

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

PESQUISA DE *Listeria monocytogenes* NO LEITE BOVINO DE
CONJUNTO DE PROPRIEDADES DE AGRICULTURA FAMILIAR

Gabriela Capriogli Oliveira

Botucatu-SP

Agosto de 201

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

PESQUISA DE *Listeria monocytogenes* NO LEITE BOVINO DE
CONJUNTO DE PROPRIEDADES DE AGRICULTURA FAMILIAR

Gabriela Capriogli Oliveira

Dissertação apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Helio Langoni

Co-Orientador: Dr. Felipe de Freitas Guimarães

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Oliveira, Gabriela Capriogli.

Pesquisa de *Listeria monocytogenes* no leite bovino de conjunto de propriedades de agricultura familiar / Gabriela Capriogli Oliveira. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Helio Langoni

Coorientador: Felipe de Freitas Guimarães

Capes: 50502000

1. Vaca. 2. *Listeria monocytogenes*. 3. Listeriose.
4. Leite - Contaminação. 5. Saúde pública. 6. Segurança alimentar.

Palavras-chave: Leite cru; Listeriose; Tanque de expansão coletivo; Vacas.

Ativa
Acesse
ativar

Nome do Autor: Gabriela Capriogli Oliveira

Título: PESQUISA DE *Listeria monocytogenes* NO LEITE BOVINO DE CONJUNTO DE PROPRIEDADES DE AGRICULTURA FAMILIAR

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Helio Langoni
Presidente e Orientador
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP - Botucatu

Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis
Membro
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP - Botucatu

Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall
Membro
Departamento de Microbiologia e Imunologia
IBB – UNESP – Botucatu

Data da Defesa: 10 de agosto de 2017.

***Dedico este trabalho aos meus pais,
Que sempre me incentivaram, investiram e acreditaram em mim***

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela minha vida, pela minha família, por ser tão presente em nossas vidas, pela ternura que tem para conosco, por nunca nos deixar faltar nada;

Aos meus pais pela dedicação, motivação e amor, vocês são o melhor exemplo de vida e família que já tive; e pai, você é o melhor médico veterinário que eu já conheci! Quisera eu um dia ser assim como vocês;

Às minhas irmãs tão queridas e amadas, Cecília e Carlos Eduardo (marido é parte oficial da família), Serena e Vitória, por serem minhas melhores amigas e companheiras da vida. Por tudo que fizeram por mim, em especial nesse período que estive em Botucatu. A minha vida não teria a menor graça sem vocês;

Ao meu noivo Rodolfo, pelo carinho, amor, paciência e compreensão. Ter você me apoiando e se dedicando sempre que precisei foi um presente nesse tempo. Obrigada por deixar meus dias mais leves e minha vida mais completa;

Aos meus avós Lucy e Carlos, Cila e Milton e à minha madrinha Magda, pelo incentivo, por serem tão presentes, pela coragem de levar adiante a nossa família, por toda saudade e recepção carinhosa nas minhas idas e vindas durante esses anos que estive fora de casa;

Aos meus padrinhos, tios, primos, amigos e professores tão queridos de Tambaú, Jaboticabal e Botucatu pela amizade e suporte. Muito obrigada mesmo! Vocês estarão gravados para sempre em minha memória e no coração;

Aos amigos e colegas de trabalho do NUPEMAS-FMVZ-UNESP-BOTUCATU, pela convivência, pelas experiências compartilhadas, pelos momentos de descontração, pela ajuda durante o desenvolvimento do meu projeto. Agradeço em especial à minha amiga, colega de sala e irmã de república, Nathália (Gelada): foi um privilégio conviver e dividir com você esses nove anos;

Aos funcionários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, especialmente ao Benedito e Dona Rita pelo apoio e amizade;

Ao meu orientador Prof. Helio Langoni, e ao meu co-orientador Dr. Felipe de Freitas Guimarães, pela oportunidade, por acreditarem no meu potencial e acompanharem meus passos desde o estágio curricular, durante a residência e no mestrado;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para a realização desse projeto (Processo FAPESP 2015/11571-4).

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1-	Oligonucleotídeos e suas propriedades, utilizados na confirmação da espécie <i>L. monocytogenes</i> , pela técnica de PCR. Botucatu, SP, 2016-2017.....	16
-----------	---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Colônias azuis sugestivas de isolamento de <i>Listeria monocytogenes</i> no ágar ALOA de amostras de leite de conjunto bovino. Botucatu, SP, 2016-2017.....	17
Figura 2-	Colônias de micro-organismos contaminantes e pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> no ágar ALOA de amostras de leite de conjunto bovino. Botucatu, SP, 2016-2017.....	17
Figura 3-	Colônias pretas sugestivas de isolamento de <i>Listeria monocytogenes</i> no ágar PALCAM de amostras de leite bovino de conjunto. Botucatu, SP, 2016-2017.....	18
Figura 4-	Cultivo de leite cru contaminado com <i>L. monocytogenes</i> e <i>E. coli</i> em ágar PALCAM (1) e ALOA (2) de amostras de leite bovino de conjunto. Botucatu, SP, 2016-2017.....	18
Figura 5-	Cultivo de leite cru contaminado experimentalmente com <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> em ágar PALCAM (1) e ALOA (2) de amostras de leite bovino de conjunto. Botucatu, SP, 2016-2017.....	19

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1- INTRODUÇÃO.....	3
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 O gênero <i>Listeria</i>	5
2.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	6
2.3 Listeriose humana no Brasil e no mundo.....	7
2.4 Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> do leite.....	8
2.5 Manifestações clínicas da listeriose em ruminantes.....	10
2.6 Manifestações clínicas da listeriose em humanos.....	11
3- OBJETIVOS.....	13
3.1 Gerais.....	13
3.2 Específicos.....	13
4- MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1. Propriedades e obtenção das amostras.....	13
4.2. Detecção da presença de <i>Listeria</i> spp. por cultivo microbiano.....	14
4.3. Extração do DNA.....	15
4.3.1 Diretamente do Leite.....	15
4.3.2 Caldo de Enriquecimento- LEB.....	15
4.4 Amplificação do ácido nucléico (PCR).....	16
4.5 Visualização dos produtos amplificados.....	16
5- RESULTADOS.....	17
6- DISCUSSÃO.....	20
7- CONCLUSÕES.....	23
8- REFERÊNCIAS.....	24
APÊNDICE A	33
TRABALHO CIENTÍFICO.....	36

OLIVEIRA, G. C. **Pesquisa de *Listeria monocytogenes* no leite bovino de conjunto de propriedades de agricultura familiar**. 2017. 35 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Câmpus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

RESUMO

A refrigeração é um importante método de conservação do leite, porém quando ocorre por longo período, a qualidade desse produto pode ser alterada devido, principalmente, a multiplicação de bactérias psicrotróficas. Dentro desse grupo de micro-organismos, entre os gêneros patogênicos, destaca-se *Listeria monocytogenes*. A identificação deste patógeno em alimentos é de interesse não somente pelos efeitos nocivos aos animais, mas também pelos efeitos na saúde humana. O objetivo do presente estudo foi investigar a presença de *L. monocytogenes* em 95 amostras de leite bovino de conjunto de pequenas propriedades leiteiras de agricultura familiar. As amostras de leite foram cultivadas nos meios seletivos de PALCAM e ALOA e as colônias características foram avaliadas por métodos fenotípicos e moleculares, pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para detecção de *L. monocytogenes*. Apesar dos resultados negativos no cultivo e na PCR, a patogenicidade de *L. monocytogenes* para os animais e os riscos em saúde pública, justificam estudos continuados para vigilância epidemiológica do agente em produtos de origem animal como o leite.

Palavras-chave: leite cru, listeriose, vacas, tanque de expansão coletivo

OLIVEIRA, G. C. **Research of *Listeria monocytogenes* in the bovine milk of family farms.** 2017. 35p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

ABSTRACT

Refrigeration is an important milk preservation method. However, milk quality may deteriorate if the product is refrigerated for long periods, mainly due to the growth of psychrotrophic bacteria. This group of microorganisms includes pathogenic genera, most notably *Listeria monocytogenes*. The detection of this bacterium in food is important, given its pathogenic effects on human and animal health and also its economic relevance. This study focused on detecting the presence of *L. monocytogenes* in milk samples collected at small family-owned dairy farms. Samples were cultivated on PALCAM and ALOA agars for microbiological analysis and a molecular analysis by polymerase chain reaction (PCR) was performed for the detection of *L. monocytogenes*. Despite the negative results obtained in both these analyses, further studies are recommended to confirm or refute the negligible effect of *L. monocytogenes* on small dairy farms.

Key words: raw milk, listeriosis, bovine, bulk tank milk

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem se destacado com relação à produção leiteira. Em 2014, foi o 4º maior produtor do mundo alcançando 5% da produção mundial com 35 bilhões de litros (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2015). Apesar desse aspecto positivo com relação à produção, há ainda uma preocupação quanto à qualidade do leite. Para tanto, a Instrução Normativa de número 62 (IN 62) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu critérios para garantir a inocuidade desse alimento (BRASIL, 2011).

Devido à sua composição e suas características nutritivas, o leite é considerado um excelente meio para a multiplicação de micro-organismos patogênicos ou deteriorantes, que podem comprometer a qualidade e alterar seus componentes (MERUSSI et al., 2013), tornando-o uma via de transmissão de agentes patogênicos e de suas toxinas para os humanos (DE FREITAS GUIMARÃES et al., 2013).

Muitas doenças transmitidas por alimentos (DTAs) não são de notificação compulsória no Brasil, dificultando o reconhecimento e a estimativa das mesmas como problema de saúde pública. Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde, entre 2000 e 2011 foram notificados 8.663 surtos de DTAs responsáveis por doença em 163.425 brasileiros, dos quais 112 foram a óbito. No entanto, o perfil epidemiológico das DTAs ainda é pouco conhecido e apenas alguns estados apresentam dados estatísticos sobre os agentes infecciosos presentes nos alimentos (BRASIL, 2010; YAMAGUCHI et al., 2013).

A contaminação bacteriana do leite cru de vacas pode ocorrer no próprio animal, ou pode estar relacionada ao meio ambiente e ao manejo na linha de produção. Todas essas situações estão diretamente relacionadas à obtenção higiênica do leite (SILVEIRA; BERTAGNOLLI, 2014). São vários os aspectos que devem ser abordados, como por exemplo, a qualidade da água utilizada na desinfecção de equipamentos, de ordenha e do animal, uso correto de sanitizantes, higiene do ordenhador e das instalações (LANGONI, 2013).

Um método eficiente para conservação do leite cru é a refrigeração. No Brasil, a IN 62 estabeleceu novas condições de sanidade, higiene e nutrição animal, além de normas atualizadas para conservação do leite e refrigeração (BRASIL, 2011). Com isso, a qualidade desse alimento pode ser garantida desde a ordenha, com boas práticas de higiene em vacas saudáveis e bem alimentadas, seguida da refrigeração do leite na

propriedade e seu transporte a granel em tanques isotérmicos até a indústria (MARTINS; REIS, 2014). No processo de conservação a frio, a IN 62 preconiza que o leite seja refrigerado à temperatura igual ou inferior a 4°C em tanque de refrigeração por expansão direta e o tempo transcorrido entre o início da ordenha e o encaminhamento da matéria-prima para o estabelecimento que irá beneficiá-la deve ser no máximo 48 horas (BRASIL, 2011).

Se refrigerado por longos períodos, o leite cru pode perder a qualidade, devido a proliferação de bactérias psicrotróficas (MARTINS; REIS, 2014). Esses micro-organismos podem se desenvolver em temperaturas abaixo de 7°C, embora o desenvolvimento varie entre diferentes espécies (SØRHOUG; STEPANIAK, 1997). A água de má qualidade, deficiência nos procedimentos de higiene e a mastite bovina favorecem a contaminação (JAY, 2000; ENEROTH; AHRNÉ; MOLIN, 2000; MURPHY; BOOR, 2000).

Bactérias psicrotróficas produzem enzimas termorresistentes que causam proteólise e lipólise, diminuindo o valor econômico do leite já que suas proteínas funcionais e gordura são alteradas pelas proteases, lipases e fosfolipases (CHEN et al., 2003; MA; BARBANO, 2003; ARCURI et al., 2008). Esses micro-organismos podem causar alterações no sabor de diversos produtos e redução no rendimento de seus subprodutos, como o queijo (CHEN et al., 2003).

Essas bactérias podem ser também a causa de diferentes DTAs, sendo veiculadas por produtos lácteos, pelo leite cru e até mesmo pasteurizado. No grupo dos micro-organismos psicrotróficos patogênicos encontram-se *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e algumas cepas de *Bacillus cereus* (SHAH, 1994; SØRHOUG; STEPANIAK, 1997).

A relevância nutricional do leite como alimento essencial em diversas fases do desenvolvimento humano reforça a importância de pesquisas que contribuam no esclarecimento de fatores relacionados aos micro-organismos psicrotróficos, que podem comprometer a qualidade dos alimentos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Listeria*

Listeria spp. é um micro-organismo anaeróbico facultativo (PICCHI et al., 1999) amplamente disseminado na natureza, descrito pela primeira por Murray et al. (1926) causando doenças em cobaias e coelhos de laboratório na Universidade de Cambridge.

