

RESSALVA

Alertamos para ausência de Capa e Folha de Rosto, não incluídas pela autora no arquivo original.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Vieira, Fabiani de Paiva.

Avaliação das condições higiênico-sanitárias de leite *in natura*, pós processamento térmico e pesquisa de importantes patógenos / Fabiani de Paiva Vieira. – Botucatu : [s.n.], 2007.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2007.

Orientador: Prof. Dr. Vera Lúcia Mores Rall

Assunto CAPES: 40602001

1. Segurança alimentar. 2. Saúde pública. 3. Listeria. 4. Leite - Análise.

CDD 637.127

Palavras chave: Qualidade microbiológica do leite; *Listeria*; PCR; Enterotoxinas estafilocócicas; *Staphylococcus aureus*

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Autora: Fabiani de Paiva Vieira

Título: Avaliação das condições higiênico-sanitárias de leite *in natura*, pós processamento térmico e pesquisa de alguns patógenos.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Ass. Dr^a Vera Lúcia Mores Rall Instituição: IB – UNESP – Botucatu

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof Ass. Dr José Paes de A. N. Pinto Instituição: FMVZ – UNESP – Botucatu

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof Adjunto Rogério Lopes Vieitis Instituição: FCA - UNESP – Botucatu

Julgamento _____ Assinatura: _____

Dedico:

Às pessoas mais importantes da minha vida, minha família:

Pai Jathir, mãe Clarice, irmão Fábio, meu marido André, filhinho Rafael, meus avôs e avó (Jão, Zita e Tomé *in memoriam*) e minha querida avó Maria José, que fazem e/ou fizeram de suas vidas, o meu exemplo de vida.

“A minha graça te basta.

O meu poder se aperfeiçoa na sua fraqueza”

II COR 12:9

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as bênçãos e graças para com a minha vida.

Aos meus pais, Jathir e Clarice por todo incentivo e imensa colaboração em tudo que se possa imaginar.

Ao meu irmão, Fábio, por sempre me socorrer em viagens e brigas com o computador.

Ao meu marido André e meu filho Rafael, pela compreensão em fases difíceis e ausentes.

À minha querida e divertida companheira do dia a dia, Nice, por toda dedicação e companhia dedicados a mim e, principalmente a meu filho Rafael, durante tanto tempo.

À Cíntia e à Sabrina, por brincarem e dar atenção ao meu filho em períodos de minha ausência.

À todos meus queridos amigos, sem exceção. Por estarem sempre presente, para conversar, rir e me sentir tão à vontade e querida.

Agradecimento com carinho para Wilma, por sua amizade, desprendimento e apoio.

Agradecimento especial à minha orientadora Vera, por acreditar acima de tudo em minha vontade de aprender e ainda, por toda compreensão, paciência, ensinamentos e dedicação, dignas de uma verdadeira “Mestre”.

A todos funcionários, técnicos e estagiários que colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos proprietários dos laticínios pela doação das amostras.

Ao pessoal da pós graduação, por toda orientação.

Às bibliotecárias Selma e Rosemeire pela orientação de catalogação e edição para confecção da dissertação.

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 01. Oligonucleotídeos e suas propriedades utilizados na detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> produtores de toxinas A, B, C, D, E, G, H e I, J.....	32
Tabela 02. Resultados das análises microbiológicas, no Laticínio 1, do leite <i>in natura</i> , pasteurizado e na data de validade.....	35
Tabela 03. Resultados das análises microbiológicas, no Laticínio 2, do leite <i>in natura</i> , pasteurizado e na data de validade.....	37
Tabela 4. Resultados das análises microbiológicas, no Laticínio 3, do leite <i>in natura</i> , pasteurizado e na data de validade.....	39
Tabela 5. Resultados das análises microbiológicas, no Laticínio 4, do leite <i>in natura</i> , pasteurizado e na data de validade.....	41
Tabela 6. Resultados das análises microbiológicas, no Laticínio 5, do leite <i>in natura</i> e pasteurizado.....	42
Tabela 7: Perfil genotípico das cepas de <i>S. aureus</i> , isolados a partir do leite cru, pasteurizado e na data de validade, em relação às toxinas A, B, C, D, E, G, H, I e J.....	46

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Gel de eletroforese do produto da PCR do gene <i>inlA</i> , usando <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	44
Figura 2. Gel de eletroforese do produto da PCR das toxinas A, B, C, D, E, G, H, I e J de <i>Staphylococcus aureus</i>	45
Figura 3. Distribuições dos genes produtores de enterotoxinas A, B, C, D, E, G, H, I e J, das cepas cepas isoladas do leite cru, recém pasteurizado e na data de validade.....	47

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. Produção e consumo de leite no Brasil.....	7
2.2. Qualidade microbiológica do leite no Brasil.....	8
2.3. Principais patógenos encontrados no leite.....	13
2.3.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	13
2.3.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.3.3. <i>Salmonella</i>	21
2.4. Coliformes.....	22
2.4.1. Coliformes totais.....	23
2.4.2. Coliformes termotolerantes.....	23
3. OBJETIVOS	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Obtenção das amostras para análises.....	25
4.2. Análises Microbiológicas.....	26
4.2.1. Preparo das amostras e suas diluições.....	26
4.2.2. Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes	26
4.2.3. Enumeração e identificação de <i>S. aureus</i>	27
4.2.4. Detecção da presença <i>Salmonella</i>	28
4.2.5. Detecção da presença de <i>Listeria</i>	28
4.3. PCR de <i>S. aureus</i> e <i>Listeria</i>	29
4.3.1. Extração e Purificação de DNA.....	29
4.3.2. Amplificação do ácido nucléico (PCR).....	30
4.3.3. Visualização dos produtos amplificados.....	31
4.4. Análise estatística.....	33
5. RESULTADOS	34
6. DISCUSSÃO	48

7. CONCLUSÃO.....	55
8. BIBLIOGRAFIA.....	57

RESUMO

VIEIRA, F.P. **Avaliação das condições higiênico-sanitárias de leite *in natura*, pós processamento térmico e pesquisa de alguns patógenos.** Botucatu. 2007. 73p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – Botucatu.

O leite é considerado um dos alimentos mais ricos nutricionalmente devido sua composição protéica, de vitaminas e sais minerais, podendo ser consumido, também na forma de derivados como queijos, iogurtes, manteiga e sobremesas. Entretanto, esse alimento pode ser veículo de várias bactérias patogênicas, como *L. monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157: H7, *Salmonella* sp e *S.aureus* produtor de enterotoxina. Esses microrganismos podem contaminar o leite em qualquer etapa de produção, beneficiamento, distribuição e consumo. Os objetivos do trabalho foram avaliar o leite quanto ao perfil higiênico-sanitário em várias etapas, como o leite cru, recém pasteurizado e na data de validade, através da determinação do Número Mais Provável de coliformes termotolerantes, além da pesquisa da presença de *Salmonella* e *Listeria* e enumeração de *Staphylococcus aureus*. Também foram pesquisados os genes responsáveis pela produção das enterotoxinas tipos A, B, C, D, E, G, H, I e J, a partir das cepas isoladas. Considerando-se as 54 amostras de leite cru dos cinco laticínios visitados, todas estavam contaminadas por coliformes termotolerantes, em valores que variaram de $2,1 \times 10^2$ NMP/ml a $1,1 \times 10^6$ NMP/ml de leite. *S. aureus* foi observado em 38 (70,4%) dessas amostras, em valores de até $8,9 \times 10^5$ UFC/ml. Em relação à presença de *Listeria* sp, pela metodologia tradicional, foram detectadas 16 amostras positivas (29,6%), sendo 7 de *L. monocytogenes* (13% do total de amostras). Pela técnica de PCR, *L. monocytogenes* foi observada em 12 amostras (22,2%). Dentre as 54 amostras de leite recém pasteurizado, 18 amostras (33,3%) estavam fora dos padrões estabelecidos pela RDC N°12, em relação ao número de coliformes termotolerantes, chegando à valores de até $1,5 \times 10^2$ NMP/ml. Foi observada positividade em 5 amostras (9,3%) em relação à presença de *Listeria* sp, sendo 3 de *L. monocytogenes* (5,6%) e 2 de *L. innocua* (3,7%). *S. aureus* foi observado

