ordenhadas e produtividade animal no Brasil – 1980/2010***. EMBRAPA – Gado de leite, 2011. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0230.php>>. Acesso em: 23 nov. 2011.

8. APÊNDICE

APÊNDICE A

Formulário de Descrição da Propriedade	
1. Descrição Geral	
Nome do laticínio: _____	
Nome do Produtor: _____	
Localização: _____	
Produção total/dia: _____	
2. Ordenha	
Tipo de ordenha:	() manual () balde ao pé () mecânica
Nº unidade de ordenha:	_____
Limpeza do local	() boa () regular () ruim
Pré-dipping	() sim () não
Pós-dipping	() sim () não
Resfriamento do leite:	() resfriador a placas () tanque de expansão () por imersão
Piso da sala de ordenha:	() com calçamento () sem calçamento

APÊNDICE B

Formulário de Descrição do Laticínio	
Nome do laticínio:	
Localização:	
Nº de funcionários:	
Capacidade média diária:	
Número de fazendas fornecedoras de leite:	
Quantidade de leite pasteurizado produzido:	
Área externa totalmente calçada	() sim () não
Lavador de botas na entrada do laticínio	() sim () não
Utilização de pedilúvio na entrada do laticínio	() sim () não
Tipos de produtos fabricados	☐ leite pasteurizado ☐ queijo fresco ☐ queijo mussarela ☐ bebida láctea ☐ iogurte ☐ outros:
BPF	☐ implementado ☐ em fase de implementação ☐ não implementado
APPCC	☐ implementado ☐ em fase de implementação ☐ não implementado
Órgão de fiscalização	() SIF () outro:
Laboratório de	☐ análises físico-químicas ☐ análises microbiológicas

APÊNDICE C – Dados da primeira coleta realizada no laticínio A (janeiro de 2011)

Amostra	Contaminantes						
	<i>E. coli</i>	Coliformes totais	<i>S. aureus</i>	Psicrotróficos	Mesófilos	<i>Listeria</i> sp.	<i>L. monocytogenes</i>
LEITE	-----Log UFC/mL-----					Presença (P)/ausência (A) em 25mL	
Cru sem refrigeração (logo após ordenha)	<1,00 (est)	1,18 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	3,75	A	A
Silo externo ao laticínio com leite refrigerado	<1,00 (est)	3,43	<2,00 (est)	5,25	3,53	P	A
Cru antes do pasteurizador no laticínio	1,18 (est)	1,70 (est)	<2,00 (est)	2,54 (est)	3,96	P	A
Pasteurizado	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	A	A
SUPERFÍCIES							
SWAB (100cm²)	-----Log UFC/100cm²-----					Presença (P)/ausência (A) em 100cm²	
Caixa plástica onde os sacos de leite são acomodados para transporte	<1,00 (est)	1,81 (est)	<2,00 (est)	4,95	4,72	A	A
SWAB (ÁREAS MENORES QUE 100cm²)	-----Log UFC/superfície amostrada-----					Presença (P)/ausência (A) na superfície amostrada	
Estrados no laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	6,79 (est)	6,57 (est)	A	A
Embaixo da esteira de envase das garrafas	<1,00 (est)	3,45	<2,00 (est)	>7,81 (est)	>7,81 (est)	A	A
Esteira de envase das garrafas	<1,00 (est)	<1,00 (est)	3,93	>7,81 (est)	5,53	A	A
Esteira em que as garrafas são unidas em fardos	<1,00 (est)	5,10	<2,00 (est)	>7,81 (est)	>7,81 (est)	A	A
Mão do manipulador 1 da ordenha	1,18 (est)	1,43 (est)	<2,00 (est)	4,61	4,66	A	A
Mão do manipulador 2 da ordenha	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	2,48 (est)	3,11 (est)	A	A
Mão do manipulador 1 do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	2,60 (est)	<2,00 (est)	3,26 (est)	A	A
Mão do manipulador 2 do laticínio	<1,00 (est)	3,20	1,70 (est)	4,32	4,04	P	A
Teteira 1	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	2,00 (est)	3,00 (est)	A	A
Teteira 2	2,30	2,74	<2,00 (est)	3,63	4,45	A	A
Ralo do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	>7,81 (est)	>7,81 (est)	P	A
Rejunte entre os azulejos da parede	<1,00 (est)	4,79	<2,00 (est)	6,63 (est)	6,81 (est)	A	A
ESPONJA (0,1m²)	-----Log UFC/100cm²-----					Presença (P)/ausência (A) em 0,1m²	
Latão (onde o leite durante o envase é descartado por falha na embalagem)	<1,00 (est)	4,78	<2,00 (est)	5,95	6,06	A	A
Cortina plástica de separação da área de envase com a ante-câmara (lado área de envase)	<1,00 (est)	2,48	<2,00 (est)	2,88 (est)	3,28 (est)	A	A
Cortina plástica de separação da área de envase com a ante-câmara (lado ante-câmara)	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	3,30	3,29 (est)	A	A
Piso do laticínio	1,00 (est)	>6,29 (est)	<2,00 (est)	>7,81 (est)	>7,81 (est)	P	P
Parede do laticínio	<1,00 (est)	3,88	<2,00 (est)	3,98	4,01	A	A
Piso da câmara fria	4,60	>6,29 (est)	3,60	>7,81 (est)	>7,81 (est)	P	P
Parede da câmara fria	<1,00 (est)	3,04	<2,00 (est)	4,90	3,74	A	A
Piso da sala de ordenha	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	>7,81 (est)	3,63	A	A