As bactérias do gênero *Listeria* são catalase positiva, oxidase negativa, fermentadoras de glicose, hidrolisam esculina e possuem diâmetro de 0,4 a 0,5µm e comprimento de 0,51 a 2,0µm. As diferenças entre as espécies baseiam-se em testes de fermentação de carboidratos e produção de hemólise em ágar sangue (QUINN et al., 2011). São classificadas como psicotróficas, por possuírem capacidade de multiplicação em temperatura de refrigeração (JAY, 2000).

São conhecidas 23 espécies, incluindo subespécies: *L. aquatica*, *L. booriae*, *L. cornellensis*, *L. denitrificans*, *L. fleischmannii*, *L. fleischmannii* subsp. *coloradonensis*, *L. fleischmannii* subsp. *fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. grandensis*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*, *L. ivanovii* subsp. *londonensis*, *L. marthii*, *L. monocytogenes*, *L. murrayi*, *L. newyorkensis*, *L. riparia*, *L. rocourtiae*, *L. seeligeri*, *L. weihenstephanensis*, *L. innocua*, *L. welshimeri* (DSMZ, 2017). *L. monocytogenes* tem sido amplamente estudada por ser o agente etiológico da listeriose em animais e em humanos, associada a casos de abortamentos e doenças neurológicas (MANTILLA et al., 2007).

Além da espécie *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii* também já foram isoladas em alimentos e no ambiente (JAY, 2000; MCLAUCHLIN, 1997). Apesar de a literatura ter registrado raros casos de listeriose por *L. ivanovii* e *L. seeligeri*, estas espécies são consideradas não patogênicas (KLIMA; MONTVILLE, 1995), sendo *L. monocytogenes* a única de potencial patogênico para humanos, com diferentes sorotipos (PICCHI et al., 1999).

2.2 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes multiplica-se em temperaturas variáveis de 2,5 °C a 45°C, em meios seletivos (OLIVEIRA et al., 2010; QUINN et al., 2011). Tolerar valores de pH entre 5,5 e 9,6. Frequentemente é encontrada em ambientes agrícolas, tendendo a resistir por longos períodos no solo. É veiculada por alimentos e por água (FOX et al., 2009;

QUINN et al., 2011). Apresenta motilidade característica com forma de “guarda chuva” em meio para motilidade incubado entre 20 a 25°C.

As análises bioquímicas para diferenciação de outras espécies são baseadas na fermentação de açúcares como D-glucose, D-xilose, D-manitol e L-rhamnose e, em ágar sangue apresentaram teste *like*-Camp positivo com *S. aureus* com hemólise com aspecto de “ponta de cotonete” (QUINN et al., 2011).

Atualmente *L. monocytogenes* é detectada segundo o método da ISO 11290-1, em que o meio de cultura ALOA (Ágar Listeria segundo Ottaviani e Agosti) é o meio de eleição, podendo ser utilizado junto ao ágar PALCAM (Polymyxina-acriflavina-LiCl-ceftazidimaesculina-manitol) ou Oxford, além de testes bioquímicos para confirmação da espécie (VLAEMYNCK et al., 2000).

Essa bactéria geralmente resiste a congelamento e descongelamento sucessivos e a diversos tratamentos de desinfecção, sendo sensível à pasteurização (YAMAGUCHI et al., 2013). É capaz de formar biofilmes em alimentos e superfícies. Tal fato lhe confere permanência, muitas vezes em partes inacessíveis dos equipamentos industriais (PAN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2010), sendo apontada como potencial fonte de contaminação dos tanques de expansão de leite (LATORRE et al., 2010).

L. monocytogenes apresenta 14 grupos sorológicos, dentre os quais, os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b são os principais responsáveis por casos de listeriose em humanos (DA SILVA et al., 2011; BARANCELLI et al., 2011). Pesquisa realizada no período compreendido entre 1969 e 2000 revelou que o sorotipo 4b é o mais incidente (DA SILVA et al., 2011). Os sorotipos 4b e 1/2b são bons formadores de biofilme (DJORDJEVIC et al., 2002; CHAE et al., 2006), apresentando impacto negativo para a indústria de laticínios bem como no contexto de saúde pública.

2.3 Listeriose humana no Brasil e no mundo

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América (CDC, 2013), a listeriose é uma doença rara. No entanto, a hospitalização é muito mais comum do que em outras infecções alimentares, representando a terceira causa de morte entre os principais patógenos comumente transmitidos por alimentos.

No Brasil, a listeriose humana não é enfermidade de notificação obrigatória e, além de subdiagnosticada, provavelmente, é também subnotificada (BARANCELLI et al., 2011). Até o momento, não se tem registros de surtos da listeriose como DTA,

embora *L. monocytogenes* já tenha sido encontrada em produtos cárneos, lácteos e vegetais (BORGES et al., 2009; LECLERCQ et al., 2010; BARANCELLI et al., 2011). De acordo com a literatura consultada, a ocorrência de infecções humanas por *L. monocytogenes* está associada na maioria das vezes com leite e derivados, sendo os queijos frescos e o leite cru os mais frequentemente contaminados (BORGES et al., 2009; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009; RAHIMI et al., 2010; JAMALI et al., 2013).

A frequência de isolamentos de *L. monocytogenes* é muito variável. No Brasil, Langoni e Fonseca (1997) obtiveram 7,01% de positividade para *L. monocytogenes* em amostras de leite cru oriundas de casos de mastite subclínica e clínica, a partir da utilização de diferentes meios de cultura e enriquecimento das amostras. Sousa et al. (2006) relataram que dentre 70 amostras de queijo coalho, 17% apresentavam o patógeno. Da Silva et al. (2011) analisando diferentes tipos de queijos no país, encontraram o agente variando de 0 a 48,3%, no período compreendido entre 2000 e 2009, com predomínio em queijo minas frescal. Muitos pesquisadores não isolaram esse patógeno em leite cru ou em produtos lácteos (PADILHA et al., 2001; NERO et al., 2004; ARCURI et al., 2006; CAMARGO, 2010; TAMANINI et al., 2012).

Mundialmente, *L. monocytogenes* tem sido relatada com frequência em alimentos (KARTHIKEYAN et al., 2015). Nos Estados Unidos da América, *L. monocytogenes* está entre os 31 principais patógenos que causam 9,4 milhões de casos de DTAs anualmente (SCALLAN et al., 2011). O CDC notificou entre 2009 e 2011, 292 mortes e perdas fetais por listeriose em 38 estados dos EUA. Em setembro de 2012 ocorreu um surto de listeriose provocado por queijo contaminado com *L. monocytogenes* em 11 diferentes estados dos EUA com 14 pessoas infectadas e 3 mortes (WONG, 2013), reforçando a importância desse patógeno na saúde pública.

Recentemente na Etiópia, Derra et al. (2013) detectaram 3,42% de amostras de leite cru positivas para *L. monocytogenes*. Da mesma forma, Karthikeyan et al. (2015) obtiveram 15 isolados de *L. monocytogenes* entre 307 amostras de leite e produtos lácteos avaliados. Independentemente da origem do patógeno deve-se destacar a importância de *L. monocytogenes* para a indústria de laticínios bem como para a saúde pública.

A Índia também apresenta histórico de registros de *L. monocytogenes* no leite cru e em estabelecimentos de processamento de leite, com prevalências que variam entre 5,1% e 8,57% de amostras positivas (BHILEGAONKAR et al., 1997;

BARBUDDHE et al., 2002; KALOREY et al., 2008; DOIJAD et al., 2011). Da mesma forma, na Espanha, Gaya et al. (1998) analisando 774 amostras de leite, encontraram 3,6% de positividade para *L. monocytogenes*. Entre 2009 e 2012, registraram-se 7 episódios de listeriose por ano na população do País Basco, no norte da Espanha; e entre janeiro de 2013 e fevereiro de 2014, ocorreram 27 episódios de listeriose nessa mesma região (PÉREZ-TRALLERO et al., 2014).

Os registros de surtos e casos de listeriose na União Europeia (UE) são alarmantes e o leite e produtos lácteos estavam envolvidos em 50% dos casos, afetando em especial a população de idosos (53% dos casos), demonstrando a importância epidemiológica do leite na transmissão, pois ocorreram muitos casos da forma clínica grave da enfermidade (SANAA et al., 2004; TODD; NOTERMAN, 2011). Na França, entre 1999 e 2005, foram registrados de 3,5 a 4,5 casos/1 milhão de pessoas e somente no ano de 2006, 4,7 casos/1 milhão de pessoas (GOULET et al., 2008). Em 2006, a UE registrou surto de *L. monocytogenes* envolvendo pelo menos seis pessoas na Alemanha, pelo consumo de queijo tipo Hartz contaminado (TODD; NOTERMAN, 2011).

No Irã, Jamali et al. (2013) examinaram 446 amostras de leite cru oriundas de bovinos, caprinos e ovinos, das quais 21,7% estavam contaminadas com *L. monocytogenes*.

2.4 Detecção de *Listeria monocytogenes* no leite

Devido à preocupação com as consequências da listeriose para a saúde da população, têm sido realizadas pesquisas para detecção da *L. monocytogenes* em alimentos, especialmente em produtos cárneos, produtos lácteos e verduras (CDC, 2013).

Diversas formas de detecção da bactéria no leite e seus derivados têm sido utilizadas na tentativa de encontrar o método mais rápido e financeiramente viável. A metodologia descrita pela *Food and Drug Administration* (FDA) é comumente utilizada em pesquisas e a mais aceita pela comunidade científica: realiza-se homogeneização da amostra em caldo enriquecido para *Listeria* (LEB), adicionado de acriflavina, ácido nalidíxico, cicloheximida, seguido de incubação, e posteriormente, cultivado em ágar PALCAM ou Oxford. Catão e Ceballos (2001) encontraram 33 (73,3%) amostras de leite cru contaminadas por *Listeria* spp., das quais *L. monocytogenes* foi isolada de 26 (61,9%), seguindo essa metodologia.

Peres et al. (2010) da mesma forma, cultivaram amostras de leite desnatado e leite cru integral, contaminadas experimentalmente com *L. monocytogenes*, em ágar PALCAM, e ágar Oxford, reisolaram ainda colônias características de *Listeria* spp. em Ágar Triptona com Extrato de Levedura (TSAYE), para avaliação da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) como opção de redução de tempo na detecção de *L. monocytogenes* no leite, obtendo resultados positivos no cultivo realizado com a metodologia tradicional (Peres et al., 2010).

Rossi et al. (2010) utilizaram o caldo LEB para enriquecer amostras de queijo minas frescal, transferindo o inóculo, posteriormente, para caldo Fraser, com inoculação em ágar Oxford, segundo a Resolução da Diretoria Colegiada- RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA (BRASIL, 2001), embora não tenham identificado *L. monocytogenes* em nenhuma das amostras analisadas.

Outro método de cultivo foi testado por Bang et al. (2013), que determinaram condições de enriquecimento dos meios de cultura para isolamento de *L. monocytogenes* de leite UHT comercial, utilizando os meios TSBYE, BHI e Caldo UVM. Os resultados apontaram que o meio UVM foi melhor do que o TSBYE ou o BHI, e que o isolamento de *L. monocytogenes* pode ser inibido quando outros tipos de bactérias estão presentes.

A identificação de *L. monocytogenes* no leite cru é dificultada, pelas baixas contagens da bactéria no produto e a competição com demais bactérias (BARANCELLI et al., 2011). Desta forma, para seu diagnóstico, a técnica de PCR é considerada mais sensível do que o cultivo convencional em placa, porém pode apresentar resultados falso-positivos, pois o DNA detectado pode ter sido amplificado a partir de células mortas (BARANCELLI et al., 2011).

Paul et al. (2015) adaptaram um método previamente desenvolvido para detecção direta, de *Escherichia coli* O157: H7, sem enriquecimento, adaptado para *L. monocytogenes*, em amostras de leite cru, porém a sensibilidade da qPCR foi baixa, apontando a necessidade de aprimoramento na técnica.

2.5 Manifestações clínicas da listeriose em ruminantes

A listeriose ocorre em todo o mundo em diferentes espécies animais. Foi diagnosticada inicialmente em 1939 como causa de abortamento em bovinos

(KIRKBRIDE, 1993). Devido a susceptibilidade dos ruminantes ao agente, animais alimentados com silagem mal fermentada com pH alcalino (acima de 5,5), podem se infectar, facilitando a proliferação da bactéria (GEORGE, 2002). Os animais infectados assintomáticos podem ser fontes de infecção, eliminando o agente principalmente pelas fezes e pelo leite (LEHNERT, 1988; SCHNEIDER, 2004).

As três formas clínicas mais comuns de listeriose em ruminantes são a neurológica, septicêmica e a reprodutiva. A forma neurológica pode provocar meningoencefalite em animais adultos e meningites em animais jovens, enquanto a septicêmica, causa de abscessos hepáticos e esplênicos em fetos de ruminantes domésticos, silvestres e outros animais. Na forma reprodutiva tem-se abortamentos, morte perinatal, endometrite e placentite esporádica em bovinos e caprinos, com alguns surtos em ovinos (SCHILD, 2007; CZUPRYNSKI et al., 2010). Geralmente, em surtos, observa-se apenas uma dessas três formas (RISSI et al., 2006).