em 8 (14,7%) das 54 amostras, em concentração de até $8,7 \times 10^3$ UFC/ml. Nas 54 análises de leite na data de validade, 32 (59%) estavam em desacordo com os padrões, atingindo valores de até $2,1 \times 10^2$ NMP/ml de coliformes termotolerantes. *Listeria* sp foi detectada em 10 amostras (18,5%), sendo 4 de *L. monocytogenes* e de *L. innocua* (7,4%) e três de *L. ivanovii* (5,6%). *Salmonella* não foi isolada em nenhuma das 162 amostras analisadas. Foram identificadas 57 cepas de *S. aureus*, das quais 39 (68,4%) foram positivas para um ou mais genes que codificam para as diversas enterotoxinas pesquisadas e 12 genótipos distintos foram observados. Independentemente de sua origem (leite cru ou pasteurizado), a presença de somente um gene responsável pela produção de enterotoxinas foi observada em 25 cepas (64,1%), 9 apresentaram genes para a produção de duas enterotoxinas e 2 (5,1%), genes para três delas, *sea+sec+seh*. Perfil genotípico para a produção de até quatro enterotoxinas ocorreu em 3 cepas. O gene para a enterotoxina A foi o mais encontrado, em 16 isolados (41%). O leite analisado neste trabalho apresentou baixa qualidade microbiológica, o que exige esforços governamentais e de toda a cadeia produtiva, visando a segurança do consumidor.

Palavras chave: leite, *Listeria*, PCR, enterotoxinas estafilocócicas, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

VIEIRA, F.P. **Evaluation of the hygienic-sanitary conditions of milk *in natura*, after thermic manufacturing and research of some pathogens.** Botucatu. 2007. 73p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – Botucatu.

Milk is considered a nutritious food, due its composition, with protein, vitamins and mineral salts and could be consumed as cheeses, yogurts, butter and desserts. However, it can be vehicle of several pathogenic bacteria as *L. monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157: H7, *Salmonella* sp and *S. aureus*. Those microorganisms can contaminate the milk in any production stage, improvement, distribution and consumption. The aim of this study was search the hygienic condition of milk in several stages, as the raw milk, pasteurized and in the validity date, through the determination of the Most Probable Number of thermotolerants coliforms, besides the research of the presence of *Salmonella* and *Listeria* and enumeration of *Staphylococcus aureus* and its genes encoded A, B, C, D, E, G, H, I and J enterotoxins. Among 54 raw milk samples, all of them presented thermotolerants coliforms, invalue that varied from 2.1×10^2 MPN/ml to 1.1×10^6 MPN/ml. *S. aureus* was present in 38 (70.4%) of those samples, in values of up to $8,9 \times 10^5$ CFU/ml. About *Listeria* sp presence, using the traditional methodology, 16 samples were positive (29.6%) and 7 were *L. monocytogenes* (13% of the total of samples). PCR technique detected *L. monocytogenes* in 12 samples (22.2%). Analyzing 54 samples of milk pasteurized, 18 (33.3%) were out of the patterns according to RDC N°12, in relation to the number of thermotolerants coliforms, with values up to $1,5 \times 10^2$ MPN/ml. Five samples (9.3%) reveled the presence of *Listeria* sp, with 3 *L. monocytogenes* (5.6%) and 2 *L. innocua* (3.7%). *S. aureus* was observed in 8 (14.7%) of the 54 samples, in concentration up to 8.7×10^3 CFU/ml. Of the 54 pasteurized milk in the validity date, 32 (59%) were in disagreement with the patterns, reaching values up to 2.1×10^2 MPN/ml of thermotolerants coliforms. *Listeria* sp was detected em 10 samples (18.5%), and 4 were *L. monocytogenes* and *L. innocua* (7.4%) and three, *L. ivanovii* (5.6%).

Salmonella was not isolated in none of the 162 analyzed samples. Furthermore, 57 *S. aureus* strains, 39 (68.4%) were positive for one or more genes encoding the enterotoxins and 12 different genotypes were observed. Independently of its origin (raw milk or pasteurized), the presence of only one gene was observed in 25 strains (64.1%), 9 presented genes for the production of two enterotoxins and 2 (5.1%), for three, *sea+sec+seh*. Genotypic profile for the production of four enterotoxins occurred in 3 isolates. The gene for the enterotoxin A was the most frequently, in 16 (41%). The milk presented low quality, demanding governmental efforts and from the whole productive chain, seeking the consumer's safety.

Keywords: milk, *Listeria*, PCR, staphylococcal enterotoxins; *Staphylococcus aureus*

1. INTRODUÇÃO

O alimento é um importante elo na cadeia epidemiológica de doenças transmissíveis. Sua conservação em condições não adequadas favorece a multiplicação de microrganismos que podem levar à alterações dos alimentos e/ou causar sintomas de toxinfecções alimentares nos seus consumidores (LAMPS, 2003).

De acordo com o mesmo autor, 1.300 surtos de origem alimentar ocorrem anualmente envolvendo, aproximadamente, 76 milhões de indivíduos, com 325 mil internações e 5 mil mortes, somente nos Estados Unidos. Segundo Anderson et al. (2004) e Frenzen (2004), se forem considerados todos os casos, inclusive os não relatados, não tratados e não diagnosticados, esse número pode ser maior, de 80 milhões por ano, com prejuízo entre cinco e 17 bilhões de dólares, incluindo gastos com tratamento médico e ausência de doentes às atividades profissionais.

No Brasil não existem dados oficiais sobre a real situação das toxinfecções alimentares (FRANCO et al., 2003). A literatura nacional apresenta trabalhos que, na sua maioria, descrevem a presença de patógenos em vários alimentos, porém a descrição de surtos e casos raramente é documentada (PEREIRA et al., 2001; SILVA et al., 2001). Somente algumas Secretarias Estaduais de Saúde investigam surtos de toxinfecções alimentares. No Estado de São Paulo, dos 105 surtos de doenças de origem alimentar em 1999, somente 36 (34,3%) tiveram seu agente etiológico identificado, sendo o mais comum a *Salmonella* (23,8%), seguido por *Staphylococcus aureus* (4,8%) (São Paulo, 2007)

Um surto de origem alimentar é caracterizado quando: (a) duas ou mais pessoas apresentam sintomas similares após ingestão do mesmo alimento e (b) a análise epidemiológica implica um alimento como a fonte da doença (BEAN et al., 1990). Os sintomas clínicos de uma toxinfecção podem variar desde brandos, ocorrendo náuseas, vômitos e diarreia, até quadros mais graves, com comprometimento do sistema nervoso central e diarreias muito severas.