(est) = valor estimado

APÊNDICE D – Dados da segunda coleta realizada no laticínio A (março de 2011)

Amostra	Contaminantes						
	<i>E. coli</i>	Coliformes totais	<i>S. aureus</i>	Psicrotróficos	Mesófilos	<i>Listeria</i> sp.	<i>L. monocytogenes</i>
LEITE	-----Log UFC/mL-----					Presença (P)/ausência (A) em 25mL	
Cru sem refrigeração (logo após ordenha)	<1,00 (est)	1,22 (est)	<2,00 (est)	3,23	4,30	A	A
Silo externo ao laticínio com leite refrigerado	1,00 (est)	3,06	<2,00 (est)	5,92	6,25	P	A
Cru antes do pasteurizador no laticínio	1,00 (est)	2,98	<2,00 (est)	5,00	6,27	P	A
Pasteurizado	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	A	A
SUPERFÍCIES							
SWAB (100cm²)	-----Log UFC/100cm²-----					Presença (P)/ausência (A) em 100cm²	
Caixa plástica onde os sacos de leite são acomodados para transporte	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	5,77	5,95	P	A
SWAB (ÁREAS MENORES QUE 100cm²)	-----Log UFC/superfície amostrada-----					Presença (P)/ausência (A) na superfície amostrada	
Estrados no laticínio	<1,00 (est)	5,62 (est)	<2,00 (est)	>7,81 (est)	>7,81 (est)	A	A
Embaixo da esteira de envase das garrafas	>6,29 (est)	>6,29 (est)	<2,00 (est)	>7,81 (est)	>7,81 (est)	A	A
Esteira de envase das garrafas	<1,00 (est)	4,05	<2,00 (est)	>7,81 (est)	>7,81 (est)	A	A
Esteira em que as garrafas são unidas em fardos	>6,29 (est)	>6,29 (est)	<2,00 (est)	>7,81 (est)	>7,81 (est)	A	A
Mão do manipulador 1 da ordenha	3,70	3,72	<2,00 (est)	4,27	4,61	A	A
Mão do manipulador 2 da ordenha	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	2,88 (est)	3,59	A	A
Mão do manipulador 1 do laticínio	<1,00 (est)	3,51	<2,00 (est)	3,86	4,90	A	A
Mão do manipulador 2 do laticínio	<1,00 (est)	3,68	<2,00 (est)	4,37	5,87	A	A
Teteira 1	<1,00 (est)	4,71	<2,00 (est)	5,34	>7,81 (est)	A	A
Teteira 2	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	3,72	A	A
Ralo do laticínio	>6,29 (est)	>6,29 (est)	<2,00 (est)	>7,81 (est)	>7,81 (est)	P	A
Rejunte entre os azulejos da parede	<1,00 (est)	4,81	<2,00 (est)	>7,81 (est)	>7,81 (est)	A	A
ESPONJA (0,1m²)	-----Log UFC/100cm²-----					Presença (P)/ausência (A) em 0,1m²	
Latão (onde o leite durante o envase é descartado por falha na embalagem)	>6,29 (est)	>6,29 (est)	<2,00 (est)	>7,81 (est)	>7,81 (est)	P	A
Cortina plástica de separação da área de envase com a ante-câmara (lado área de envase)	<1,00 (est)	1,02 (est)	<2,00 (est)	3,35	3,61	A	A
Cortina plástica de separação da área de envase com a ante-câmara (lado ante-câmara)	<1,00 (est)	2,30 (est)	<2,00 (est)	2,74 (est)	3,27 (est)	A	A
Piso do laticínio	2,15 (est)	>6,29 (est)	<2,00 (est)	>7,81 (est)	>7,81 (est)	A	A
Parede do laticínio	<1,00 (est)	3,15	<2,00 (est)	5,27	5,34	A	A
Piso da câmara fria	>6,29 (est)	>6,29 (est)	<2,00 (est)	>7,81 (est)	>7,81 (est)	P	P
Parede da câmara fria	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	3,70	<2,00 (est)	A	A
Piso da sala de ordenha	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	A	A

(est) = valor estimado

APÊNDICE E – Dados da primeira coleta realizada no laticínio B (novembro de 2010).