A apresentação da forma neurológica da doença nos ruminantes depende do local e da gravidade da lesão, caracterizando-se por baixa morbidade e alta letalidade (SCHNEIDER, 2004). Os animais podem apresentar apatia, posição da cabeça para baixo, paralisia auricular e facial uni ou bilateral, midríase, anorexia, disfagia, ranger de dentes, protrusão da língua, paralisia dos músculos da face, sialorreia, nistagmo, cegueira e ceratoconjuntivite. Esta forma é observada com maior frequência nos bovinos (SANCHES et al., 2000; MORIN, 2004; BARROS et al., 2006; GALIZA et al., 2010). Com a evolução dos casos, pode ocorrer síndrome vestibular, com andar em círculos, apoio do corpo em obstáculos, incoordenação dos membros pélvicos, decúbito, tremores, opistótono e morte (SANCHES et al., 2000; RISSI et al., 2006; CZUPRYNSKI et al., 2010).

Na forma septicêmica são observados sinais inespecíficos como febre, anorexia, abscesso em vísceras, debilidade progressiva, diarreia e morte em até sete dias. Esta manifestação ocorre geralmente em neonatos e fetos de ruminantes e suínos, sendo menos comumente observada em monogástricos (SCHNEIDER, 2004).

A listeriose com envolvimento reprodutivo em bovinos caracteriza-se por abortamentos no terceiro trimestre de gestação. Apresenta fase de bacteremia que é subclínica, podendo haver febre e anorexia como resultado de metrite e retenção de placenta (ANDERSON, 2012).

Em vacas em lactação há raros relatos de casos de mastites por *L. monocytogenes* (HUNT et al., 2012).

2.6 Manifestações clínicas da listeriose em humanos

A listeriose em humanos acomete principalmente idosos e pacientes imunocomprometidos (BESSE et al., 2005). Está associada à altas taxas de letalidade, atingindo 40% no último grupo (BRITO, 2003). A enfermidade se manifesta de modo semelhante à gripe, com sinais gastrintestinais inespecíficos, podendo resultar em gastroenterites, meningite, septicemia, abortamentos, abscessos, endocardites e infecções perinatais (QUINN et al., 2011; DA SILVA et al., 2011).

A transmissão da listeriose dos animais para humanos ocorre pela ingestão de alimentos contaminados, mas pode ser adquirida por via ocular, respiratória ou genital. A enfermidade apresenta-se sob duas formas, a listeriose invasiva e não invasiva.

O período de incubação na forma invasiva varia entre 30 a 90 dias e, não raro, observa-se infecção no sistema nervoso central, com consequente meningite ou meningoencefalite (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Em mulheres grávidas, ocorre infecção placentária podendo resultar em abortamentos, natimortos, partos prematuros ou infecções perinatais. Cerca de 10% dos neonatos acometidos podem apresentar sequelas (ROCOURT; COSSART, 1997; VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; SIEGMAN-IGRA et al., 2002). A infecção transplacentária e a transmissão a partir do canal vaginal durante o nascimento são as principais causas de infecções perinatais e neonatais (GAHAN; COLLINS, 1991). As gestantes, inicialmente, não apresentam sintomatologia característica. Os sinais são semelhantes aos de um resfriado, com febre, mialgia e cefaleia (DOGANAY, 2003).

A listeriose não invasiva pode provocar gastroenterites com febre (SALAMINA et al., 1996; DALTON et al., 1997), após período de incubação, de 18 a 20 horas. A gastroenterite febril geralmente é uma infecção autolimitante que afeta indivíduos após a ingestão de alimentos contaminados com alta carga bacteriana (OOI; LORBER, 2005) e, em casos mais graves, pode causar endocardite com taxa de mortalidade de até 50% (VASQUEZ-BOLAND et al., 2001; DOGANAY, 2003; ARRUDA, 2007).

Existem relatos de listeriose cutânea, casos de conjuntivite e forma pneumônica verificados em indivíduos que tiveram contato direto com animais infectados. Entre os sinais e sintomas, observa-se septicemia no período pré-natal, síndrome de mononucleose, septicemia, abscessos localizados, lesões cutâneas papular ou pustular, conjuntivite, uretrite, danos cerebrais e retardamento mental (PEARSON; MARTH, 1980).

Tendo em vista os aspectos de saúde pública referentes ao crescimento e alta contagem de bactérias psicotróficas em amostras de leite, em especial quando estocadas refrigeradas, e ainda o potencial zoonótico da *L. monocytogenes* e o risco de contaminação de derivados lácteos e do próprio leite cru, há a necessidade de uma supervisão contínua e monitoramento do rebanho com relação à presença de micro-organismos patogênicos, além da avaliação das condições higiênicas e qualidade da alimentação dos animais. Considerando-se ainda a IN 62 (BRASIL, 2011), é importante o monitoramento da qualidade do leite cru desde a sua obtenção na propriedade até o seu beneficiamento na indústria de laticínios visando atenção à saúde pública, oferecendo à população produtos de melhor qualidade.

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais

Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em amostras de leite bovino cru de pequenas propriedades leiteiras de agricultura familiar.

3.2 Específicos

Avaliar o isolamento de *L. monocytogenes* em meios seletivos de ágar PALCAM e ALOA, antes e após a refrigeração a 4°C por 48 horas, mimetizando as condições de refrigeração em tanques de expansão na propriedade;

Detectar *L. monocytogenes* por técnica molecular (PCR) nas amostras de leite, antes e após refrigeração a 4°C por 48 horas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Propriedades e obtenção das amostras

Foram utilizadas 95 amostras de leite de conjunto de 19 propriedades da agricultura familiar, que depositavam leite em tanque de expansão comunitário, localizado na Baixada Serrana do Município de Botucatu-SP. As 19 propriedades foram escolhidas por conveniência e de acordo com o interesse dos proprietários. Foi aplicado um breve questionário simplificado (Apêndice A) para avaliação do manejo e procedimentos para obtenção do leite nas diferentes propriedades.

Todas as propriedades tinham o leite como atividade econômica principal, utilizando pastagem como sistema de produção. As vacas eram de raça mestiça, e o leite de conjunto sempre armazenado em latões sendo, posteriormente, misturado no tanque de expansão comunitário. Nenhuma das propriedades recebia assistência técnica e tampouco bonificação por qualidade. Não realizavam *California Mastitis Test* (CMT) e não estabeleciam linha de ordenha.

Foram obtidas assepticamente amostras de 50 mL de leite bovino de conjunto de cada propriedade com o uso de conchas inoxidáveis estéreis após homogeneização adequada no latão e armazenadas em tubos estéreis de 50 mL. As colheitas foram realizadas quinzenalmente, totalizando 5 amostras de cada propriedade. O transporte das amostras foi realizado em caixas isotérmicas do local da colheita até o Núcleo de Pesquisas em Mastites da FMVZ-UNESP- BOTUCATU, SP.

Imediatamente após a chegada das amostras no laboratório, procedeu-se o cultivo direto para detecção de *L. monocytogenes* e a extração do DNA para pesquisa molecular. A seguir, as amostras foram mantidas sob temperatura de refrigeração a 4°C por 48 horas, repetindo-se o procedimento para isolamento bacteriano e pesquisa do DNA bacteriano do agente, para avaliar o efeito da refrigeração no isolamento.

Em pelo menos uma das coletas, as amostras dos latões e uma amostra do tanque de expansão foram submetidas à contagem bacteriana total (CBT) em ágar sangue bovino 8%, com incubação a 37 °C por 72 horas para avaliação de possível microbiota contaminante, seguindo as técnicas preconizadas pela IN 62 (BRASIL, 2011).

4.2 Detecção da presença de *Listeria* spp. por cultivo microbiano:

Foram utilizados 25 mL de cada amostra, homogeneizando-se em 225 mL de caldo LEB (*Listeria* Enrichment Broth - Oxoid®), incubando-se a 30°C por 4 horas. A seguir, foram adicionados como agentes seletivos ácido nalidíxico 0,5% (1,8mL), cicloheximida 1%(1,15mL) e acriflavina 0,5% (0,455mL) reincubando-se novamente a 30°C, por 48 horas. Após 24 e 48 horas, com o auxílio de alça descartável com medida de 10µl, o caldo foi semeado em ágar ALOA (Sigma®) e ágar PALCAM (Oxoid®), incubando-se a 35°C por até 48 horas. Após esse período, até 5 colônias características (azuis, no ágar ALOA e pretas com halos pretos, no ágar PALCAM) foram repicadas para um tubo com ágar TSA acrescido de 0,6% de extrato de levedura (TSAYE), incubado a 35°C/24 horas. A seguir foram realizadas provas preliminares para identificação, como coloração de Gram (bastonetes Gram positivos), prova da catalase (catalase positiva), hidrólise da esculina e semeadura em ágar motilidade para observação do isolamento “em forma de guarda-chuva”.

Para avaliar o desenvolvimento da *Listeria* em meio seletivo com amostras possivelmente contaminadas e, o comportamento da mesma em diferentes temperaturas de cultivo, em uma das coletas todas as amostras foram cultivadas em duplicata. Após o cultivo em caldo LEB e adição de agentes seletivos, essas amostras foram cultivadas também em ágar PALCAM e ALOA e incubadas à 10°C, por 15 dias.

4.3 Extração de DNA

4.3.1 Diretamente do Leite

A extração do DNA diretamente do leite cru foi realizada utilizando-se o kit comercial *Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin Kit* (GE Healthcare®), com adaptações previamente padronizadas no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico de Zoonoses – UNESP- Botucatu-SP. A extração foi realizada a partir de alíquotas de 200µL de leite, em microtubo de 1,5mL DNase e RNase free, conforme segue:

Ocorreu a centrifugação a 10.000g por 1 minuto e, a seguir, foi retirada a gordura com *swab* estéril. O sobrenadante foi pipetado utilizando-se pipetador e ponteiros estéreis DNase e RNase free. Após esse procedimento, foram seguidas as recomendações do fabricante.

4.3.2 Caldo de Enriquecimento- LEB

Cada amostra previamente incubada em caldo LEB foi também submetida à extração do DNA. Pipetou-se 300 µL em tubos de microcentrifuga para extração e purificação do DNA, empregando-se o kit comercial *Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin Kit* (GE Healthcare®), conforme instruções do fabricante.

4.4 Amplificação do ácido nucléico (PCR)

O volume de 25 µL foi composto por 2,5 µL de PCR Buffer 10x (Invitrogen®), 0,75 µM de cloreto de magnésio (Invitrogen®), 200 µL de cada dNTP, 1 U de Taq DNA Polimerase, 10 picomoles de cada primer (Quadro 1), água ultrapura autoclavada (qsp) (Milli-Q Plus, Millipore) e 3 µL da amostra de DNA. A incubação foi realizada em Gene Amp PCR System 9700 (AppliedBiosystem) empregando-se os parâmetros de um ciclo inicial a 94°C durante 5 minutos para desnaturação inicial, seguidos por 35 ciclos com 94°C/30s, 60°C/30s e 72°C/30s. A temperatura de extensão final foi de 72°C por 4 minutos. Em todas as reações foi utilizado um controle negativo, pela substituição do ácido nucléico por água ultrapura. Como controle positivo, foi utilizada uma cepa padrão de *Listeria monocytogenes* (ATCC 19.117 cedido pela FIOCRUZ INCQS).

Quadro 1: Oligonucleotídeos e suas propriedades, utilizados na confirmação da espécie *L. monocytogenes*, pela técnica de PCR. Botucatu, SP, 2016-2017.

Sequência		T°C	Pb
		anelamento	
<i>inlA</i>	AATCTAGCACCACTGTCGGG		
	TGTGACCTTCTTTTACGGGC	50	733

Pb: pares de bases; T°C: temperatura em graus centígrados

4.5 Visualização dos produtos amplificados

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese (Major ME-20 Horizontal Electrophoresis System) em gel de agarose a 1,5% em tampão de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) e revelados com Nancy 520 (Sigma Life Science®). Os fragmentos de DNA foram analisados comparativamente com marcadores de DNA de 50 ou 100 bp, sendo analisados e fotografados em analisador de imagens (Gel Doc- It – Imaging System (UVP) – DNA Analyser).

5. RESULTADOS

Em nenhuma das amostras foi possível isolar *Listeria monocytogenes*, apesar do crescimento de colônias azuis (Figuras 1 e 2), sugestivas da bactéria no ágar ALOA e colônias pretas (Figura 3), sugestivas também do patógeno no ágar PALCAM.

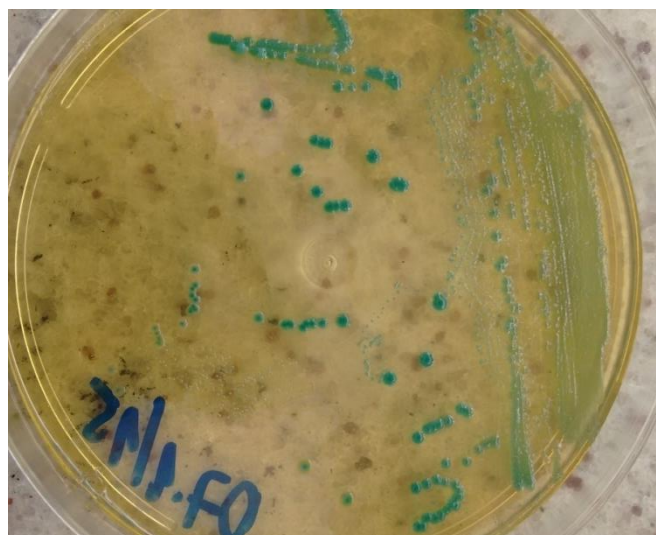


Figura 1- Colônias azuis sugestivas de isolamento de *Listeria monocytogenes* no ágar ALOA de amostras de leite de conjunto bovino. Botucatu, SP, 2016-2017.