O leite é considerado um dos alimentos mais ricos nutricionalmente devido à sua composição protéica, de vitaminas e sais minerais, podendo ser

consumido na forma original ou como derivados (queijos, iogurtes, manteiga e sobremesas). Esse alimento pode ser veículo de várias bactérias patogênicas, como *L. monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* sp e *S.aureus* produtor de enterotoxina (MOURA et al., 1993; SILVA et al., 2000; FRANCO et al., 2000). Esses microrganismos podem contaminar o leite em qualquer uma das etapas de produção, beneficiamento, distribuição e consumo. Práticas inadequadas de manejo no momento da ordenha, a higienização deficiente de equipamentos e armazenamento e conservação inadequados podem tornar o leite susceptível à contaminação por patógenos.

Deve ser salientado, ainda, os cuidados com a sanidade do rebanho, como vacinações periódicas, controle de parasitas, doenças e alimentação (FRANCO et al., 2000). A pasteurização objetiva a destruição de todos os microrganismos patogênicos, sendo a presença destes no leite pasteurizado um indicativo de contaminação pós-pasteurização ou falhas no processo (BOOR, 1997).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produção e consumo de leite no Brasil

Em 2002, o Brasil produziu 23,3 milhões de toneladas de leite, correspondendo a 32,3 % do total de leite produzido na América do Sul e 4 % do produzido no mundo. Aproximadamente, 20 a 40 % da produção ocorre em propriedades de pequeno e médio porte, produzindo de 50 a 500 L/dia, que é destinada a cooperativas que realizam a transferência do leite cru refrigerado às grandes indústrias processadoras de leite. Em 2005, esse volume aumentou para 25 milhões (EMBRAPA, 2007).

Basicamente, a coleta do leite pode ser realizada por três tipos de ordenha. Na ordenha manual, o leite é retirado em baldes e transferido para latões; na ordenha em sistema semi-fechado, a coleta é realizada por ordenhadeiras mecânicas e o leite é direcionado para latões e, na ordenha em sistema fechado, o leite é retirado por ordenhadeiras mecânicas e transferido, por tubulações de aço inox, para um tanque resfriador, sem ocorrer qualquer tipo de manipulação ou contato com o ambiente (FONSECA & SANTOS, 2000).

A despeito dos atuais esforços do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), ainda é muito comum a observação de latões sem qualquer resfriamento deixados à beira da estrada para serem coletados pelos caminhões de cooperativas, mas apesar desse problema, a maior parte do leite produzido acaba sendo beneficiada (IBGE, 2004). Ainda assim, em cidades de pequeno e até de grande porte, ainda é comum a comercialização de leite cru, atualmente denominado informal, mesmo sendo proibida por lei desde 1952 (Brasil, 1952). Pelos dados fornecidos pelo IBGE (2004), aproximadamente, de 35 a 42% da produção leiteira no Brasil parece ser comercializada deste modo.

Essa prática ainda ocorre por vários fatores, como flutuações na economia, que levam o produtor a procurar alternativas de lucro, além da existência de um mercado consumidor que acredita que esse tipo de leite apresenta maiores vantagens nutricionais em relação ao beneficiado, além do

preço, fatores emocionais, comodidade na entrega e pagamento (BELOTI et al., 1999; NERO et al., 2003a).

Muitas vezes, o produto natural é confundido com orgânico pela população, e segundo Enticott (2003), a preferência pelo leite cru ocorre, também, pela procura do consumidor por alimentos “naturais”, “tradicionais” e locais.

2.2. Qualidade microbiológica do leite no Brasil

Em todo o mundo, a qualidade do leite destinado ao consumo humano vem preocupando os pesquisadores e autoridades, devido sua importância nutricional, econômico-social e de saúde pública, pois a utilização do leite de má qualidade microbiológica pela indústria pode acarretar em perdas econômicas e riscos à saúde do consumidor.

Entretanto, a maioria das propriedades leiteiras no Brasil apresenta pouca tecnologia, deficiência no controle sanitário dos animais e na higienização, gerando um produto sabidamente de baixa qualidade.

O leite é naturalmente um meio de cultura, rico em nutrientes, que o torna suscetível ao ataque de um grande número de microrganismos do meio ambiente, do próprio animal, do homem e de utensílios utilizados na ordenha (FRANCO et al., 2000).

Segundo Hayes (1993), o leite obtido assepticamente, contém, aproximadamente, entre 10^2 a 10^3 UFC de microrganismos mesófilos/mL, entretanto, o leite recém ordenhado em condições inadequadas pode apresentar uma carga bacteriana um pouco mais elevada, entre 5×10^3 a 5×10^4 mesófilos/mL, compreendendo os contaminantes procedentes de várias fontes. Essa grande concentração de microrganismos se desenvolve usando o leite como substrato e produzindo ácido láctico, entre outros (EVANGELISTA, 1992). Os Gram negativos secretam enzimas como lipases, que são hidrolases que atuam principalmente na posição α dos triglicerídeos, causando a lipólise do leite antes da pasteurização (CASTBERG, 1992).

A extensão territorial do Brasil e a grande variabilidade das condições sócio-econômicas e culturais dificultam a divulgação e a adoção das boas práticas tecnológicas, que são fundamentais durante a produção.

No Brasil, a criação do gado leiteiro ocorre em regiões com diferentes condições climáticas e econômicas. Para a melhoria da qualidade do produto final, o resfriamento do leite tem sido feito no local da ordenha, tornando possível a coleta de grandes quantidades de leite, com redução de custos e a melhoria da qualidade (SOBRINHO et al., 1995).

O início da coleta a granel ocorreu a partir de 1996, mas somente em 1997, o processo realmente passou a ser implantado numa maior escala, após a implantação de alguns serviços básicos como a chegada de energia elétrica a lugares mais distantes e a melhoria da qualidade das estradas (SILVA et al., 1999).

Nesse sistema, o leite é estocado em tanques de expansão em temperaturas de 4°C por até 48 horas, com transporte em caminhões isotérmicos até às indústrias. O leite deve ser refrigerado em até 2 horas após a ordenha, em temperatura inferior a 7°C, em casos de coletas diárias. Se esta ocorrer em intervalos de 48 horas, recomenda-se de 2°C a 5°C. Este método não elimina os microrganismos já presentes no leite e sua utilização necessita de um manejo adequado antes, durante e depois da ordenha. O principal objetivo desse processo de conservação é a inibição do crescimento bacteriano, visando o aproveitamento do leite da segunda ordenha, mas não elimina e nem interrompe totalmente a atividade enzimática sendo, portanto, fundamental tornar a contaminação inicial a menor possível (FONSECA, 1998).