Amostra	Contaminantes						
	<i>E. coli</i>	Coliformes totais	<i>S. aureus</i>	Psicrotróficos	Mesófilos	<i>Listeria</i> sp.	<i>L. monocytogenes</i>
LEITE	-----Log UFC/mL-----					Presença (P)/ausência (A) em 25mL	
Cru refrigerado estocado em tanque de expansão durante o final de semana para processamento na segunda-feira	2,47	5,59 (est)	<2,00 (est)	6,30	6,36	A	A
Cru refrigerado (logo após ordenha)	1,69	3,28	<2,00 (est)	4,96	5,66	A	A
Pasteurizado	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	A	A
SUPERFÍCIES							
SWAB (100cm²)	-----Log UFC/100cm²-----					Presença (P)/ausência (A) em 100cm²	
Caixa plástica onde os sacos de leite são acomodados para transporte	<1,00 (est)	>6,29 (est)	<2,00 (est)	7,29 (est)	7,08 (est)	A	A
SWAB (ÁREAS MENORES QUE 100cm²)	-----Log UFC/superfície amostrada-----					Presença (P)/ausência (A) na superfície amostrada	
Embalagem de saco de leite	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	2,30 (est)	<2,00 (est)	A	A
Estrados da câmara fria	<1,00 (est)	>6,29 (est)	<2,00 (est)	6,98 (est)	5,76	A	A
Maçanetas no laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	3,30	4,58	A	A
Mão do manipulador 1 do laticínio	1,40 (est)	2,68	<2,00 (est)	5,08	5,59	A	A
Mão do manipulador 2 do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	2,90 (est)	A	A
Ralo na entrada da câmara fria	<1,00 (est)	>6,29 (est)	<2,00 (est)	>7,81 (est)	>7,81 (est)	A	A
Ralo na entrada do laticínio	<1,00 (est)	>6,29 (est)	<2,00 (est)	6,34	>7,81 (est)	A	A
Rejunte entre os azulejos da parede	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	3,08 (est)	A	A
Teteira 1	3,48	3,49	2,60 (est)	5,59	5,66	A	A
Teteira 2	2,04 (est)	3,15	<2,00 (est)	4,58	6,23	A	A
Teteira 3	2,89	3,11	<2,00 (est)	5,04	3,61	A	A
ESPONJA (0,1m²)	-----Log UFC/100cm²-----					Presença (P)/ausência (A) em 0,1m²	
Parede da câmara fria	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	3,26 (est)	3,08 (est)	A	A
Parede da sala de tanques de expansão no laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	3,64	3,88	A	A
Parede do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	A	A
Piso da câmara fria	<1,00 (est)	3,55	<2,00 (est)	6,72 (est)	4,76	A	A
Piso da ordenha	3,05	4,23	<2,00 (est)	5,74	6,11	P	A
Piso do laticínio	2,82 (est)	2,18 (est)	<2,00 (est)	4,60	4,62	A	A
Piso da sala de tanques de expansão no laticínio	<1,00 (est)	3,95	<2,00 (est)	4,36	4,98	A	A

(est) = valor estimado

APÊNDICE F – Dados da segunda coleta realizada no laticínio B (dezembro de 2010).