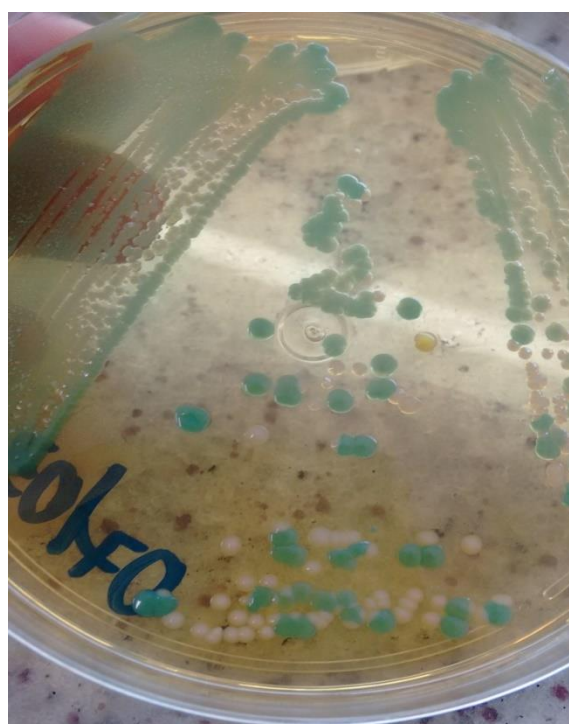


Figura 2 - Colônias de micro-organismos contaminantes e pesquisa de *Listeria monocytogenes* no ágar ALOA de amostras de leite de conjunto bovino. Botucatu, SP, 2016-2017.

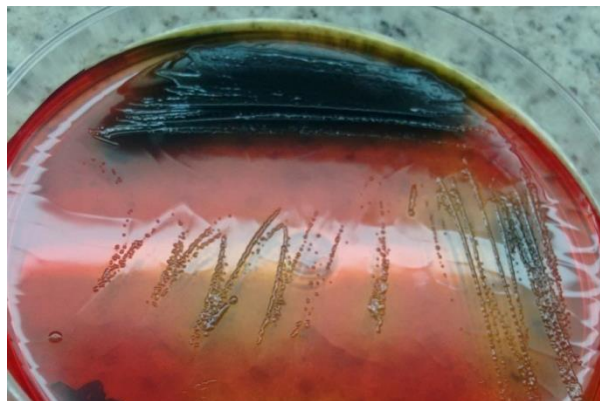


Figura 3 - Colônias pretas sugestivas de isolamento de *Listeria monocytogenes* no ágar PALCAM de amostras de leite bovino de conjunto. Botucatu, SP, 2016-2017.

Devido aos contaminantes presentes nos cultivos foram realizados testes com amostras padrão de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* visando observar o desenvolvimento característico de *L. monocytogenes* em meios seletivos, na presença de outros patógenos. Após o desenvolvimento dos micro-organismos nas placas, tanto de ágar PALCAM, quanto do ágar ALOA, não houve isolamento de *L. monocytogenes* (Figuras 4 e 5).

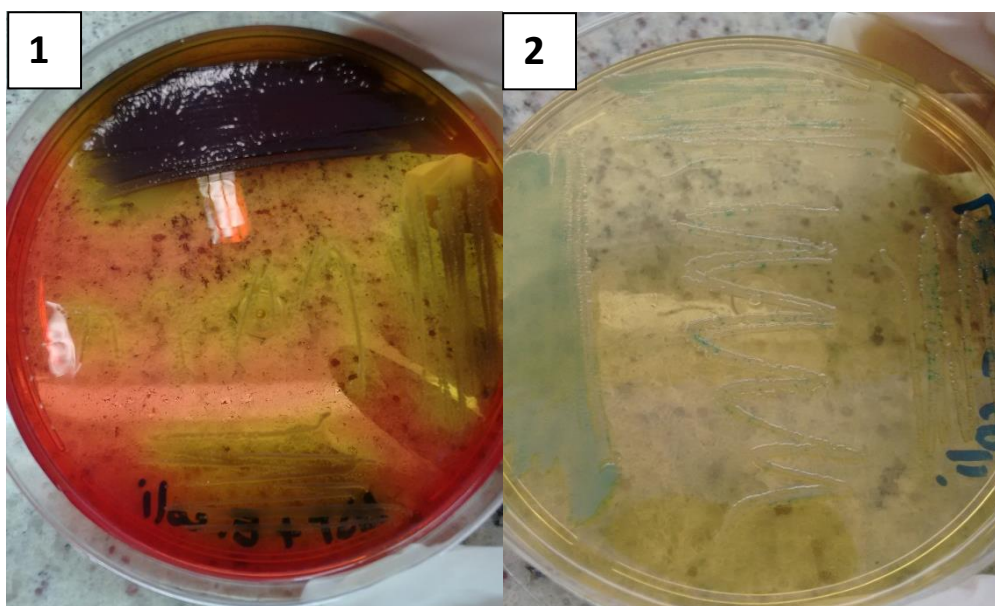


Figura 4 - Cultivo de leite cru contaminado com *L. monocytogenes* e *E. coli* em ágar PALCAM (1) e ALOA (2) de amostras de leite bovino de conjunto. Botucatu, SP, 2016-2017.

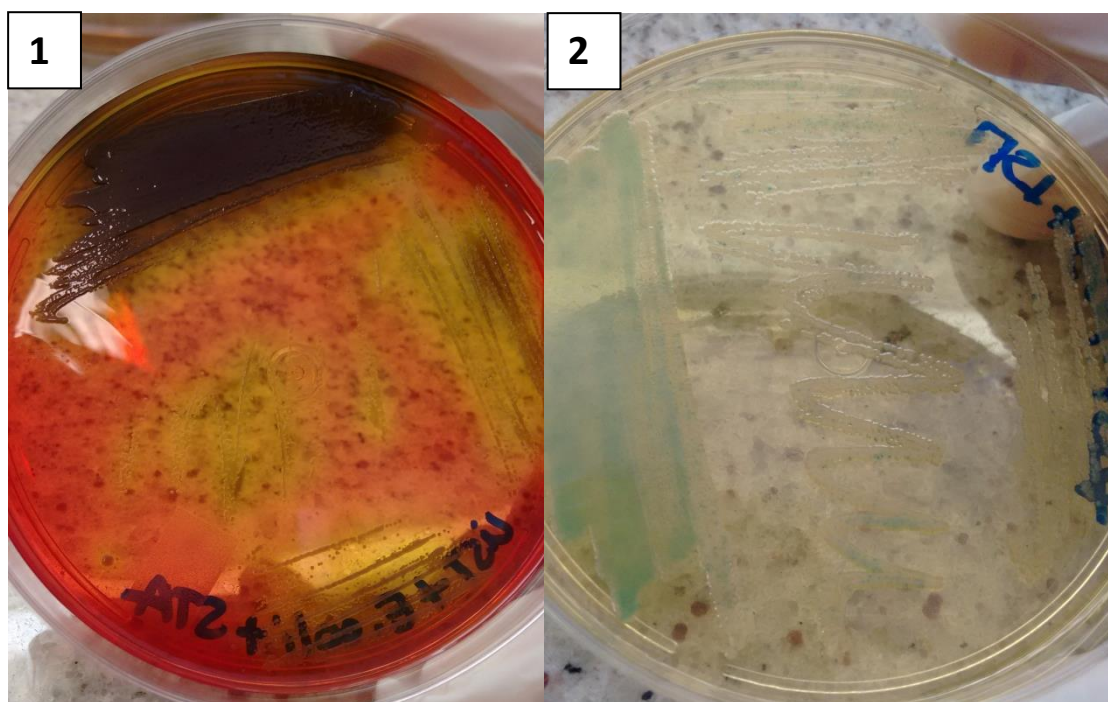


Figura 5 - Cultivo de leite cru contaminado experimentalmente com *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. aureus* em ágar PALCAM (1) e ALOA (2) de amostras de leite bovino de conjunto. Botucatu, SP, 2016-2017.

Considerando-se a elevada contaminação das amostras, realizou-se a CBT das amostras de leite dos latões e tanques de expansão. A amostra do tanque de expansão e mais quatro (21%) das 19 amostras dos latões apresentaram contagens de aeróbios mesófilos superiores a 3×10^5 UFC/mL (contagem permitida pela IN 62 até 30 de junho de 2016).

Foram realizadas diluições das amostras cultivadas em caldo LEB, em solução salina para redução da microbiota contaminante, com o intuito de favorecer o isolamento seletivo de *L. monocytogenes* do leite contaminado, embora sem sucesso.

Todas as amostras, independente da extração do DNA realizada diretamente do leite cru e ou do caldo LEB, foram negativas na PCR para *L. monocytogenes*. Foram utilizados controles positivos para a extração e para a PCR e, foram realizados testes, cultivando-se os controles em caldo LEB e leite cru anteriormente à extração, todos com resultados positivos na visualização dos produtos amplificados.

6. DISCUSSÃO

A listeriose humana no Brasil, devido ao fato de não ser uma doença de notificação obrigatória, com dados epidemiológicos defasados, é ainda uma enfermidade com perfil desconhecido, principalmente com relação à sua origem. A literatura se restringe a poucos trabalhos com relatos de detecção do patógeno, que confirmam a presença da *L. monocytogenes* no país e nos alimentos. Esse estudo foi elaborado de forma a se adicionar informações relativas ao tema e à presença de *L. monocytogenes* em um alimento específico, o leite. De 95 amostras analisadas, procedentes de diferentes propriedades, não se obteve nenhum resultado positivo entre cultivos e análises de biologia molecular.

As propriedades envolvidas no presente estudo utilizavam a pastagem como sistema de produção principal e, embora a silagem tenha sido identificada como importante via de transmissão da listeriose entre animais de fazenda, para alguns autores a pastagem de má qualidade e agrupamento dos rebanhos também podem ser fatores de risco na transmissão dessa enfermidade (VARNAM, 1991; GEORGE, 2002). No Brasil foi referido que a transmissão dos casos de meningoencefalite por *L. monocytogenes* em ruminantes não ocorrem associada à alimentação com silagem (SANCHES et al., 2000; RISSI et al., 2006; SCHILD, 2007).

O fato do leite de conjunto ser armazenado inicialmente em latões é um fator preocupante com relação à temperatura de armazenamento que esse material pode alcançar até ser misturado no tanque de expansão, pois sabe-se que a temperatura exerce grande influência na contagem bacteriana. O leite deveria ser estocado já na propriedade rural com temperatura inferior a 4,5°C (BUENO et al., 2008).

Foi observado que em 47% (9/19) das propriedades, os latões ficavam pelo menos uma hora com o leite armazenado sem refrigeração até a chegada ao tanque de expansão comunitário e, apesar de *L. monocytogenes* ser uma bactéria psicrófila, a multiplicação de bactérias mesófilas que competem com *Listeria* pode inibir sua proliferação. Além disso, as propriedades não recebiam assistência técnica, não realizavam pré-dipping ou pós-dipping, CMT, e tampouco estabeleciam linha de ordenha, fato que pode favorecer a proliferação de micro-organismos patogênicos comumente presentes no leite e no equipamento de manejo; e que poderiam ter influenciado negativamente no isolamento do patógeno nos leites de conjunto amostrados (SANTOS; FONSECA, 2000).

Com a melhoria na higienização dos tetos das vacas previamente à ordenha, Santana et al. (2001) observaram 99% de redução na contagem de aeróbios mesófilos e psicrotróficos. De modo similar, Santos e Fonseca (2000) também determinaram redução de até 80% na contagem bacteriana total do leite relacionado à prática de *pré-dipping*.

Dentre as propriedades envolvidas nesse estudo, 78,2% (15/19) realizavam ordenha manual o que hipoteticamente, já diminui o risco de *L. monocytogenes*, pois apesar de ser um micro-organismo ambiental, o leite geralmente é contaminado nas tubulações ou equipamentos de propriedades de alta produção, materiais nos quais *L. monocytogenes* pode formar biofilme (LATORRE et al., 2010). No presente estudo, as propriedades tinham em média 24 vacas em lactação, com produção média diária de 80 litros, propriedades pequenas e com serviços pouco tecnificados.

A ausência de *L. monocytogenes* pode ser atribuída à presença de contaminantes nas amostras que por serem oriundas de leite de conjunto das propriedades eram contaminadas por diferentes micro-organismos e a forma de armazenamento dos latões até a chegada ao tanque também pode ter contribuído para esse resultado.

Langoni et al. (2009) verificaram presença de *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus sp.*, *Bacillus sp.* e *Pseudomonas aeruginosa* no exame microbiológico das amostras de leite de conjunto de propriedades do município de Botucatu-SP, revelando alto grau de contaminação do leite em propriedades que seguem o mesmo sistema de produção que as avaliadas no presente estudo.