A refrigeração do leite pode ser realizada pelo método de imersão, que consiste em colocar os latões de leite em tanques com água gelada, o suficiente para cobrir os latões e aí permanecendo até o momento da coleta. Também pode ser utilizado o método de resfriamento em tanques de expansão onde o leite é colocado em um tanque de aço inox com paredes duplas e serpentinas, onde ocorre a expansão do líquido refrigerante e, para facilitar a troca de calor, o leite é mantido sob agitação mecânica. A última alternativa é o método de resfriamento em placas, onde o leite é bombeado passando por um conjunto de finas placas de aço inox em contra corrente com água gelada (FONSECA, 1998).

Na realidade, no Brasil, a qualidade microbiológica do leite cru produzido em várias regiões do país é ruim, apresentando altas concentrações de microrganismos indicadores das condições higiênico-sanitárias como mesófilos e coliformes termotolerantes (FRANCO et al., 2000; LOURENÇO & SILVA, 2000; BUENO et al., 2002; VIANA et al., 2002; BELMONTE & LAGO, 2004; PONSANO et al., 2004). Os coliformes, além de serem indicadores das características de higiene na produção, também podem produzir uma série de enzimas que podem comprometer a qualidade dos derivados.

Em Viçosa (MG), Carmo et al. (2003) analisaram 27 amostras de leite cru antes da refrigeração e estocagem por 48 horas em tanques de granelização coletivos e mais quatro amostras após esse período, em relação à contagem de mesófilos e observaram que 27% das amostras individuais apresentaram contagens superiores a 10^6 UFC/mL, que é o limite máximo proposto pela legislação para a região Sudeste. Entre as 4 amostras granelizadas, duas apresentaram contagens superiores a 10^6 UFC/mL e duas superiores a 10^7 UFC/mL. Os autores constataram que essa alta contaminação podia estar relacionada com procedimentos higiênicos inadequados dos utensílios e equipamentos, com a saúde e higiene dos animais e com a contaminação ambiental.

Resultados semelhantes foram obtidos por Pinto et al. (2005), que analisaram, no Rio Grande do Sul, 12 amostras de leite cru, retiradas do caminhão de transporte e verificaram que a temperatura variou de 10 a 17°C e a contagem de mesófilos variou de 5,4 a mais de 7,4 log UFC/mL.

Contaminação maior foi observada por Martins et al. (2005), em Jaboticabal (SP), que analisando 10 amostras de leite cru, obtiveram contagens de até $2,4 \times 10^8$ UFC/mL de mesófilos.

Em Goiás, Quintana et al. (2005) analisaram 250 amostras de leite pasteurizado e 250 de cru, onde 50% das amostras de leite cru apresentava contagens superiores a 10^4 UFC/mL em 52%, o número de psicotróficos ultrapassou 10^5 UFC/mL. No leite pasteurizado 5% das amostras apresentaram índices acima de 10^5 UFC/mL de bactérias mesófilas. Outro trabalho sobre a má qualidade do leite *in natura* foi relatado por Passos et al. (2005), na cidade de Senhor do Bonfim (BA), onde houve a coleta de 20 amostras de leite e

todos apresentaram coliformes termotolerantes em concentrações que variaram de $2,4 \times 10^2$ a $2,4 \times 10^5$ NMP/mL.

No Rio de Janeiro, Athayde et al. (2005) analisaram 3 marcas diferentes de leite UHT e verificaram que 90% das 30 amostras estavam fora dos padrões recomendados quanto ao número de microrganismos mesófilos. Analisando o mesmo tipo de leite, Bersot et al. (2005) observaram valores menores, onde 38 (25,3%) de 150 amostras analisadas apresentaram contagem de mesófilos acima do padrão estabelecido pela legislação. Em Alagoas, Silva et al. (2005b) analisaram 110 amostras de leite tipo C e 65 (59,1%) estavam com excesso de coliformes termotolerantes.

Entretanto, Rangel e Klein (2005), em Concórdia (SC) observaram que as 16 amostras de leite pasteurizado tipo C e as 20 UHT estavam dentro dos padrões estabelecido pela RDC Nº12 da Anvisa (2001), que permite até 4 coliformes termotolerantes/ml e exigem a ausência de *Salmonella* em 25 ml do produto.

Também é relatada a presença de microrganismos psicotróficos, ou seja, os que possuem habilidade para crescer em temperaturas entre 0°C a 35°C com temperatura ótima de 24°C (FRANK, 2001). Esses microrganismos são deteriorantes e produtores de enzimas termorresistentes que agem sobre os constituintes do leite causando alterações físico-químicas e organolépticas. Devido à refrigeração durante a estocagem, transporte e comercialização do leite, esse grupo de microrganismos tornou-se uma das principais populações da microbiota desse produto. Inicialmente constituem menos de 10% da microbiota inicial do leite cru, entretanto, se multiplicam rapidamente, tornando-se predominantes no produto sob refrigeração, representando de 70 a 75% de toda a microbiota, caso o leite seja obtido em condições inadequadas de higiene (CHAMPAGNE et al., 1994; SHAH, 1994). Esse grupo de bactérias raramente é encontrado no úbere das vacas e a contaminação ocorre devido a higienização inadequada de utensílios e equipamentos utilizados durante a ordenha (COX, 1993).

No Ceará, Silva et al (2005a) analisaram amostras de leite tipo C, quanto ao número de psicotróficos e concluíram que, a partir do segundo dia, as contagens já estavam maiores que 10^6 UFC/ml, inviabilizando seu consumo e sugerindo negligência por parte dos produtores. No mesmo ano, em Alagoas,

Silva et al (2005b) analisaram 110 amostras de leite e 15 (13,6%) estavam fora dos padrões em relação à concentração de psicotróficos pela Normativa 51/2002.

O leite cru pode veicular uma série de microrganismos patogênicos e mais de 90% de todos os casos de doenças de origem alimentar envolvendo leite e derivados, são de origem bacteriana envolvendo, pelo menos, 21 patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium botulinum* (BEAN et al., 1996). A presença dessas bactérias no leite é um problema de saúde pública, principalmente entre os indivíduos que ainda tomam leite não pasteurizado (RYSER, 1998). Mais recentemente, *E. coli* 0157:H7 se tornou um sério problema para a indústria de laticínios, causando surtos em países desenvolvidos, variando desde diarreia branda à colite hemorrágica, Síndrome Urêmica Hemolítica (SUH) e trombocitopenia fatais (BLEEM, 1994; COIA et al., 2001).

Segundo os parâmetros da RDC Nº 12 (2001), são permitidos até 4 coliformes termotolerantes/mL, com ausência de *Salmonella* em 25 mL do produto, para leite pasteurizado. Para leites que sofreram pasteurização tipo UHT, não existem parâmetros para amostra indicativa, somente “não deve apresentar microrganismos patogênicos e causadores de alterações físicas, químicas e organolépticas do produto, em condições normais de armazenamento”.

2.3. Principais patógenos encontrados no leite

2.3.1. *Listeria monocytogenes*

Listeria são bacilos Gram positivos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, não capsulados, móveis sob temperatura entre 10°C a 25°C e podem ser isolados em diferentes ambientes, incluindo solo, água, em grande variedade de alimentos e de fezes humanas e animais. Dentro desse gênero, encontram-se seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi* (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Listeria monocytogenes tem sido considerada um importante patógeno de origem alimentar. É um contaminante ambiental, sendo transferida para humanos através de alimentos contaminados durante ou após o processamento. Sua transmissão está associada principalmente a alimentos prontos para o consumo, que são estocados em temperaturas de refrigeração por um longo tempo (CHHABRA et al., 1999).