Amostra	Contaminantes						
	<i>E. coli</i>	Coliformes totais	<i>S. aureus</i>	Psicrotróficos	Mesófilos	<i>Listeria</i> sp.	<i>L. monocytogenes</i>
LEITE	-----Log UFC/mL-----					Presença (P)/ausência (A) em 25mL	
Cru refrigerado estocado em tanque de expansão durante o final de semana para processamento na segunda-feira	4,89	>6,29 (est)	<2,00 (est)	6,62 (est)	6,26	A	A
Cru refrigerado (logo após ordenha)	2,40	2,90	<2,00 (est)	3,97	6,04	A	A
Pasteurizado	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	A	A
SUPERFÍCIES							
SWAB (100cm²)	-----Log UFC/100cm²-----					Presença (P)/ausência (A) em 100cm²	
Caixa plástica onde os sacos de leite são acomodados para transporte	2,34	5,84 (est)	<2,00 (est)	7,11 (est)	7,20 (est)	A	A
SWAB (ÁREAS MENORES QUE 100cm²)	-----Log UFC/superfície amostrada-----					Presença (P)/ausência (A) na superfície amostrada	
Embalagem de saco de leite	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	3,90	3,87	A	A
Estrado da câmara fria	<1,00 (est)	3,36	<2,00 (est)	6,69 (est)	4,68	A	A
Maçanetas no laticínio	<1,00 (est)	4,28	<2,00 (est)	5,56	5,32	A	A
Mão do manipulador 1 do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	2,30 (est)	A	A
Mão do manipulador 2 do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	A	A
Ralo na entrada da câmara fria	3,90	6,20 (est)	<2,00 (est)	>7,81 (est)	>7,81 (est)	A	A
Ralo na entrada do laticínio	3,00	5,15	<2,00 (est)	6,04	6,15	A	A
Rejunte entre os azulejos da parede do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	A	A
Teteira 1	3,48	5,65 (est)	<2,00 (est)	6,99 (est)	7,29 (est)	A	A
Teteira 2	1,74 (est)	2,87	<2,00 (est)	5,62	4,70	A	A
ESPONJA (0,1m²)	-----Log UFC/100cm²-----					Presença (P)/ausência (A) em 0,1m²	
Equipamentos do laticínio (superfície externa)	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	2,90 (est)	2,98 (est)	A	A
Parede da câmara fria	<1,00 (est)	2,71	<2,00 (est)	4,71	3,57	A	A
Piso da câmara fria	2,70	5,34	<2,00 (est)	6,48 (est)	6,68 (est)	A	A
Parede da sala de tanques de expansão no laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	2,18 (est)	A	A
Piso da sala de tanques de expansão no laticínio	1,30 (est)	4,17	<2,00 (est)	4,97	4,93	A	A
Parede do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	2,30 (est)	A	A
Piso do laticínio	<1,00 (est)	4,51	<2,00 (est)	6,40 (est)	5,96	A	A
Piso da ordenha	3,81	4,75	<2,00 (est)	6,04	6,68	A	A

(est) = valor estimado

APÊNDICE G – Dados da primeira coleta realizada no laticínio C (janeiro de 2011)

Amostra	Contaminantes						
	<i>E. coli</i>	Coliformes totais	<i>S. aureus</i>	Psicrotróficos	Mesófilos	<i>Listeria</i> sp.	<i>L. mono-cytogenes</i>
LEITE	-----Log UFC/mL-----					Presença (P)/ausência (A) em 25mL	
Cru sem refrigeração (logo após ordenha)	1,81 (est)	1,81 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	3,61	A	A
Cru refrigerado estocado em tanque de expansão durante o final de semana para processamento na segunda-feira	2,20 (est)	1,79 (est)	<2,00 (est)	7,09 (est)	7,21 (est)	A	A
Tanque com leite cru refrigerado no laticínio	2,66	2,52	<2,00 (est)	5,00	4,72	A	A
Pasteurizado	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	2,95 (est)	A	A
SUPERFÍCIES							
SWAB (100cm²)	-----Log UFC/100cm²-----					Presença (P)/ausência (A) em 100cm²	
Caixa plástica onde os sacos de leite são acomodados para transporte	<1,00 (est)	2,15 (est)	<2,00 (est)	4,15	3,20 (est)	A	A
Tanque de expansão localizado na sala de ordenha	<1,00 (est)	>6,29 (est)	<2,00 (est)	>7,81 (est)	>7,81 (est)	A	A
Latão onde o leite foi transportado ao laticínio	2,84	>6,29 (est)	<2,00 (est)	5,32	>7,81 (est)	A	A
SWAB (ÁREAS MENORES QUE 100cm²)	-----Log UFC/superfície amostrada-----					Presença (P)/ausência (A) na superfície amostrada	
Maçaneta da câmara fria	<1,00 (est)	2,30	<2,00 (est)	2,40 (est)	3,18 (est)	A	A
Mão do manipulador da ordenha	2,95	2,99	<2,00 (est)	4,81	5,87	A	A
Rejunte entre os azulejos da parede	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	3,81	5,28	A	A
Teteira 1	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	4,38	A	A
Teteira 2	3,91	3,92	<2,00 (est)	4,84	5,38	A	A
Ralos do laticínio	<1,00 (est)	3,28	<2,00 (est)	5,04	6,57 (est)	A	A
ESPONJA (0,1m²)	-----Log UFC/100cm²-----					Presença (P)/ausência (A) em 0,1m²	
Equipamentos do laticínio (superfície externa)	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	3,55	A	A
Tanque onde o leite pasteurizado fica armazenado	<1,00 (est)	3,60	<2,00 (est)	4,19	5,22	A	A
Tanque onde o leite cru fica armazenado para entrar no pasteurizador	<1,00 (est)	3,03	<2,00 (est)	3,04 (est)	3,77	A	A
Piso da câmara fria	>6,29 (est)	>6,29 (est)	<2,00 (est)	>7,81 (est)	>7,81 (est)	P	P
Parede da câmara fria	<1,00 (est)	3,86	<2,00 (est)	4,23	4,63	A	A
Piso do laticínio	<1,00 (est)	2,24 (est)	<2,00 (est)	4,13	4,43	A	A
Parede do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	A	A
Porta de entrada do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	A	A
Piso da ordenha	4,72	4,58	<2,00 (est)	>7,81 (est)	>7,81 (est)	A	A