Ao contrário, Catão e Ceballos (2001), isolaram *Listeria spp.* em elevados percentuais, variando entre 66,6% e 86,6%, em amostras de leite cru e leite desnatado, apesar de encontrarem elevados níveis de contaminação fecal, sendo que no leite cru houve grande diversidade de espécies de *Listeria*, com predominância de *L. monocytogenes*.

O protocolo do FDA utilizado no presente estudo não foi suficiente para inibir os micro-organismos competidores. Quando se avalia a metodologia utilizada, Besse et al. (2005) cultivaram amostras de salmão, contaminadas artificialmente, em caldo Fraser, e introduziram alterações para minimizar as interações inibitórias, indicando que o cultivo de amostras naturalmente contaminadas com *Listeria spp.* por 24 horas de incubação foi suficiente para atingir o nível máximo de população, em contraste com a prática atual de 48 horas. Também demonstraram que esse isolamento de apenas 24

horas possibilitou a recuperação ótima de múltiplas estirpes do patógeno, sugerindo a possibilidade de se reduzir ainda mais o tempo de enriquecimento.

A inibição competitiva já foi relatada por outros autores. Farrag e Marth (1989) observaram que *P. aeruginosa* também pode ter efeito inibitório para *L. monocytogenes*. Wei e Fang (2001) relataram que a multiplicação de *L. monocytogenes* foi inibida competitivamente por *Yersinia enterocolitica*. Os resultados de Bang et al. (2013) corroboram com o observado no presente estudo ao afirmarem que o isolamento de *L. monocytogenes* pode ser dificultado pela multiplicação de outras bactérias, embora as observações tenham sido realizadas em meios BHI e TSBYE, não seletivos para *L. monocytogenes*.

Os resultados da PCR foram negativos quando realizados diretamente do leite ou do caldo LEB. Porém nos testes com amostras tanto de leite cru ou de caldo LEB, contaminadas com *L. monocytogenes* ATCC, a PCR resultou positiva. Conforme discutido anteriormente, tem sido observado que a microbiota contaminante pode interferir na multiplicação de espécies de *Listeria* (GASANOV et al., 2005). A redução na multiplicação do patógeno também reduz a quantidade de DNA disponível para a detecção por PCR.

Peres et al. (2010) não detectaram *L. monocytogenes* pela reação de PCR quando realizada a partir do caldo LEB após 24 horas de incubação, em amostras de leite cru integral ou leite desnatado pasteurizado. No entanto, após 48 horas de enriquecimento no mesmo caldo, foi possível identificar a bactéria por PCR nas amostras de leite desnatado, mas não nas amostras de leite cru integral. Em contrapartida, nos testes realizados no presente estudo, a PCR foi positiva tanto em amostras de leite desnatado pasteurizado quanto em amostras de leite cru integral, contaminadas experimentalmente com *L. monocytogenes* ATCC. No mesmo estudo foi observado que em amostras de leite cru com altas contagens de aeróbios mesófilos, a sensibilidade da metodologia tradicional da PCR foi reduzida. Sugere-se que esse fato possa ter ocorrido também no presente estudo. Os melhores resultados obtidos por Peres et al. (2010) foram quando a reação foi realizada com material obtido diretamente da colônia suspeita em meio sólido, indicando que é possível substituir os testes fenotípicos de identificação de *L. monocytogenes* pela técnica de PCR reduzindo-se o tempo de identificação da bactéria.

7. CONCLUSÕES

A elevada contaminação encontrada nos cultivos realizados de amostras de latões, bem como da CBT do tanque de expansão comunitário, provavelmente influenciaram negativamente no isolamento e/ou detecção molecular de *Listeria* nas amostras de leite de conjunto amostradas;

A baixa qualidade microbiológica e alta celularidade do leite revelaram a necessidade de adotar ações de controle e profilaxia de mastite nos rebanhos amostrados, além de projetos de educação sanitária visando a obtenção higiênica do leite;

Apesar dos resultados negativos no cultivo e na PCR, a patogenicidade de *L. monocytogenes* para os animais e os riscos em saúde pública, justificam estudos continuados para vigilância epidemiológica do agente em produtos de origem animal como o leite.

8. REFERÊNCIAS

- ANDERSON, M. L. Disorders of cattle. In: NJAA, B. L. *Kirkbride's Diagnosis of abortion and neonatal loss in animals*. 4. ed. Oxford: Wiley- Blackwell, 2012. p. 13-37.
- ARCURI, E. F.; BRITO, M. A.V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ÂNGELO, G. F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.
- ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. *Cienc. Rural*, v. 38, n. 8, p. 2250-2255, 2008.
- ARRUDA, G. A. *Listeria e listeriose: perigo para as gestantes*. 2. ed. São Paulo: Ponto Crítico, 2007. 143 p.
- BANG, J.; BEUCHAT, L. R.; SONG, H.; GU, M. B.; CHANG, H. I.; KIM, H. S.; RYU, J. H. Development of a random genomic DNA microarray for the detection and identification of *Listeria monocytogenes* in milk. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 161, n. 2, 134-141, 2013.
- BARANCELLI, G. V.; SILVA-CRUZ, J. V.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C. A. F. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. *Arq. Inst. Biol.*, v. 78, n. 1, p. 155-168, 2011.
- BARBUDDHE, S. B.; CHAUDHARI, S. P.; MALIK, S. V. S. The occurrence of pathogenic *Listeria monocytogenes* and antibodies against listeriolysin-O in buffaloes. *J. Vet. Med.*, v. 49, p. 181-184, 2002.
- BARROS, C. S. L.; DRIEMEIER, D.; DUTRA, I. S.; LEMOS, R. A. A. *Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil*. São Paulo: AGNS, 2006. p. 207.
- BESSE, N. G.; AUDINET, N.; KEROUANTON, A.; COLIN, P.; KALMOKOFF, M. Evolution of *Listeria* populations in food samples under going enrichment culturing. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 104, n. 2, p. 123-134, 2005.
- BHILEGAONKAR, K. N.; KULSHRESTHA, S. B.; KAPOOR, K. N.; KUMAR, A.; AGARWAL, R. K.; SINGH, B. R. Isolation of *Listeria monocytogenes* from milk. *J. Food. Sci. Technol.*, v. 34, p. 248-250, 1997.
- BORGES, M. D. F.; de ANDRADE, A. P. C.; ARCURI, E.; KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y. *Listeria monocytogenes em leite e produtos lácteos*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009. (Embrapa Agroindústria Tropical, Documentos, 119).
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, p. 45-53. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 20 fev. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado, o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 29 dez. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS. *Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos*. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRITO, L. *Listeria*, listeriose, histeria e neurose. *Ingenium*, ser. 2, n. 78, p. 66-69, 2003.

BUENO, V. F. F.; DE MESQUITA, A. J.; DE OLIVEIRA, A. N.; NICOLAU, E. S.; NEVES, R. B. S. Contagem bacteriana total do leite: relação com a composição centesimal e período do ano no Estado de Goiás. *Rev. Bras. Ciênc. Vet.*, v. 15, n. 1, p. 40-44, 2008.

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*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., Coliformes totais e fecais e *E. colino* leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 21, n. 3, p. 281-287, 2001.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Heat-related deaths after an extreme heat event — four states, 2012, and United States, 1999–2009. *MMWR*, v. 62, n. 22, p. 433-442, 2013.

CHAE, M. S.; SCHRAFT, H.; HANSEN, L. T.; MACKERETH, R. Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 23, p. 250-259, 2006.

CHEN, L. D. R. M.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *Int. Dairy J.*, v. 13, n. 4, p. 255-275, 2003.

CZUPRYNSKI, C. J.; KATHARIOU, S.; POULSEN, K. *Listeria*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G.; THOEN, C. O. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 4. ed. Oxford: Wiley- Blackwell, 2010. p. 167-180.

DA SILVA, Á. S.; ARAGON, C. C.; DE SANTANA, E. H. W.; DESTRO, M. T.; DE REZENDE COSTA, M.; ALEGRO, L. C. A. *Listeria monocytogenes* em Leite e Produtos Lácteos no Brasil: uma revisão. *UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde*, v. 13, n. 1, p. 59-67, 2011.

DALTON, C.; AUSTIN, C.; SOBEL, J.; HAYES, P.; BIBB, W.; GRAVES, L.; SWAMINATHAN, B.; PROCTOR, M.; GRIFFIN, P. An out break of gastroenteritis

and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N. Engl. J. Med.*, v. 336, p. 100-105, 1997.

DE FREITAS GUIMARÃES, F.; NÓBREGA, D. B.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; MARSON, P. M.; DE FIGUEIREDO PANTOJA, J. C.; LANGONI, H. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *J. Dairy Sci.*, v. 96, n. 5, p. 2866-2872, 2013.

DERRA, F. A.; KARLSMOSE, S.; MONGA, D. P.; MACHE, A.; SVENDSEN, C. A.; FÉLIX, B.; HENDRIKSEN, R. S. Occurrence of *Listeria* spp. in retail meat and dairy products in the área of Addis Ababa, Ethiopia. *Foodborne Pathog. Dis.*, v. 10, p. 577-579, 2013.

DJORDJEVIC, D.; WIEDMANN, M.; MC LANDSBOUROUGH, L. A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 68, p. 2950-2958, 2002.

DOGANAY, M. Listeriosis: clinical presentation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 35, n. 3, p. 173-175, 2003.

DOJJAD, S.; BARBUDDHE, S. B.; GARG, S.; KALEKAR, S.; RODRIGUES, J.; COSTA, D. D.; BHOSLE, S.; CHAKRABORTY, T. Incidence and genetic variability of *Listeria* species from three milk processing plants. *Food Control.*, v. 22, p. 1900-1904, 2011.

DONNELLY, C. W.; BRIGGS, E. H.; DONNELLY, L. S. Comparison of heat resistance of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 53, p. 1433-1438, 1992.

ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination of milk with Gram-negatives spoilage bacteria during filling of retail containers. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 57, p. 99-106, 2000.

FARRAG, SEHAM A.; MARTH, ELMER H. Behavior of *Listeria monocytogenes* when incubated together with *Pseudomonas* species in tryptose broth at 7 and 13 °C. *J. Food Protect.*, v. 52, n. 8, p. 536-539, 1989.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *FDA Food Code 2009*: Annex 3 - Public health reasons/ Administrative Guidelines. Silver Spring: Department of Health and Human Services, Public Health Service, U. S. Food and Drug Administration, 2009. p. 315-499.

FOX, E.; O'MAHONY, T.; CLANCY, M.; DEMPSEY, R.; O'BRIEN, M.; JORDAN, K. *Listeria monocytogenes* in the Irish dairy farm environment. *J. Food Protect.*, v. 72, p. 1450-1456, 2009.

GAHAN, C. G.; COLLINS, J. K. Listeriosis: biology and implications for the food industry. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 2, p. 89-93, 1991.

GAILLARD, J. L.; BERCHE, P.; FREHEL, C.; GOUIN, E.; COSSART, P. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from Gram-positive cocci. *Cell*, v. 65, p. 1127-1141, 1991.

GALIZA, G. J.; SILVA, M. L. C. R.; DANTAS, A. F.; SIMÕES, S. V.; RIET-CORREA, F. Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 30, n. 3, p. 267-276, 2010.

GASANOV, UTA; HUGHES, DENISE; HANSBRO, PHILIP, M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS microbiology reviews*, v. 29, n. 5, p. 851-875, 2005.

GAYA, P.; SANCHEZ, J.; MEDINA, M.; NUNEZ M. Incidence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in raw milk produced in Spain. *Food Microbiol.*, v. 15, p. 551-555, 1998.

GEORGE, L. W. Listeriosis, In: SMITH, B. P. (Ed.). *Large animal internal medicine*. 3. ed. St. Louis: Mosby, 2002. p. 946-949.

GOULET, V.; HEDBERG, C.; LE MONNIER, A.; DE VALK, H. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 14, n. 5, p. 734-740, 2008. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/eid/content/14/5/734.htm>>. Acesso em: 22 abr. 2015.

HUNT, K.; DRUMMOND, N.; MURPHY, M.; BUTLER, F.; BUCKLEY, J.; JORDAN, K. A case of bovine raw Milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *Irish Vet. J.*, v. 65, n. 1, p. 13, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Indicadores da produção pecuária*. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 4 abr. 2015.

JAMALI, H.; RADMEHR, B.; THONG, K. L. Prevalence, characterisation, and antimicrobial resistance of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk in farm bulk tanks. *Food Control*, v. 34, n. 1, p. 121-125, 2013.

JAY, J. M. Foodborne Listeriosis. In: _____. *Modern food microbiology*. 6. ed. cap. 25, p. 485-504, 2000.

KALOREY, D. R.; WARKE, S. R.; KURKURE, N. V.; RAWOOL, D. B.; BARBUDDHE, S. B. *Listeria* species in bovine raw milk: a large survey of central India. *Food Control*, v. 19, p. 109-112, 2008.

KARTHIKEYAN, R.; GUNASEKARAN, P.; RAJENDHRAN, J. Molecular Serotyping and Pathogenic Potential of *Listeria monocytogenes* Isolated from Milk and Milk Products in Tamil Nadu, India. *Foodborne Pathog. Dis.*, v. 12, n. 6, p. 522-528, 2015.