A habilidade da *L. monocytogenes* em sobreviver e crescer em várias temperaturas, em altas concentrações de sal e pH baixo, faz deste microrganismo um potencial perigo no leite e seus derivados, que estão frequentemente associados a surtos de infecções de origem alimentar (LONGHI et al., 2003).

L. monocytogenes é uma preocupação mundial para a indústria de alimentos. Capaz de causar diversas doenças em humanos e animais, está associada a abortos, meningoencefalites, septicemia, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (AZNAR & ALARCÓN, 2003). Também produzem enzimas extracelulares (proteases e lipases), termorresistentes, cuja atividade residual afeta a qualidade dos produtos finais, mesmo na ausência de células bacterianas viáveis (CHEN et al., 2003). Embora a incidência de listeriose seja baixa, sua alta taxa de mortalidade (26,8%) faz de *L. monocytogenes* um importante patógeno humano (JINNEMAN & HILL, 2001).

A maior parte dos surtos tem sido associada ao consumo de alimentos contaminados (FARBER & PETERKIN, 1991). Classicamente, listerioses de origem alimentar acometem em populações susceptíveis (idosos, grávidas,

imunodeprimidos), causando bacteremias e raramente sendo associada a gastroenterites (SLUTSKER & SCHUCHAT, 1999). Entretanto, recentemente, uma nova forma de listeriose não invasiva causou sintomas gastrointestinais, indicando que pessoas sem qualquer predisposição podem ser afetadas (AURELI et al., 2000).

As duas formas clínicas podem diferir quanto à intensidade dos sintomas, população alvo, dose mínima infectante e tempo de incubação (SCHLECH, 1997). Os passos do mecanismo clássico da infecção por *L. monocytogenes* incluem aderência e internalização, escape do lisossoma no citoplasma da célula hospedeira, multiplicação e movimentação a partir da cauda de filamentos de actina e invasão das células adjacentes. Na população susceptível, pequenas quantidades de bactérias ingeridas com o alimento podem atravessar a barreira intestinal, entrar na corrente sanguínea, se multiplicar no fígado e baço e, na ausência de uma resposta imune adequada, podem se espalhar para outros órgãos como sistema nervoso central e placenta (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001). Em indivíduos saudáveis, são necessárias grandes quantidades de células para ocorrer a invasão dos enterócitos, com sintomas gastrointestinais e febre, mas sem progressão para uma infecção sistêmica (SCHLECH, 1997).

Estudos demonstraram que o maior fator de contaminação de produtos alimentícios por *L. monocytogenes* ocorre devido contaminação cruzada como o ambiente e equipamentos da planta de processamento da matéria prima (WENDTLAND & BERGANN, 1994). Produtos lácteos são suscetíveis à contaminação devido aos fatores que cercam sua produção e manipulação, como os animais, o ambiente de produção e a temperatura de armazenamento (KOZAK, 1996).

Em 1979, nos Estados Unidos, ocorreu o primeiro relato de listeriose veiculada por alimentos, onde 20 pacientes internados apresentaram a doença, após o consumo de verduras contaminadas. Nas décadas de 80 e 90 continuaram surgir relatos, em outras partes do mundo, associando listeriose ao consumo de alimentos de origem vegetal e animal, incluindo leite e derivados (PITT et al., 2000; Mc LAUHLIN et al., 2004).

Atualmente, leite e seus derivados são veículos comumente associados a surtos de listeriose. Nos Estados Unidos, mais de 150 casos de listeriose, com 54 mortes, resultaram do consumo de leite pasteurizado e queijo do estilo mexicano contendo *Listeria monocytogenes* (JAY, 2005). Anteriormente, outro surto associado ao consumo de queijo havia sido relatado na Suíça, decorrente da ingestão de queijo tipo Vacherin Mount d'Or contaminado, envolvendo mais de 120 pessoas e 32 mortes (PITT et al., 2000).

A presença dessa bactéria tem sido frequentemente reportada em leite. Em 2004, na Malásia, Chye et al. observaram a presença de *Listeria* sp em 4,6% de 360 amostras de leite cru, com isolamento de *L. monocytogenes* (1.9%), *L. innocua* (2.1%) e *L. welshimeri* (0.6%).

Análises tradicionais para detecção de alguns patógenos consistem da utilização de meios de cultura para enriquecimento e isolamento de colônias de microrganismos em meios de cultura apropriados (CORRY et al., 1995). Esse tipo de técnica requer vários dias para que se obtenham resultados confiáveis – ou até mesmo semanas no caso de necessidade de confirmação bioquímica. Métodos convencionais de isolamento usados para *Listeria* incluem pré-enriquecimento em meio seletivo e posterior semeadura em agar seletivo. Colônias suspeitas são confirmadas bioquimicamente, requerendo de 4 a 7 dias para obtenção dos resultados positivos (BENNET et al., 1998).

Em contrapartida, métodos moleculares baseados em amplificação pela PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) são alternativas viáveis para a detecção de microrganismos em amostras de alimentos. Rapidez, especificidade e sensibilidade são suas maiores vantagens e a susceptibilidade a substâncias inibitórias presentes em amostras com matrizes complexas, como alimentos, é uma das desvantagens. Assim, a aplicação de PCR em alimentos requer cuidados efetivos para se diminuir os efeitos de inibidores do método (DENIS et al., 2001). Para *L. monocytogenes*, vários genes tem sido alvo de detecção, como *iap*, *prfA*, *hly* e *ilnA*, sendo este último, responsável pela produção da listeriolisina O, constantemente observado nessa espécie, a despeito do origem ou sorotipo do isolado (HERMAN et al., 1997; ALMEIDA & ALMEIDA, 2000).

Segundo Almeida & Almeida (2000), a reação em cadeia da polimerase (PCR), é um método molecular rápido, com sensibilidade e especificidade para detecção e identificação de patógenos a partir de diferentes fontes. Entretanto, a PCR convencional pode detectar células viáveis e não viáveis, ocasionando resultados falso positivos, embora essa desvantagem possa ser resolvida com o uso de imunoseparação magnética ou de RT-PCR (CUDJOE et al., 1997; ALMEIDA & ALMEIDA, 2000).

Mas a técnica é muito eficiente na pesquisa de patógenos na matéria prima que ainda não sofreu nenhum tipo de desinfecção, como tratamento pelo calor ou radiação. Segundo Nero (2005), a microbiota pode interferir nos procedimentos laboratoriais convencionais de detecção de patógenos de alimentos, pois quando a contaminação é alta, os microrganismos competem pela sobrevivência, produzindo substâncias que podem tornar as condições do meio insatisfatórias para o cultivo e isolamento do microrganismo alvo da pesquisa.

2.3.2. *Staphylococcus* coagulase-positiva

O gênero *Staphylococcus* apresenta-se na forma de cocos Gram-positivos, isolados ou agrupados em cachos. São anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, imóveis e catalase positivos, são bactérias mesófilas, com temperatura de crescimento variando entre 7°C a 47,8°C, com produção de enterotoxina entre 10°C a 46°C (FRANCO & LADGRAF, 1996).