(est) = valor estimado

APÊNDICE H – Dados da segunda coleta realizada no laticínio C (abril de 2011)

Amostra	Contaminantes						
	<i>E. coli</i>	Coliformes totais	<i>S. aureus</i>	Psicrotróficos	Mesófilos	<i>Listeria</i> sp.	<i>L. mono-cytogenes</i>
LEITE	-----Log UFC/mL-----					Presença (P)/ausência (A) em 25mL	
Cru sem refrigeração (logo após ordenha)	1,54 (est)	1,54 (est)	<2,00 (est)	3,82	3,87	A	A
Cru refrigerado estocado em tanque de expansão durante o final de semana para processamento na segunda-feira	>6,29 (est)	>6,29 (est)	<2,00 (est)	6,62 (est)	6,84 (est)	A	A
Tanque com leite cru refrigerado no laticínio	<1,00 (est)	4,90	<2,00 (est)	5,44	5,57	A	A
Pasteurizado	1,40 (est)	1,48 (est)	<2,00 (est)	3,42	3,39	A	A
SUPERFÍCIES							
SWAB (100cm ²)	-----Log UFC/100cm ² -----					Presença (P)/ausência (A) em 100cm ²	
Caixa plástica onde os sacos de leite são acomodados para transporte	<1,00 (est)	5,01	<2,00 (est)	6,5 (est)	6,82 (est)	A	A
Tanque de expansão localizado na sala de ordenha	<1,00 (est)	3,61	<2,00 (est)	6,32	6,42 (est)	A	A
Latão onde o leite foi transportado ao laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	A	A
SWAB (ÁREAS MENORES QUE 100cm ²)	-----Log UFC/superfície amostrada-----					Presença (P)/ausência (A) na superfície amostrada	
Maçaneta da câmara fria	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	5,59	4,95	A	A
Superfície interna da entrada da mangueira de transferência de leite para o latão	<1,00 (est)	5,23	<2,00 (est)	6,80 (est)	>7,81 (est)	A	A
Mão do manipulador da ordenha	4,91	4,93	<2,00 (est)	>7,81 (est)	7,19 (est)	A	A
Mão do manipulador do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	4,11	A	A
Rejunte entre os azulejos da parede	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	3,43	4,33	A	A
Teteira 1	3,59	3,76	<2,00 (est)	5,42	5,53	A	A
Teteira 2	4,38	4,48	<2,00 (est)	6,33	6,27	A	A
Ralos do laticínio	<1,00 (est)	4,87	<2,00 (est)	6,61 (est)	6,57 (est)	A	A
ESPONJA (0,1m ²)	-----Log UFC/100cm ² -----					Presença (P)/ausência (A) em 0,1m ²	
Equipamentos do laticínio (superfície externa)	<1,00 (est)	4,13	<2,00 (est)	4,34	4,40	A	A
Tanque onde o leite pasteurizado fica armazenado	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	2,65 (est)	A	A
Tanque onde o leite cru fica armazenado para entrar no pasteurizador	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	2,30 (est)	3,20 (est)	A	A
Piso da câmara fria	>6,29 (est)	>6,29 (est)	<2,00 (est)	>7,81 (est)	>7,81 (est)	P	P
Parede da câmara fria	<1,00 (est)	3,52	<2,00 (est)	>7,81 (est)	>7,81 (est)	P	P
Piso do laticínio	<1,00 (est)	2,83	<2,00 (est)	6,39	6,91 (est)	A	A
Parede do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	4,43	3,60	A	A
Porta de entrada do laticínio	<1,00 (est)	2,16 (est)	<2,00 (est)	3,84	3,54	A	A
Piso da ordenha	>6,29 (est)	>6,29 (est)	<2,00 (est)	>7,81 (est)	>7,81 (est)	A	A

(est) = valor estimado

APÊNDICE I – Dados da primeira coleta realizada no laticínio D (novembro de 2010)