KIRKBRIDE, C. A. Bacterial agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 5, p. 64-68, 1993.

KLIMA, R. A.; MONTVILLE, T. J. Thereregulatory and industrialresponses to listeriosis in the USA: a paradigm for dealing with emerging food borne pathogens. *Trends Food Sci. Technol.*, v.6, p.87-93, 1995.

LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 33, n. 5, p. 620-626, 2013.

LANGONI, H.; SAKIYAMA, D. T. P.; GUIMARÃES, F. D. F.; MENOZZI, B. D.; SILVA, R. C. D. Aspectos citológicos e microbiológicos do leite em propriedades no sistema orgânico de produção. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 29, n. 11, p. 881-886, 2009.

LANGONI, H.; FONSECA, P. H. P. Participação da *Listeria monocytogenes* na mastite bovina, importância para a saúde pública. *Hig. Aliment.*, v. 2, n. 50, p. 36-38, 1997.

LATORRE, A. A.; VAN KESSEL, J. S.; KARNS, J. S.; ZURAKOWSKI, M. J.; PRADHAN, A. K.; BOOR, K. J.; JAYARAO, B. M.; HOUSER, B. A.; DAUGHERTY, C. S.; SCHUKKEN, Y. H. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *J. Dairy Sci.*, v. 93, p. 2792-2802, 2010.

LECLERCQ, A.; CLERMONT, D.; BIZET, C.; GRIMONT, P. A.; LE FLÈCHE-MATÉOS, A.; ROCHE, S. M.; BUCHRIESER, C.; CADET-DANIEL, V.; MONNIER, A.; LECUIT, M.; ALLERBERGER, F. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 60, n. 9, p. 2210-2214, 2010.

LEHNERT, C. Listeriose. In: BEER, J. *Doenças infecciosas em animais domésticos*. São Paulo: Roca, 1988. p. 48-53.

LOVETT, J. *Listeriamonocytogenes*. In: DOYLE, M. P. (Ed.). *Food-borne pathogens*. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 283-310.

MA, Y.; BARBANO, D. M. Effect of temperature of CO₂ injection on the pH and freezing point of milk sand creams. *J. Dairy Sci.*, v. 86, p. 1578-1589, 2003.

MANTILLA, S. P. S.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; SANTOS, É. B.; GOUVÊA, R. Importância da *Listeria monocytogenes* em alimentos de origem animal. *Rev. FZVA*, v. 14, n. 1, p. 180-192, 2007.

MARTINS, E. S.; REIS, N. E. V. Qualidade microbiológica do leite cru em função de medidas profiláticas no manejo de produção. *Rev. Bras. Tecnol. Agroindústria*, v. 8, n. 2, p. 216-222, 2014.

McLAUCHLIN, J. The identification of *Listeria* species. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 38, p. 77-81, 1997.

MERUSSI, G. D.; MAFFEI, D. F.; CATANOZI, M. D. P. L. M. Surtos de gastroenterite relacionados ao consumo de laticínios no estado de São Paulo no período de 2000 a 2010. *Aliment. Nutr.*, v. 23, n. 4, p. 646, 2013.

MORIN, D. E. Brainstem and cranial nerve abnormalities: listeriosis, otitis media/internal and pituitary abscess syndrome. *Vet. Clin. Food Anim. Pract.*, v. 20, p. 243-273, 2004.

MURPHY, S. C.; BOOR, K. J. Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. *Dairy Food Environ. Sanit.*, v. 20, p. 606-611, 2000.

MURRAY, E. G. D.; WEBB, R. A.; SWANN, M. B. R. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis: caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *J. Pathol. Bacteriol.*, v. 29, p. 407-439, 1926.

- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PONTES NETTO, D.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and chemical residues. *Braz. J. Microbiol.*, v. 35, n. 3, p. 211-215, 2004.
- OLIVEIRA, M. M.; BRUGNERA, D. F.; ALVES, E.; PICCOLI, R. P. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. *Braz. J. Microbiol.*, v. 41, n. 1, p. 97-106, 2010.
- OOI, S. T.; LORBER, B. Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clin. Infect. Dis.*, v. 40, n. 9, p. 1327-1332, 2005.
- PADILHA, M. R. F.; FERNANDES, Z. F. F.; LEAL, T. C. A. L.; LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. P. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 34, n. 2, p. 161-171, 2001.
- PAN, Y.; BREIDT, F.; KATHARIOU, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 72, n. 12, p. 7711-7717, 2006.
- PAUL, M.; BARANZONI, G. M.; ALBONETTI, S.; BREWSTER, J. D. Direct, quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in fresh raw whole milk by qPCR. *Int. Dairy J.*, v. 41, p. 46-49, 2015.
- PEARSON, L. J.; MARTIN, E. H. *Listeria monocytogenes*: threats to a food supply. *J. Sci. Dairy*, v. 73, p. 912-928, 1980.
- PERES, N. D.; LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; ARCURI, E. F.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Detection of *Listeria monocytogenes* by PCR in artificially contaminated milk samples. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 62, n. 4, p. 973-979, 2010.
- PÉREZ-TRALLERO, E.; ZIGORRAGA, C.; ARTIEDA, J.; ALKORTA, M.; MARIMÓN, J. M. Two outbreaks of *Listeria monocytogenes* infection, Northern Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 20, n. 12, p. 2155, 2014.
- PICCHI, V.; RAMOS e SILVA, E. O. T.; SOUZA, S. L. P.; BALIAN, S. C. Isolamento e identificação de *Listeria* spp., em quartos dianteiros de bovinos desossados. *Hig. Aliment.*, v. 13, n. 63, p. 38-42, 1999.
- QUINN, P. J.; MARKE, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. *Listerias*. In: _____. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, 2011. p. 193-199.
- RAHIMI, E.; AMERI, M.; MOMTAZ, H. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from milk and dairy products in Iran. *Food Control*, v. 21, p. 1448-1452, 2010.
- RISSI, D. R.; RECH, R. R.; BARROS, R. R. Forma nervosa de listeriose em caprinos. *Rev. Pesqui. Vet. Bras.*, v. 26, n. 1, p. 14-20, 2006.

ROCHE, S. M.; GRACIEUX, P.; VELGE, P. Poor detection of low-virulence field strains of *L. monocytogenes* is related to selective agents in selective media and is unrelated to PrfA. *Food Microbiol.*, v. 26, p. 21-26, 2009.

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

ROCOURT, J.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M.P.; BEAUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington: American Society for Microbiology (ASM) Press, 1997. p. 337-352.

ROSSI, E. M.; ZILLI, D.; SCAPIN, D.; ROZA-GOMES, M. F.; GELINSKI, J. M. L. N. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos Minas Frescal comercializados em supermercados da região Extremo-Oeste de Santa Catarina, Brasil. *Evidencia*, v. 1, p. 105-114, 2010.

RYSER, E. T.; DONNELLY, C. W. *Listeria*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4. ed. Washington: American Public Health Association, 2001. p. 343-356.

SALAMINA, G. T.; DONNE, E. D.; NICCOLINI, A.; PODA, G.; CESARONI, D.; BUCCI, M.; FINI, R.; MALDINI, M.; SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BIBB, W.; ROCOURT, J.; BINKIN, N.; SALMASO, S. A food-borne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. *Epidemiol. Infect.*, v. 117, p. 429-436, 1996.

SANAA, M.; COROLLER, L.; CERF, O. Risk assessment of listeriosis linked to the consumption of two soft cheeses made from raw milk: Camembert of Normandy and Brie of Meaux. *Risk Anal.*, v. 24, p. 389-399, 2004.

SANCHES, A. W.; LANGOHR, I. M.; STIGGER, A. L.; BARROS, C. S. L. Doenças do sistema nervoso central de bovinos no Sul do Brasil. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 20, n. 1, p. 113-118, 2000.

SANTANA, E. D.; BELOTI, V.; BARROS, M. D. A. F.; MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; PEREIRA, M. S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrótrófos. *Semin., Ciênc. Agrár.*, v. 22, n. 2, p. 145-154, 2001.

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

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWSON, M. A.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P. M. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 17, n. 1, p. 7-15, 2011.

SCHILD, A. L. Listeriose. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. *Doenças de ruminantes e eqüídeos*. 3. ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. p. 352-357.

SCHNEIDER, D. J. Listeriosis. In: COETZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C. *Infectious diseases of livestock*. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2004. p. 1904-1907.

SEELIGER, H. P. R.; JONES, D. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P. H. A. (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9. ed. Baltimore: The Williams Wilkins Co., 1986. v. 2, p. 1235-1245.

SHAH, N. P. Psychrotrophs in milk: a review. *Milchwissenschaft*, v. 49, p. 432-437, 1994.

SIEGMAN-IGRA, Y.; LEVIN, R.; WEINBERGER, M.; GOLAN, Y.; SCHWARTZ, D.; SAMRA, Z.; KONIGSBERGER, H.; YINNON, A.; RAHAV, G.; KELLER, N.; BISHARAT, N.; KARPUGH, J.; FINKELSTEIN, R.; ALKAN, M.; LANDAU, Z.; NOVIKOV, J.; HASSIN, D.; RUDNICKI, C.; KITZES, R.; OVADIA, S.; SHIMONI, Z.; LANG, V.; SHOHAT, T. *Listeria monocytogenes* infection in Israel and review of cases worldwide. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 8, p. 305-310, 2002.

SILVEIRA, M. L. R.; BERTAGNOLLI, S. M. M. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado informalmente em feiras livres no município de Santa Maria-RS. *Vig. Sanit. Debate*, v. 2, n. 2, p. 75-80, 2014.

SØRHOUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 8, p. 35-41, 1997.

SOUSA, R. A.; FIGUEIREDO, E. A. T.; MAIA, G. A.; FRIZZO, S. E. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho artesanal, comercializado à temperatura ambiente, em Fortaleza, CE. *Hig. Aliment.*, v. 20, n. 138, p. 66-69, 2006.

TAMANINI, R.; BELOTI, V.; DA SILVA, L. C. C.; DA ANGELA, H. L.; YAMADA, A. K.; BATTAGLINI, A. P. P.; FAGNANI, R.; MONTEIRO, A. A. Antagonistic activity against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* from lactic acid bacteria isolated from raw milk. *Semin., Ciênc. Agrár.*, v. 33, n. 5, p. 1877-1888, 2012.

TODD, E. C. D.; NOTERMANS, S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, v. 22, n. 9, p. 1484-1490, 2011.

VARNAM, A. H. *Foodborne pathogens*. St. Louis: Mosby Year Book, 1991. 557 p.

VAZQUEZ-BOLAND, J.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 14, n. 3, p. 584-640, 2001.

VLAEMYNCK, G.; LAFARGE, V.; SCOTTER, S. Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. *J. Appl. Microbiol.*, v. 88, p. 430-441, 2000.

WEILER, C.; IFLAND, A.; NAUMANN, A.; KLETA, S.; NOLL, M. Incorporation of *Listeria monocytogenes* strains in raw milk biofilms. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 161, n. 2, p. 61-68, 2013.

WEI, QUE-KING; FANG, TONY J. Validation of growth models for *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in cooked chicken meat. *Journ. Food and Drug Anal.*, v. 9, n. 3, 2001.

WONG, G. R. *Molecular characterization of Listeria monocytogenes from raw milk*. 2013. 53 f. These (Doctoral) – Universiti Malaysia Sarawak, UNIMAS, Sarawak, 2013.

YAMAGUCHI, M. U.; ZANQUETA, É. B.; MOARAI, J. F.; FRAUSTO, H. S. E. G.; SILVÉRIO, K. I. Qualidade microbiológica de alimentos e de ambientes de trabalho: pesquisa de *Salmonella* e *Listeria*. *Rev. Agronegoc. Meio Ambient.*, v. 6, n. 3, p. 417-434, 2013.

APÊNDICE A

Questionário de Pesquisa – Diagnóstico de situação das propriedades

Nº do produtor: _____

Proprietário: _____

Data: ____/____/____

Município: _____ Telefone: _____

1 PERFIL DO PRODUTOR/RESPONSÁVEL PELA PRODUÇÃO

1.1 Número de pessoas que trabalham com o leite:

- ☐ Um
- ☐ Dois
- ☐ Três
- ☐ Quatro
- ☐ Cinco
- ☐ Mais de cinco

1.2 Quem são as pessoas que efetuam a ordenha?

- ☐ A esposa;
- ☐ O marido;
- ☐ O filho(a) ou os(as) filhos(as);
- ☐ O marido e a esposa;
- ☐ O marido e o(a/as/os) filho(a/as/os);
- ☐ A esposa e o(a/as/os) filho(a/as/os);
- ☐ Outro integrante da família;
- ☐ Funcionário;
- ☐ Família.