O gênero *Staphylococcus* está subdividido em 40 espécies, que se dividem de acordo com a síntese ou não da enzima coagulase, sendo a maioria, coagulase-negativa, com exceção do *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini* (BANNERMAN et al., 2003, KWOK & CHOW, 2003). Dentre as espécies desse gênero, *S. aureus* é considerada a mais importante em função da sua alta patogenicidade ao homem (VON EIFF et al., 2001).

Alimentos de origem animal, especialmente o leite e seus derivados, aparecem associados a surtos de toxinfecção alimentar, representando um problema de saúde pública e *S. aureus*, por ser o principal agente etiológico da

mastite bovina, transforma o leite cru em um grande veículo desses surtos (GOMES, 1994).

Na intoxicação alimentar estafilocócica, os sintomas ocorrem entre 2 e 4 horas após a ingestão da toxina pré formada no alimento e os mais comuns são vômito, náuseas, dores abdominais e diarreia (HALPIN-DOHNALEK & MARTH, 1989). Alguns indivíduos podem não apresentar todos os sintomas associados à doença e, em casos mais graves, dor de cabeça, contrações musculares e mudanças transitórias na pressão sangüínea e na pulsação podem acontecer. Os casos de óbito são raros, embora a reposição de eletrólitos possa ser necessária para compensar a perda de fluídos pela diarreia e vômito.

Porém, existem registros de morte por intoxicação estafilocócica entre idosos, crianças e pessoas severamente debilitadas (HALPIN-DOHNALEK & MARTH, 1989; ICMSF, 1996). Em 1989, em Minas Gerais, Carmo et al. (2004) documentaram um dos maiores surtos de intoxicação alimentar causado por *S. aureus*, envolvendo 4.000 pessoas, com 2.000 internações e 16 mortes, causado pelo consumo de vários alimentos (frango, rosbife, arroz e feijão).

Embora 0,1 – 1,0 µg/kg da toxina possa causar sintomas em humanos, o tempo de aparecimento e a severidade dos sintomas dependem da quantidade de toxina ingerida e da susceptibilidade do indivíduo. Devido à curta duração dos sintomas, poucos casos são reportados e somente surtos que envolvem grande número de pessoas ganham atenção das autoridades (BRYAN, 1980; ICMSF, 1996). Segundo Tranter (1996), a quantidade mínima de enterotoxina necessária para causar a doença não é conhecida, mas a ingestão de, pelo menos, 1 µg de toxina em 100g de alimento já induz o aparecimento de sintomas clínicos e este nível de toxina é alcançado quando a população de *S. aureus* excede 10^5 por grama. Segundo Balaban & Rasooly (2001), a dose mínima de enterotoxinas ingerida para a ocorrência desses sintomas é menor, de 10 ng.

As enterotoxinas estafilocócicas clássicas são exoproteínas hidrossolúveis, com peso molecular de 26 a 29 KDa, caracterizadas por uma ponte dissulfeto, próximo ao centro da molécula. Os cinco tipos sorológicos clássicos foram identificados e designados pelas letras A, B, C, D e E (BERGDOLL & ROBBINS, 1973). Apresentam grandes quantidades de lisina,

ácido aspártico, glutâmico, tirosina, dois resíduos de triptofano e cistinas, formando a cisteína, à qual, provavelmente, se atribui o sítio de toxicidade. A composição dos aminoácidos das toxinas A, D, E, B, C₁, C₂ e C₃ são semelhantes (BERGDOL, 1989). Entretanto, entre essas enterotoxinas, os tipos A, D e E compartilham uma maior seqüência de homologia (53 a 81%) enquanto B e C apresentam homologia de 50-66% (STILES & KRAKAUER, 2005). São consideradas superantígenos, que se caracterizam por ligações simultâneas ao Complexo Maior de Histocompatibilidade (CMH) de classe II na célula apresentadora de antígeno e aos receptores de células T, sem a presença de antígenos específicos. Com essa ligação, ocorrem efeitos sistêmicos como febre alta, vômito, diarreia e disfunções hepáticas e renais (FERNANDEZ et al., 2006).

A enterotoxina estafilocócica do tipo A (SEA) é a mais comumente implicada nos casos de intoxicação alimentar. O gene *entA* é composto por 771 pares de base e carregado por um bacteriófago temperado (BORST & BETLEY, 1994). A toxina é produzida na fase exponencial de crescimento e, ao contrário das enterotoxinas tipos B, C e D, não tem sua produção regulada pelo gene acessório *agr* (TREMAINE et al., 1993).

O gene *entB* regula a produção da enterotoxina do tipo B (SEB), que apresenta, aproximadamente, 900 nucleotídeos (JOHNS & KHAN, 1988). Esse gene pode estar integrado ao DNA bacteriano, no caso de amostras clínicas ou carregado por um plasmídeo de 750Kb, em amostras de outras origens (SHALITA, 1977; SHAFER & IANDOLO, 1978).

O grupo da toxina C (SEC) é formado por três subtipos antigenicamente distintos e denominados de SEC1, SEC2 e SEC3. Esses tipos apresentam estrutura protéica altamente preservada, onde o SEC3 tem homologia de 98% na seqüência de nucleotídeos, em relação a SEC1. O SEC3 difere da SEC2 e SEC1, por 4 e 9 aminoácidos, respectivamente (COUCH & BETLEY, 1989). Segundo Marr et al. (1993), a enterotoxina C é heterogênea e apresenta variações antigênicas e em sua seqüência molecular, ocorrendo ainda, as variantes SEC bovina e SEC ovina, cuja classificação é baseada em diferenças antigênicas e no animal hospedeiro da qual foi isolada.

A enterotoxina estafilocócica tipo D (SED) é o segundo tipo mais comum, associado a casos de intoxicação alimentar. O gene responsável por essa toxina é o *entD*, estando localizado no plasmídio PIB 485 (BAYLES e IANDOLO, 1989).

O gene para a enterotoxina E (SEE) é o *entE* e codifica uma proteína de 29 Kda, que apresenta grande seqüência homóloga com SEA, de 81% (VANDENBUSSCHE et al., 1993). Assim como a SEA e SEP, este gene também é carregado por um fago (BAYLES & IANDOLO, 1989).

Em 1992, Betley et al. caracterizaram a toxina G e REN et al. (1994), seqüenciaram o gene da toxina H. Su & Wong (1995) purificaram uma toxina emética com a mesma seqüência do N-terminal da toxina H, porém sem a capacidade de induzir vômito. A enterotoxina estafilocócica tipo G (SEG) é codificada pelo gene *entG*, constituída por 233 aminoácidos e apresenta similaridade com SEB (39,1%) e SEC (37,8%), embora esteja mais intimamente relacionada ao superantígeno estreptocócico A (SSA) e com a enterotoxina pirogênica A de *Streptococcus* (SPEA), apresentando 41,6 e 40,3% de similaridade, respectivamente (MUNSON et al., 1998). Mempel et al. (2003) observaram que os genes para as toxinas G, I, M, N e O pertencem ao mesmo *cluster* e a detecção de um desses genes, geralmente indica a presença dos outros quatro.