Amostra	Contaminantes						
	<i>E. coli</i>	Coliformes totais	<i>S. aureus</i>	Psicrotróficos	Mesófilos	<i>Listeria</i> sp.	<i>L. mono-cytogenes</i>
LEITE	-----Log UFC/mL-----					Presença (P)/ausência (A) em 25mL	
Tanque de expansão do produtor D ₁	1,40 (est)	3,56	<2,00 (est)	5,00	5,08	A	A
Tanque de expansão do produtor D ₂	3,04	5,65 (est)	<2,00 (est)	6,89 (est)	6,48 (est)	A	A
Silo de armazenamento de leite cru no laticínio	1,40 (est)	3,93	3,00 (est)	6,08	6,20	P	A
Pasteurizado	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	4,18	A	A
SUPERFÍCIES							
SWAB (ÁREAS MENORES QUE 100cm ²)	-----Log UFC/superfície amostrada-----					Presença (P)/ausência (A) na superfície amostrada	
Esteira que os sacos de leite caem para serem acomodado em caixas plásticas	<1,00 (est)	1,85 (est)	<2,00 (est)	3,41	3,72	A	A
Mão do manipulador 1 do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	A	A
Mão do manipulador 2 do laticínio	<1,00 (est)	1,60 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	A	A
Mão do manipulador da ordenha (Produtor D ₁)	5,36	5,46 (est)	<2,00 (est)	6,43 (est)	>7,81 (est)	A	A
Teteira 1 (Produtor D ₁)	3,93	5,48 (est)	<2,00 (est)	6,65 (est)	6,81 (est)	A	A
Teteira 2 (Produtor D ₁)	3,18	4,11	<2,00 (est)	5,87	>7,81 (est)	A	A
Teteira (Produtor D ₂)	4,18	>6,29 (est)	<2,00 (est)	7,41 (est)	>7,81 (est)	A	A
Ralo da câmara fria	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	2,00 (est)	<2,00 (est)	A	A
Ralos do laticínio	<1,00 (est)	1,85 (est)	<2,00 (est)	7,11 (est)	7,36 (est)	A	A
Rejunte entre os azulejos da parede do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	3,85	4,54	A	A
ESPONJA (0,1m ²)	-----Log UFC/100cm ² -----					Presença (P)/ausência (A) em 0,1m ²	
Cortina plástica que separa a área de envase do leite e a câmara fria	<1,00 (est)	3,32	<2,00 (est)	6,82 (est)	5,08	A	A
Equipamentos do laticinio (superfície externa)	<1,00 (est)	>6,29 (est)	<2,00 (est)	6,86 (est)	6,79 (est)	A	A
Parede da câmara fria	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	6,56 (est)	3,53	A	A
Piso da câmara fria	<1,00 (est)	1,00 (est)	<2,00 (est)	3,92	3,77	A	A
Parede do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	3,08 (est)	3,08 (est)	A	A
Piso do laticínio	4,11	4,36	<2,00 (est)	6,43 (est)	6,30	A	A
Piso da ordenha (Produtor D ₂)	3,80	>6,29 (est)	<2,00 (est)	>7,81 (est)	>7,81 (est)	A	A
Latão da ordenha "balde ao pé" (Produtor D ₂)	1,45 (est)	5,90 (est)	<2,00 (est)	6,91 (est)	>7,81 (est)	A	A
Piso da ordenha (Produtor D ₁)	4,37	4,92	<2,00 (est)	6,83 (est)	>7,81 (est)	P	A
Porta de entrada do laticínio	2,30 (est)	5,61 (est)	<2,00 (est)	5,54	5,85	P	A

(est) = valor estimado

APÊNDICE J – Dados da segunda coleta realizada no laticínio D (junho de 2011)