1.3 Quantos anos trabalha na atividade?

- ☐ menos de 1 ano
- ☐ 1 a 3 anos
- ☐ 4 a 6 anos
- ☐ 7 a 9 anos
- ☐ mais de 10 anos

2 DADOS DA PROPRIEDADE

2.1 Quais as principais atividades (em ordem de importância econômica)?

- 01) _____
- 02) _____
- 03) _____
- 04) _____

2.2 Sistema de produção (vacas em lactação)

- ☐ Baseado em pastagem
- ☐ Pastagem + silagem/feno _____
- ☐ Confinado _____

2.3 Recebe assistência técnica de alguma entidade? () Não () Sim

2.4 Se recebe assistência técnica, de qual (is) entidades?

- ☐ Laticínio
- ☐ CATI

- ☐ Unesp
- ☐ Prefeitura
- ☐ Particular
- ☐ Outra

3 MANEJO DA ORDENHA

3.1 Como é efetuada a ordenha?

- ☐ Ordenha manual
- ☐ Ordenhadeira mecânica “balde ao pé”
- ☐ Ordenhadeira mecânica “canalizada”

3.2 Quais são as condições do local onde é feita a ordenha?

- ☐ Sala de ordenha com fosso
- ☐ Estábulo de madeira com piso de concreto
- ☐ Estábulo de alvenaria com piso de concreto
- ☐ Outro

3.3 Como você faz o processo de ordenha:

- ☐ Lava/ limpa os tetos. Como e com o que: _____
- ☐ Utiliza pré-imersão (*pre-dipping*). Com o que: _____
- ☐ Seca os tetos. Como e com o que: _____
- ☐ Elimina os primeiros jatos na caneca de fundo preto.
- ☐ Coloca Teteiras (Processo de Ordenha)
- ☐ Desinfeta as tetas após a ordenha (*pós-dipping*).

Com o que: _____

3.4 Fornece alimentação no momento da ordenha:

- ☐ Sim
- ☐ Não

Quando: _____

3.4.1 Faz o Teste da Raquete (CMT):

- ☐ Sim:
- ☐ Diariamente
- ☐ Semanalmente
- ☐ Mensalmente
- ☐ Depende da necessidade
- ☐ Não

3.4.2 Na ordenha coloca as vacas em alguma ordem em relação à mastite (Inicia ordenha por vacas que não tem mastite; após as curadas e por fim as que têm mastite):

- ☐ Sempre
- ☐ As vezes
- ☐ Nunca

3.5 O produtor troca as borrachas das teteiras de acordo com qual critério:

- ☐ A cada _____
- ☐ Quando acha necessário
- ☐ Quando arrebentam
- ☐ Quando ressecam
- ☐ Nunca troca
- ☐ Não tenho critério

3.6 Manutenção de equipamento de ordenha

- ☐ Periódica: _____
- ☐ Eventual/quando há problema

☐ Não faz

4 DADOS DOS ANIMAIS E PRODUÇÃO

4.1 O rebanho é predominantemente de qual raça?

☐ Holandês

☐ Jersey

☐ Mestiça

☐ Holandês/Jersey

Outra: _____

4.2 Há quanto tempo participa do Controle Leiteiro Oficial:

☐ menos de 1 ano

☐ 3 a 5 anos

☐ 1 a 3 anos

☐ mais que 5 anos

4.3 Número total de vacas em lactação: _____

4.4 Número de vacas Secas: _____

4.5 Número de bezerras e novilhas: _____

4.6 Produção de leite diária/atual: _____ l/dia.

4.7 Descrição da alimentação das vacas em lactação:

4.8 Recebe bonificação do laticínio por qualidade do leite?

☐ Sim

☐ Não

4.9 Qual incentivo?

☐ Volume

☐ % gordura

☐ % proteína

☐ CCS

☐ CBT

☐ Outro _____

5. CONSERVAÇÃO DO LEITE

5.1 Onde o leite fica armazenado até ser refrigerado?

☐ vai direto para o tanque de refrigeração

☐ latões

5.1.2 Se fica armazenado em latões, por quanto tempo?

☐ 1 hora

☐ 2 horas

☐ 3 horas

☐ mais de três horas

5.2 Utiliza tanque comunitário?

☐ Sim

☐ Não

Trabalho a ser enviado para a revista *Food Control*

***Listeria monocytogenes* in cow's milk produced by family-owned dairy farms**

Gabriela Capriogli Oliveira^a, Nathália Brancato Junqueira^a, Anelise Salina^a, Felipe de Freitas Guimarães^a, Sâmea Fernandes Joaquim^a, Felipe Morales Dalanezi^a, Helio Langoni^{a*}

Department of Food Hygiene and Veterinary Public Health, São Paulo State University – UNESP, Botucatu, SP, Brazil

**Corresponding author. E-mail address: hlangoni@fmvz.unesp.br*

ABSTRACT

Refrigeration is an important milk preservation method. However, milk quality may deteriorate if the product is refrigerated for long periods, mainly due to the growth of psychrotrophic bacteria. This group of microorganisms includes pathogenic genera, most notably *Listeria monocytogenes*. The detection of this bacterium in food is important, given its pathogenic effects on human and animal health and also its economic relevance. This study focused on detecting the presence of *L. monocytogenes* in milk samples collected at small family-owned dairy farms located in the Baixada Serrana region of the municipality of Botucatu, in the state of São Paulo, Brazil. Samples were cultivated on PALCAM and ALOA agars for microbiological analysis and a molecular analysis by polymerase chain reaction (PCR) was performed for the detection of *L. monocytogenes*. Despite the negative results obtained in both these analyses, further studies are recommended to confirm or refute the negligible effect of *L. monocytogenes* on small dairy farms.

Keywords: raw milk, listeriosis, microbiology, molecular biology

1. INTRODUCTION

Due to its composition and nutritional characteristics, milk is considered an excellent medium for the multiplication of pathogenic microorganisms that can compromise its quality and alter its components (Merussi et al., 2013), making it a viable route of transmission of pathogens and their toxins to humans (De FreitasGuimarães et al., 2013).

Bacterial contamination of raw cow milk may occur inside the animal itself, in the environment, or during handling in the production line. All these situations are directly related to hygienic milk production (Buchanan et al., 2017).

An efficient method for preserving raw milk is refrigeration. However, if refrigerated for long periods, the quality of raw milk may deteriorate due to the proliferation of psychrotrophic bacteria (Martins & Reis, 2014). These microorganisms can develop at temperatures below 7°C, although this development varies among species (Sørhoug & Stepaniak, 1997). Bacterial multiplication is favored by poor water quality, inadequate hygiene procedures and bovine mastitis (Jay, 2000; Eneroth, Ahné & Molin, 2000; Murphy & Boor, 2000).

These bacteria may be the cause of different foodborne diseases transmitted through dairy products, raw milk and even pasteurized milk. The group of psychrotrophic pathogens include *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* and some strains of *Bacillus cereus* (Shah, 1994; Sørhoug & Stepaniak, 1997).

In addition to *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* and *L. ivanovii* have also been reported in food and in the environment (Jay, 2000; McLauchlin, 1997). However, only *L. monocytogenes* is potentially pathogenic for humans. *L. monocytogenes* is divided into 19 serological groups, among which serotypes 1/2a, 1/2b and 4b are the main ones responsible for cases of listeriosis in humans (Barancelli et al., 2011).

The continuous surveillance of pathogenic microorganisms and evaluation of hygienic conditions and animal feed quality are considered necessary, given the economic importance of psychrotrophic bacteria and the public health risks posed by their growth and high count in milk samples, especially when stored under refrigeration, as well as the zoonotic potential of *L. monocytogenes* and the risk of contamination of dairy products. The purpose of this study was to investigate the presence of *Listeria monocytogenes* in raw cow's milk produced by small family-owned dairy farms. To this end, milk samples were isolated on selective PALCAM and ALOA agar media before and after cooling to 4°C for 48 hours, simulating the cooling conditions in expansion tanks at the farms. Another objective was to detect *L. monocytogenes* based on a molecular technique (PCR) in these milk samples.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Collection of milk samples from dairy farms

A total of 95 milk samples were collected from 19 family-owned dairy farms. The samples were stored in a direct expansion tank located in the state of São Paulo. The 19 dairy farms were selected based on convenience and the farm owners' interests.

The dairy farm owners were asked to answer a simplified questionnaire aimed at evaluating the management and procedures involved in milk production at each farm.

The main economic activity of the 19 farms is milk production from pasture raised dairy cattle. The cows were cross breeds, and the milk samples were collected, mixed, and stored in the direct expansion tank. None of the dairy farms receive technical assistance or quality bonuses. Moreover, they do not apply the California Mastitis Test (CMT), nor do they use milking pipeline systems.

After homogenizing the milk in the milk cans at each farm, samples of 50 mL of cow milk were collected aseptically, using properly sterilized stainless steel ladles, and were stored in sterile 50mL tubes. Sampling was performed twice a week, with a total of five samples collected from each farm. The samples were placed in cooler boxes and transported from the collection site to the Mastitis Research Center at the *School of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ) of UNESP in Botucatu, SP.*

At the laboratory, the samples were cultured for the detection of *Listeria monocytogenes* and their DNA was extracted for molecular analysis. They were then stored at 4°C for 48 hours. Subsequently, the procedures for bacterial isolation and bacterial DNA screening of the agent were repeated in order to evaluate the effect of refrigeration on bacterial isolation.

At least one raw milk sample, several bulk tank milk samples and one sample from the expansion tank were incubated for 72 hours at 37°C on 8% bovine blood agar and total bacterial counts (TBC) were made to investigate possible contaminating microbiota.

2.2 Detection of *Listeria* spp. in microbial cultures

Twenty-five mL of each sample were homogenized in 225 mL of listeria enrichment broth (LEB, from Oxoid®) and incubated at 30°C for 4 hours. Subsequently, 0.5% (1.8mL) nalidixic acid, 1% cycloheximide (1.15mL) and 0.5% acriflavine (0.455mL) were added as selective agents and the samples were incubated at

30°C for 48 hours. After 24 and 48 hours, the incubated samples were seeded onto ALOA agar (Sigma®) and PALCAM agar (Oxoid®) using a 10µl disposable inoculating loop, and incubated at 35°C for up to 48 hours. After that, up to five characteristic colonies (blue, ALOA and black agar with black halos on PALCAM agar) were placed in a tube with tryptone soya yeast extract agar (TSYEA) (TSA plus 0.6% yeast extract) and incubated at 35°C for 24 hours. After this, preliminary identification tests were conducted, such as Gram staining (Gram positive rods), catalase proof (catalase positive), esculin hydrolysis or agar motility in order to observe isolated “umbrella-like” growth patterns.

To evaluate the development of *Listeria* in selective medium using possibly contaminated samples, as well as the behavior of the bacterium at different culture temperatures, all the samples of one of the samplings were cultured in duplicate. After culturing in LEB and adding selective agents, these samples were also cultured on PALCAM and ALOA agars and incubated at 10°C for 15 days.

2.3 DNA Extraction

2.3.1 Directly from milk

DNA was extracted directly from raw milk using a commercial Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare®) adapted for the diagnosis of zoonotic diseases at the Laboratory of Applied Molecular Biology of UNESP in Botucatu, SP. DNA extraction was performed on 200µL milk aliquots, using a 1.5mL DNase and RNase free microtube, as follows:

The material was centrifuged at 10,000g for 1 minute, after which the fat was removed using a sterile swab. The supernatant was pipetted using sterile DNase and RNase free tips. After performing this procedure, the manufacturer's recommendations were followed.

2.3.2 Listeria Enrichment Broth– LEB

Each sample previously incubated in LEB was also subjected to DNA extraction. To this end, 300 µL were pipetted into microcentrifuge tubes for DNA extraction and purification, using a commercial Illustra Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare®), according to the manufacturer's instructions.

2.4 Amplification of nucleic acid (PCR)

The 25 μ L volume was composed of 2.5 μ L of PCR Buffer 10x (Invitrogen®), 0.75 μ M magnesium chloride (Invitrogen®), 200 μ L of each dNTP, 1 U of Taq DNA Polymerase, 10 picomoles of *inlA* primer (Rousseaux et al., 2004), ultrapure autoclaved water (qsp) (Milli-Q Plus, Millipore) and 3 μ L of the DNA sample.

Incubation was performed in a Geneamp 9700 PCR System (Applied Biosystems), applying initial cycle parameters of 94°C for 5 minutes for initial denaturation, followed by 35 cycles at 94°C for 30s, 60°C for 30s and 72°C for 30s.

The final extension temperature was 72°C applied for 4 minutes. A negative control was used in all the reactions, using ultrapure water in place of nucleic acid. Two standard strains of *Listeria monocytogenes* (ATCC 19.117) were used as positive control.

2.5 Preview of PCR amplification products

The products of PCR amplification were subjected to agarose gel electrophoresis on 1.5% Tris EDTA (TBE) and developed with Nancy-520 DNA Gel Stain (Sigma Life Science®). DNA fragments were analyzed by comparing them with 50 or 100 bp DNA markers, and were photographed using an image analyzer (GelDoc-It Imaging System (UVP)).

3. RESULTS

Despite the growth of blue colonies (Figure 1), in none of the samples was it possible to identify *Listeria monocytogenes*, nor the suggestion of growth of bacteria or black colonies (Figure 2) on ALOA agar, or of the pathogenon PALCAM agar.



Figure 1– Blue colonies suggesting the presence of *L. monocytogenes* isolated on ALOA agar in samples of cow's milk from Botucatu, SP, 2016-2017.