A toxina tipo H (SEH) apresenta massa molecular de 27,3 Kda e homologia de apenas 36-38%, em relação aos outros tipos (SU & WONG, 1995), embora a enterotoxina tipo I (SEI), codificada pelo gene *entI* apresente a menor homologia entre as enterotoxinas, apresentando 218 nucleotídeos e, junto com a SEG, ambas têm a capacidade de causar resposta emética e proliferação de células T, com produção de Interleucina II e Interferon gama (MUNSON et al., 1998). A enterotoxina tipo J (SEJ) é carregada pelo mesmo plasmídio que a SED e os 269 aminoácidos que constituem a SEJ apresentam similaridade de 64-66%, em relação à SEA, SEE e SED (ZHANG et al., 1998). Recentemente, SEI tem sido agrupada com SEL, SEK, SEM e SEQ, baseado nas seqüências de homologia (ORWIN et al., 2003).

Mais recentemente, várias outras toxinas têm sido descritas e seus genes seqüenciados, sendo nomeadas como enterotoxinas K, L, M, N, O, P, Q, R e U (JARRAUD et al., 2001; KURODA et al., 2001; ORWIN et al., 2001 e 2003;

LETERTRE et al., 2003; OMOE et al., 2003). Porém, até o momento, a relação entre as novas enterotoxinas e intoxicações de origem alimentar ainda não está completamente esclarecida, pois a maior incidência desses genes foi observada a partir de isolados clínicos ou cepas de coleções de cultura (OMOE et al., 2002; BECKER et al., 2003).

Essas novas enterotoxinas têm sido designadas como membro da família das enterotoxinas estafilocócicas baseadas na seqüência de similaridade com as enterotoxinas clássicas. O Comitê Internacional de Nomenclatura para Superantígenos de *Staphylococcus* (INCSSN) recomendou que somente superantígenos que induzam emese por administração oral em experiências utilizando primatas sejam chamadas de enterotoxinas, enquanto outras toxinas relacionadas, mas que não causam emese nesse modelo experimental sejam designadas como “enterotoxina estafilocócica semelhante a superantígeno” (staphylococcal enterotoxin-like (Sel) superantigens) (LINA et al., 2004). Baseando-se nas recomendações do INCSSN, as toxinas SEJ, SEK, ..., SEU deveriam ser renomeadas como SEIJ, SEIK, ..., SEIU, respectivamente (OMOE et al., 2005). Com exceção de SEIH, SEII e SEIG, que já apresentaram atividade emética (SU & WONG, 1995; MUNSON et al., 1998), o envolvimento das outras SEI em surtos de origem alimentar ainda não está totalmente esclarecido.

Existem poucos estudos sobre intoxicação estafilocócica envolvendo essas novas enterotoxinas (AKINEDEM et al., 2001; ROSEC & GIGAUD, 2002), em contraste com a extensa literatura sobre surtos causados pelas cinco enterotoxinas clássicas (AKINEDEN et al., 2001; FUEYO et al., 2001; HOLECKOVA et al., 2002, ROSEC & GIGAUD, 2002; ERCOLINI et al., 2004).

S. aureus é considerado o maior causador de mastite em bovinos, sendo comum sua presença no leite cru (MYLLYS et al., 1998; CHAFFER et al., 1999). Segundo Buyser et al (2001), entre os anos de 1988 a 1997, *S. aureus* isolado de leite e produtos lácteos foi responsável por 104 (24,9%) dos 417 surtos causados por esta bactéria na França.

No Zimbábue, Gran et al (2003) observaram que 82% de 33 amostras de leite cru apresentaram esse estafilococo. Chye et al. (2004), na Malásia, também relataram a presença de *S. aureus* em mais de 60% das amostras de leite cru analisadas. Gundogan et al. (2006) observaram valores maiores, onde

essa espécie foi encontrada em 100% das 60 amostras de leite cru analisadas na Turquia e em 56,6% das 60 amostras de leite pasteurizado

2.3.3. *Salmonella*

O gênero *Salmonella* tem a forma de bastonetes curtos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não esporulados, sendo a maioria das espécies móveis, com exceção de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*. São organismos mesófilos, com temperatura ótima de crescimento entre 35°C a 37°C, evidenciando certo crescimento entre 5°C a 47°C, embora a velocidade do mesmo seja reduzida abaixo de 10°C (DOYLE & CLIVER, 1990).

A patogenicidade das salmonelas varia de acordo com o tipo sorológico, idade e condições de saúde do hospedeiro. *Salmonella* sp tem sido comumente associada a surtos de infecção alimentar, frequentemente devido ingestão de carne, ovos, leite e derivados sem tratamento térmico. Entre 1973 e 1987, o leite e seus derivados foram responsáveis por 2,8 % dos surtos de salmonelose nos Estados Unidos (JAY, 2005). O pior surto que ocorreu nos Estados Unidos, foi em 1995, com 26 mil casos confirmados laboratorialmente, consequência do consumo de leite integral e desnatado contaminados por *Salmonella* sp (BOOR, 1997).

Dados epidemiológicos do Paraná, em 1998, revelam que 53% dos casos de enfermidades transmitidas por alimentos foram causadas por bactérias, sendo que 46,5 % dos surtos não tiveram origem determinada. *Salmonella* e *S. aureus* participaram em 57,1 % e 31,2%, respectivamente, dos casos confirmados. Os principais alimentos relacionados aos surtos incluíam em sua formulação matéria prima de origem animal e vegetal, representando 67 % dos casos, 13,8 % de carnes e derivados e 11 % de leite e derivados (Paraná, 2001).

. Na Malásia, Chye et al. (2004) observaram a presença de *Salmonella* sp em 1,4% de 360 amostras de leite cru, com o isolamento de 13 sorotipos diferentes, entre os quais, *S. Muenchen*, *S. Anatum* e *S. Agona*.

Segundo Buysen et al (2001), num levantamento realizado na França, entre os anos de 1988 a 1997, leite e produtos lácteos contaminados por *Salmonella* causou somente 34 (1,8%) dos 1889 surtos.

Souza et al. (2005), em Alfenas (MG), analisaram 30 amostras de leite tipo C e 10 de leite cru e verificaram a presença de *Salmonella* sp em 7 amostras de leite pasteurizado e nas 10 amostras do leite cru. Ainda em Minas Gerais, Arcuri et al. (2006) não relataram *Salmonella* ou *Listeria monocytogenes* em 72 amostras de leite cru de 24 rebanhos diferentes, mas *S. aureus* estiveram presentes no leite de 22 dos 24 rebanhos, em 91,7% do total de 72 amostras analisadas.

Silva et al. (2005b), em Alagoas, não observaram *Salmonella* nas 110 amostras de leite tipo C. Moraes et al (2005), analisando a qualidade do leite cru em 5 municípios do Rio Grande do Sul, não observaram a presença de *Salmonella* em nenhuma das 42 amostras analisadas.

2.4. Coliformes

Os coliformes podem ser detectados em vários tipos de alimentos, sem indicar, necessariamente, uma contaminação de origem fecal. A presença dos coliformes em leite em leite cru é frequentemente atribuída às práticas precárias de higiene durante a ordenha e em etapas subsequentes (MORENO et al., 1999).