Amostra	Contaminantes						
	<i>E. coli</i>	Coliformes totais	<i>S. aureus</i>	Psicrotróficos	Mesófilos	<i>Listeria</i> sp.	<i>L. mono-cytogenes</i>
LEITE	-----Log UFC/mL-----					Presença (P)/ausência (A) em 25mL	
Tanque de expansão do produtor D ₁	<1,00 (est)	1,23 (est)	<2,00 (est)	5,72	5,24	A	A
Tanque de expansão do produtor D ₂	<1,00 (est)	2,64	<2,00 (est)	5,01	5,80	A	A
Silo de armazenamento de leite cru no laticínio	3,04	4,88	3,00 (est)	>7,81 (est)	6,90 (est)	A	A
Pasteurizado	<1,00 (est)	2,51	<2,00 (est)	2,02 (est)	4,34	A	A
SUPERFÍCIES							
SWAB (ÁREAS MENORES QUE 100cm ²)	-----Log UFC/superfície amostrada-----					Presença (P)/ausência (A) na superfície amostrada	
Esteira que os sacos de leite caem para serem acomodado em caixas plásticas	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	A	A
Mão do manipulador 1 do laticínio	<1,00 (est)	2,45	<2,00 (est)	2,88 (est)	3,37	A	A
Mão do manipulador 2 do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	2,93 (est)	A	A
Mão do manipulador da ordenha (Produtor D ₁)	3,69	5,02	<2,00 (est)	6,60 (est)	>7,81 (est)	A	A
Mão do manipulador da ordenha (Produtor D ₂)	2,77	5,25	<2,00 (est)	5,74	>7,81 (est)	A	A
Teteira 1 (Produtor D ₁)	2,62	3,15	<2,00 (est)	5,41	5,89	A	A
Teteira 2 (Produtor D ₁)	4,64	4,81	<2,00 (est)	5,55	6,33	A	A
Teteira (Produtor D ₂)	3,07	5,19	<2,00 (est)	6,27	>7,81 (est)	A	A
Ralo da câmara fria	<1,00 (est)	4,35	<2,00 (est)	6,30	5,46	A	A
Ralos do laticínio	<1,00 (est)	5,22	<2,00 (est)	6,40	6,32	A	A
Rejunte entre os azulejos da parede do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	3,89	A	A
ESPONJA (0,1m ²)	-----Log UFC/100cm ² -----					Presença (P)/ausência (A) em 0,1m ²	
Cortina plástica que separa a área de envase do leite e a câmara fria	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	A	A
Equipamentos do laticínio (superfície externa)	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	4,43	4,40	A	A
Parede da câmara fria	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	A	A
Piso da câmara fria	<1,00 (est)	2,24 (est)	<2,00 (est)	3,75	3,93	A	A
Parede do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	A	A
Piso do laticínio	<1,00 (est)	2,34 (est)	<2,00 (est)	2,54 (est)	3,47	A	A
Piso da ordenha (Produtor D ₁)	4,89	5,01	<2,00 (est)	6,52 (est)	>7,81 (est)	A	A
Piso da ordenha (Produtor D ₂)	3,76	4,07	<2,00 (est)	6,95 (est)	>7,81 (est)	A	A
Latão da ordenha "balde ao pé" (Produtor D ₂)	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	3,23 (est)	3,56	A	A
Porta de entrada do laticínio	<1,00 (est)	3,92	<2,00 (est)	<2,00 (est)	4,72	A	A
Piso de entrada do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	A	A

(est) = valor estimado

APÊNDICE L – Dados da primeira coleta realizada no laticínio E (agosto de 2011)

Amostra	Contaminantes						
	<i>E. coli</i>	Coliformes totais	<i>S. aureus</i>	Psicrotróficos	Mesófilos	<i>Listeria</i> sp.	<i>L. mono-cytogenes</i>
LEITE	-----Log UFC/mL-----					Presença (P)/ausência (A) em 25mL	
Tanque de expansão do produtor E ₁	2,46	4,81	<2,00 (est)	3,44	6,02	A	A
Tanque de expansão do produtor E ₂	1,00 (est)	2,54	<2,00 (est)	2,65	5,90	A	A
Silo de armazenamento de leite cru no laticínio	1,17 (est)	4,52	<2,00 (est)	5,79	5,76	A	A
SUPERFÍCIES							
SWAB (ÁREAS MENORES QUE 100cm ²)	-----Log UFC/superfície amostrada-----					Presença (P)/ausência (A) na superfície amostrada	
Mão do manipulador 1 do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	A	A
Mão do manipulador 2 do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	2,30 (est)	<2,00 (est)	3,77	A	A
Mão do manipulador da ordenha (Produtor E ₁)	<1,00 (est)	1,00 (est)	<2,00 (est)	3,78	5,32	A	A
Teteira 1 (Produtor E ₁)	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	A	A
Teteira 2 (Produtor E ₁)	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	2,40 (est)	<2,00 (est)	A	A
Teteira (Produtor E ₂)	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	A	A
Ralo do laticínio	<1,00 (est)	3,42	<2,00 (est)	4,63	5,27	P	A
Rejunte entre os azulejos da parede do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	2,30 (est)	2,98 (est)	A	A
Esteira de envase das garrafas de leite	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	3,02	<2,00 (est)	A	A
Embaixo da esteira de envase das garrafas	<1,00 (est)	5,26	<2,00 (est)	5,89	6,77 (est)	A	A
Estrados no laticínio	<1,00 (est)	3,64	<2,00 (est)	4,51	4,05	A	A
ESPONJA (0,1m ²)	-----Log UFC/100cm ² -----					Presença (P)/ausência (A) em 0,1m ²	
Equipamentos do laticínio (superfície externa)	<1,00 (est)	1,24 (est)	<2,00 (est)	4,19	3,90	P	P
Porta da câmara fria	<1,00 (est)	1,18 (est)	<2,00 (est)	2,78 (est)	<2,00 (est)	A	A
Parede da câmara fria	<1,00 (est)	1,74 (est)	<2,00 (est)	5,47	7,30	A	A
Piso da câmara fria	2,33	2,47	<2,00 (est)	6,51	5,86	A	A
Porta de entrada do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	A	A
Parede do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	3,02 (est)	2,70 (est)	P	A
Piso do laticínio	<1,00 (est)	>6,29 (est)	<2,00 (est)	7,67 (est)	8,40 (est)	P	P
Piso da ordenha (Produtor E ₁)	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	4,00 (est)	A	A
Piso da ordenha (Produtor E ₂)	5,64	5,34	<2,00 (est)	7,04	7,59 (est)	A	A