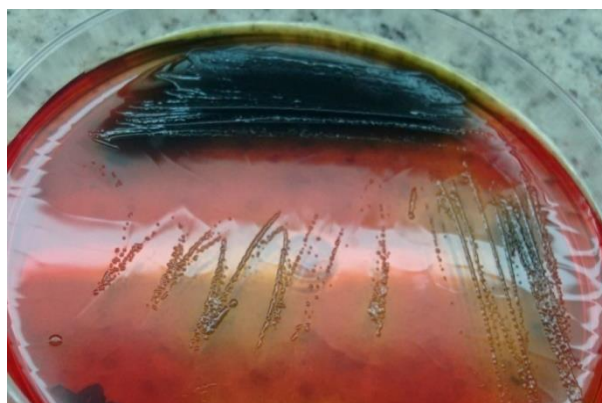


Figure 2 –Black colonies suggesting the presence of *L. monocytogenes* isolated on PALCAM agar in cow's milk samples from Botucatu, SP, 2016-2017.

Due to the presence of contaminants in the cultures, tests were carried out using standard samples of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to observe the characteristic development of *L. monocytogenes* in selective media in the presence of other pathogens. No *L. monocytogenes* was identified among the microorganisms developed on either PALCAM agar or ALOA agar.

Considering the high contamination rate of the samples, a total bacterial count (TBC) was made of the milk samples from the bulk and expansion tanks. The sample from the expansion tank and four samples (21%) of the 19 bulk tank samples presented mesophilic aerobic colony counts higher than 3×10^5 CFU/mL.

Aiming to facilitate the selective isolation of *L. monocytogenes* from contaminated milk, samples cultured in LEB were diluted in saline solution to reduce the contaminating microbiota. However, this procedure proved to be unsuccessful.

All the samples were PCR negative for *L. monocytogenes*, regardless of whether the DNA extraction was performed with raw milk or LEB. Positive controls were used for DNA extraction and PCR, and tests were performed using controls cultured in LEB and raw milk prior to extraction. Visualization of the amplified products revealed that all of them yielded positive results.

4. DISCUSSION

In Brazil, listeriosis is a non-notifiable zoonotic disease. Epidemiological data on listeriosis are out of date, and its profile and particularly its etiology are unknown.

The literature is limited to a few reports about the detection of pathogens, which confirm the presence of *L. monocytogenes* in foods in Brazil. This study was developed in order to add information on the subject and report the presence of *L. monocytogenes* in a specific food, i.e., milk. The cultures and molecular biology analysis of the 95 samples collected from different dairy farms yielded no positive results.

The dairy farms involved in this study use pasture raising as the main milk production system, although silage has been identified as an important route of transmission of listeriosis among farm animals. Some authors argue that poor grazing and herd grouping may also be risk factors for the transmission of this disease (Varnam, 1991; George, 2002). The transmission of meningoencephalitis caused by *L. monocytogenes* in ruminants reportedly does not occur in Brazil in association with silage feeding (Santos et al., 2000; Schild, 2007).

The fact that raw milk is initially stored in bulk milk tanks is a factor of concern, given the storage temperature that this material may reach before it is mixed in expansion tanks, since it is known that bacterial counts are strongly influenced by temperature. Milk should be stored at dairy farms at temperatures below 4.5°C (Bueno et al., 2008).

It was observed that at 47% (9/19) of the dairy farms, the milk was stored in milk cans for at least one hour without refrigeration before it reached the community expansion tank. Although *L. monocytogenes* is a psychrotrophic bacterium, the multiplication of mesophilic bacteria that compete with *Listeria* can inhibit its proliferation. In addition, the dairy farms did not receive technical assistance, did not perform pre-dipping or post-dipping, the CMT, and had no milking line, which could favor the proliferation of pathogenic microorganisms commonly present in milk and handling equipment, and that could have negatively influenced the isolation of the pathogen in the milk samples (Santos & Fonseca, 2000).

After improving cow udder and teat hygiene prior to milking, Santana et al. (2001) observed a 99% reduction in mesophilic and psychrotrophic aerobic counts. Similarly, Santos and Fonseca (2000) also reported a reduction of up to 80% in the total bacterial count of milk, which they attributed to the practice of pre-dipping.

Among the dairy farms involved in this study, 78.2% (15/19) performed manual milking, which hypothetically already decreases the risk of *L. monocytogenes*. The reason for this is that, although it is an environmental microorganism, milk is usually contaminated in the pipelines or equipment of high yield farms, which are materials on

which *L. monocytogenes* can form a biofilm (Latorre et al., 2010). The small dairy farms of this study, which had on average 24 lactating cows producing a daily average of 80 liters, used little technified services.

The absence of *L. monocytogenes* can be attributed to the presence of contaminants in the samples, which came from the group of 19 dairy farms and were therefore contaminated with different microorganisms. Moreover, storing the milk in unrefrigerated cans until it reached the expansion tank may also have contributed to this result.

Langoni et al. (2009) identified the presence of *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* sp., *Bacillus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in a microbiological examination of milk samples from a group of dairy farms in the municipality of Botucatu, SP. Their study revealed a high degree of contamination of milk from dairy farms that use the same production system as the farms evaluated in this study.

In contrast, Catão and Ceballos (2001) isolated high proportions of *Listeria* spp., ranging from 66.6% to 86.6%, in samples of raw milk and skim milk. They reported finding high levels of fecal contamination, and a wide diversity of *Listeria* species in the raw milk, predominantly *L. monocytogenes*.

The FDA protocol used in this study did not succeed in inhibiting competing microorganisms. To evaluate this methodology, Besse et al. (2005) used Fraser broth to cultivate samples of salmon artificially contaminated with *Listeria* and introduced changes to minimize inhibitory interactions. They reported that, unlike the current practice of 48 hours, 24 hours of incubation of samples naturally contaminated with *Listeria* spp. sufficed to reach the maximum population level. They also demonstrated that this isolation of only 24 hours enabled the optimal recovery of multiple strains of the pathogen, suggesting the possibility of further reducing the enrichment time.

Competitive inhibition has already been described by other authors. Wei and Fang (2001) reported that the multiplication of *L. monocytogenes* was competitively inhibited by *Yersinia enterocolitica*. Farrag and Marth (1989) observed that *P. aeruginosa* may also have an inhibitory effect on *L. monocytogenes*. The findings of this study are corroborated by those of Bang et al. (2013), who state that the isolation of *L. monocytogenes* may be hindered by the multiplication of other bacteria, although they used BHI and TSBYE media, which are not selective for *L. monocytogenes*.

The PCR results obtained from milk samples or LEB were negative. However, PCR yielded positive results in the tests involving samples of either raw milk or LEB contaminated with *L. monocytogenes* ATCC. As discussed previously, contaminating microbiota can reportedly interfere with the multiplication of *Listeria* species (Gasarov et al., 2005). The reduction in pathogen multiplication also reduces the amount of DNA available for PCR detection.

Peres et al. (2010) did not detect *L. monocytogenes* by PCR in LEB after 24 hours of incubation in samples of whole raw milk or pasteurized skimmed milk. However, after 48 hours of enrichment in this broth, the bacterium was identified by PCR in skim milk, albeit not in whole raw milk.

On the other hand, in the tests carried out in this study, PCR yielded positive results in both pasteurized and whole raw milk samples experimentally contaminated with *L. monocytogenes* ATCC. In Peres et al.'s study (2010), the authors observed that the sensitivity of the traditional PCR methodology was reduced in raw milk with high counts of mesophilic aerobes. It is possible that this may also have been the case in our study, given that better results were obtained when the reaction was performed with material obtained directly from the suspect colony in solid medium (Peres et al., 2010). This suggests that phenotypic identification tests of *L. monocytogenes* may be replaced by the PCR technique, reducing the time spent in identifying the bacterium.

5. CONCLUSIONS

It is probable that the high contamination rate found in the cultures of bulk milk samples as well as the TBC found in the community expansion tank negatively affected the isolation and/or molecular detection of *Listeria monocytogenes* in milk samples.

The low microbiological quality and high cellularity of the milk indicate the need to adopt measures for the prevention and control of mastitis in the sampled herds, as well as health education projects aimed at hygienic milk production.

Despite the negative culture and PCR results, the pathogenicity of *L. monocytogenes* to animals and the public health risks it poses justify the continuation of studies aimed at the epidemiological surveillance of the agent in animal products such as milk.

6. ACKNOWLEDGEMENT

The authors gratefully acknowledge the financial support of FAPESP (São Paulo Research Foundation).

7. REFERENCES

- Bang, J., Beuchat, L. R., Song, H., Gu, M. B., Chang, H. I., Kim, H. S., & Ryu, J. H. (2013). Development of a random genomic DNA microarray for the detection and identification of *Listeria monocytogenes* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 161, 134-141.
- Barancelli, G. V., Silva-Cruz, J. V., Porto, E., & Oliveira, C. A. F. (2011). *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. *Arquivos do Instituto Biológico*, 78, 155-168.
- Besse, N. G., Audinet, N., Kerouanton, A., Colin, P., & Kalmokoff, M. (2005). Evolution of *Listeria* populations in food samples under going enrichment culturing. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 123-134.
- Buchanan, R. L., Gorris, L. G., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 75, 1-13.
- Bueno, V. F. F., De Mesquita, A. J., De Oliveira, A. N., Nicolau, E. S., & Neves, R. B. S. (2008). Contagem bacteriana total do leite: relação com a composição centesimal e período de validade no Estado de Goiás. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 15, 40-44.
- Catão, R. M. R., & Ceballos, B. S. O. (2001). *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E. coli* em leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21, 281-287.
- De Freitas Guimarães, F., Nóbrega, D. B., Richini-pereira, V. B., Marson, P. M., De Figueiredo Pantoja, J. C., & Langoni, H. (2013). Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive *Staphylococci* isolated from bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 96, 2866-2872.
- Eneroth, A., Ahrné, S., & Molin, G. (2000). Contamination of milk with Gram-negative spoilage bacteria during filling of retail containers. *International Journal of Food Microbiology*, 57, 99-106.
- Farrag, S. A., Marth, E. H. (1989). Behavior of *Listeria monocytogenes* when incubated together with *Pseudomonas* species in tryptose broth at 7 and 13 °C. *Journal of Food Protection*, 52, 536-539.
- Gasanov, U.; Hughes, D.; Hansbro, P. M. (2005). Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS microbiology reviews*, 29, 851-875.
- George, L. W. (2002). Listeriosis. In: Smith, B. P. *Large animal internal medicine*. (3th ed.). (pp. 946-949). St. Louis: Mosby.
- Jay, J. M. (2000). Foodborne Listeriosis. In: *Modern food microbiology*. (6th ed.) (pp. 485-504). Gaithersburg: An Aspen Publication, (Chapter 25).
- Langoni, H. (2013). Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33, 620-626.

- Langoni, H., Sakiyama, D. T. P., Guimarães, F. D. F., Menozzi, B. D., & Silva, R. C. D. (2009). Aspectos citológicos e microbiológicos do leite em propriedades no sistema orgânico de produção. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29, 881-886.
- Latorre, A. A., Van Kessel, J. S., Karns, J. S., Zurakowski, M. J., Pradhan, A. K., Boor, K. J., ... Schukken, Y. H. (2010). Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*, 93, 2792-2802.
- Martins, E. S., & Reis, N. E. V. (2014). Qualidade microbiológica do leite cru em função de medidas profiláticas no manejo de produção. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 8, 216-222.
- McLauchlin, J. (1997). The identification of *Listeria* species. *International Journal of Food Microbiology*, 38, 77-81.
- Merussi, G. D., Maffei, D. F., & Catanozi, M. D. P. L. M. (2013). Surtos de gastroenterite relacionados ao consumo de laticínios no estado de São Paulo no período de 2000 a 2010. *Alimentos e Nutrição*, 23, 646.
- Murphy, S. C., & Boor, K. J. (2000). Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. *Dairy Food and Environmental Sanitation*, 20, 606-611.
- Peres, N. D., Lange, C. C., Brito, M. A. V. P., Brito, J. R. F., Arcuri, E. F., & Cerqueira, M. M. O. P. (2010). Detection of *Listeria monocytogenes* by PCR in artificially contaminated milk samples. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 62, 973-979.
- Rousseaux, S., Olier, M., Lemaitre, J. P., Piveteau, P., & Guzzo, J. (2004). Use of PCR restriction fragment length polymorphism of *inlA* for rapid screening of *Listeria monocytogenes* strains deficient in the ability to invade Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2180-2185.
- Santana, E. D., Beloti, V., Barros, M. D. A. F., Moraes, L. B., Gusmão, V. V., & Pereira, M. S. (2001). Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrótrófos. *Semina, Ciências Agrárias*, 22, 145-154.
- Santos, M. V. & Fonseca, L. F. L.; Qualidade do leite e controle da mastite. São Paulo: Lemos, 2000.
- Schild, A. L. Listeriose. In: Riet-Correa, F., Schild, A. L., Lemos, R. A. A., & Borges, J. R. J. (2007). *Doenças de ruminantes e eqüídeos*. (3th ed.) (pp. 352-357). Santa Maria: Pallotti.
- Shah, N. P. (1994). Psychrotrophs in milk: a review. *Milchwissenschaft*, 49, 432-437.
- Sørhøug, T., & Stepaniak, L. (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 8, 35-41.
- Varnam, A. H. (1991). *Foodborne pathogens*. St. Louis: Mosby Year Book.
- Wei, Que-king & Fang, Tony J. (2001) Validation of growth models for *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in cooked chicken meat. *Journal of Food and Drug Analysis*, 9, 3.