(est) = valor estimado

APÊNDICE M – Dados da segunda coleta realizada no laticínio E (setembro de 2011)

Amostra	Contaminantes						
	<i>E. coli</i>	Coliformes totais	<i>S. aureus</i>	Psicrotróficos	Mesófilos	<i>Listeria</i> sp.	<i>L. monocytogenes</i>
LEITE	-----Log UFC/mL-----					Presença (P)/ausência (A) em 25mL	
Tanque de expansão do produtor E ₁	5,01	>6,29 (est)	<2,00 (est)	>7,81 (est)	5,02	A	A
Tanque de expansão do produtor E ₂	2,60	5,07	<2,00 (est)	3,35	5,77	A	A
Silo de armazenamento de leite cru no laticínio	<1,00 (est)	1,69 (est)	<2,00 (est)	>7,81 (est)	>7,81 (est)	A	A
SUPERFÍCIES							
SWAB (ÁREAS MENORES QUE 100cm²)	-----Log UFC/superfície amostrada-----					Presença (P)/ausência (A) na superfície amostrada	
Mão do manipulador 1 do laticínio	<1,00 (est)	1,54 (est)	<2,00 (est)	3,56	3,54	A	A
Mão do manipulador 2 do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	3,86	3,56	A	A
Mão do manipulador da ordenha (Produtor E ₁)	4,33	4,50	<2,00 (est)	5,66	6,14	A	A
Teteira 1 (Produtor E ₁)	2,47	3,02	2,48 (est)	5,07	5,84	A	A
Teteira 2 (Produtor E ₁)	<1,00 (est)	1,60 (est)	<2,00 (est)	3,41	4,32	A	A
Teteira (Produtor E ₂)	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	2,40 (est)	<2,00 (est)	A	A
Ralo do laticínio	<1,00 (est)	>6,29 (est)	<2,00 (est)	7,38	>7,81 (est)	P	P
Rejunte entre os azulejos da parede do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	2,60 (est)	3,02 (est)	A	A
Esteira de envase das garrafas de leite	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	5,83	4,92	A	A
Embaixo da esteira de envase das garrafas	2,31	<1,00 (est)	<2,00 (est)	7,04	>7,81 (est)	A	A
Estrados no laticínio	2,44	>6,29 (est)	<2,00 (est)	6,3	5,72	A	A
ESPONJA (0,1m²)	-----Log UFC/100cm ² -----					Presença (P)/ausência (A) em 0,1m ²	
Equipamentos do laticínio (superfície externa)	<1,00 (est)	3,93	<2,00 (est)	4,68	4,61	A	A
Porta da câmara fria	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	2,93 (est)	A	A
Parede da câmara fria	<1,00 (est)	2,54 (est)	<2,00 (est)	3,75	3,50	A	A
Piso da câmara fria	4,34	>6,29 (est)	<2,00 (est)	8,22 (est)	6,44 (est)	P	A
Porta de entrada do laticínio	<1,00 (est)	<1,00 (est)	<2,00 (est)	<2,00 (est)	2,40 (est)	A	A
Parede do laticínio	<1,00 (est)	2,79	<2,00 (est)	6,53	5,00	A	A
Piso do laticínio	3,10	>6,29 (est)	<2,00 (est)	6,86 (est)	6,51 (est)	P	P
Piso da ordenha (Produtor E ₁)	>6,29 (est)	>6,29 (est)	<2,00 (est)	7,89 (est)	7,83 (est)	A	A
Piso da ordenha (Produtor E ₂)	5,11	5,26	<2,00 (est)	7,72 (est)	7,97 (est)	A	A

(est) = valor estimado

10. ANEXO

ANEXO 1 - Árvore decisória de APPCC.

* Prossiga para o próximo perigo; PCC: perigo crítico de controle.
Fonte: FAO/WHO.