A realização de testes para coliformes em leite tem a finalidade de avaliar as condições sanitárias de produção, determinar a presença de infecção no úbere causada por certas espécies deste grupo e ainda, avaliar a eficiência da pasteurização (OLIVEIRA & CARUZO, 1996). Por essas razões, a análise de coliformes é um indicador das condições higiênico-sanitárias da produção e beneficiamento do leite, sendo considerado indicador internacional de segurança microbiológica de alimentos (FRAZIER & WESTHOFF, 1993).

2.4.1. Coliformes totais

Refere-se a um grupo de bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos e outros animais, como também diversos gêneros ambientais. Portanto, a enumeração em água e alimentos é menos representativa como indicação de contaminação fecal do que a enumeração de coliformes termotolerantes (SILVA et al., 1997).

O grupo inclui bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, Gram-negativas, não esporogênicas, com capacidade de fermentar a lactose com produção de gás num período de 48 horas a 35°C (SIQUEIRA, 1995). Compreende principalmente os gêneros: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (SILVA et al., 1997).

2.4.2. Coliformes termotolerantes

São os coliformes oriundos do trato gastrointestinal que fermentam a lactose, produzindo gás a 45°C em 24 horas.

Neste grupo estão incluídos ao menos três gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, sendo que os dois últimos não são de origem exclusivamente fecal. A presença de *Escherichia coli* é mais representativa de contaminação fecal, devido à alta incidência desta bactéria dentro do grupo fecal. (SILVA et al., 1997).

Entre as *E. coli*, existem linhagens patogênicas, dotadas de fatores de virulência, capazes de causar manifestações clínicas e epidemiológicas em humanos e animais (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

3. OBJETIVOS

3.1. Realizar a avaliação higiênico-sanitária do leite cru, recém pasteurizado e na data de validade, através da determinação do Número Mais Provável de coliformes termotolerantes.

3.2. Pesquisar a presença de *Salmonella* e *Listeria* sp e enumeração de *Staphylococcus aureus*, a partir das mesmas amostras.

3.2. Detectar os genes responsáveis pela produção das enterotoxinas tipos A, B, C, D, E, G, H, I e J, a partir das cepas isoladas de *S. aureus*.

3.3. Comparar a metodologia clássica de identificação de *Listeria monocytogenes* com a PCR.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção das amostras para análises

Os cinco laticínios se localizavam na região de Assis, oeste do Estado de São Paulo. As amostras foram coletadas em frascos esterilizados. Após a coleta do leite, os frascos eram imediatamente colocados sob refrigeração em caixas isotérmicas até o momento das análises realizadas em até 24 horas, no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Biociências da UNESP, em Botucatu.

Em todos os laticínios, o leite era obtido por ordenha manual em baldes, pelos ordenhadores (responsáveis pela higienização dos animais e retirada do leite) e depois transferido para latões ou também obtido por ordenha mecânica, onde os animais eram ordenhados por um sistema semi-fechado, à vácuo, com direcionamento do leite imediatamente para os latões.

Em cada laticínio, 1 litro de leite *in natura* (IN) era coletado a partir do tanque resfriador, onde o leite de diferentes produtores era misturado, para posterior pasteurização. Foram coletadas também, em cada laticínio, mais duas amostras de leite pasteurizado envasado em sacos plásticos ou caixa de UHT, correspondentes ao mesmo lote do leite cru, sendo 1 litro destes para imediata análise (P) e outro para análise na data do vencimento (V).

A média da temperatura de refrigeração foi de 5°C e a média da temperatura de pasteurização clássica foi de 75- 78°C/15 segundos para leite pasteurizado envasado em sacos plásticos e de 130°C/3 segundos para o leite envasado em embalagem longa vida, com pasteurização UHT (Ultra High Temperature).

As amostras que seriam analisadas na data de validade ficaram armazenadas a 4° C, na câmara fria do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP, em Botucatu.

- Laticínio 1: processava 500 L leite/dia, com inspeção do Serviço de Inspeção Municipal (SIM), produzindo apenas leite pasteurizado ensacado. Atualmente, esse laticínio foi fechado pela Inspeção, devido condições higiênico-sanitárias altamente insatisfatórias.

- Laticínio 2: processa 3.200 L leite/dia, sendo inspecionado pelo do Serviço de Inspeção Estadual de São Paulo (SISP), produzindo leite pasteurizado e queijo tipo mozzarella, a partir de leite processado.

- Laticínio 3: processa 12.000 L leite/dia, e sofre inspeção do Serviço de Inspeção Federal (SIF), produz leite pasteurizado ensacado e queijo tipo mozzarella partir de leite pasteurizado.

- Laticínio 4: processa 600 L leite/dia, com inspeção do Serviço de Inspeção Municipal (SIM) e produz leite pasteurizado ensacado.

- Laticínio 5: processa 40.000 L leite/dia, com pasteurização tipo UHT, produzindo leite longa vida e é inspecionado pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF).

4.2. Análises Microbiológicas

4.2.1. Preparo das amostras e suas diluições

Para a análise, 25 mL da amostra homogeneizadas em 225 mL de água tamponada esterilizada e, a partir desta diluição inicial de 10^{-1} , foram preparadas várias diluições decimais, utilizando-se o mesmo diluente.

4.2.2. Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes:

De cada diluição da amostra foi inoculado 1mL, em cada série de três tubos, contendo 10mL de caldo lauril sulfato (Difco) com um tubo de Durham invertido. Os tubos foram incubados a 35°C, por 24-48 horas. Os inóculos positivos foram revelados pela observação da produção de gás no tubo de Durham. A seguir, três alçadas de cada tubo positivo foram repicadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo E.C. (Difco), para a confirmação de coliformes termotolerantes que foram incubados a 45°C, por 24 horas, em banho-maria. Após o período de incubação, foi realizada a leitura pela observação da presença de gás no tubo de Durham invertido. A seguir, utilizou-se a tabela do NMP (Número Mais Provável), e foram calculados os NMP de coliformes termotolerantes por mL de amostra analisada (KORNACKI & JOHNSON, 2001).

4.2.3. Enumeração e identificação de estafilococos coagulase positiva:

Para a enumeração dos estafilococos, foi utilizado o método da semeadura em superfície, onde 0,1mL das diversas diluições da amostra foi depositado em placas de Petri com ágar Baird-Parker (Difco), suplementado com telurito de potássio e solução de gema de ovo, espalhando-se o inóculo com o auxílio de um bastão de vidro em "L". Após a incubação a 35°C, por até 48 horas, foi realizada a contagem das placas que apresentaram entre 25 e 250 UFC. As colônias suspeitas de estafilococos coagulase positiva apresentam cor negra, com ou sem halo, sendo repicadas para tubos com ágar tripticase soja inclinado (TSA- Difco), incubados por 24 horas, a 35°C. Também foram submetidos aos testes de catalase e coagulase em tubo. Para o teste da produção de catalase, uma porção do crescimento de 24 horas do TSA foi transferida, com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, para uma lâmina de vidro. Em seguida, foi adicionada uma gota de água oxigenada 30%. Como controle positivo, foi utilizada uma cepa de *S. aureus* e como controle negativo, uma de *Streptococcus* sp. O teste positivo é revelado pela liberação de bolhas (Mac FADDIN, 1976). A seguir, foi realizado o teste da coagulase em tubo (Mac FADDIN, 1976), utilizando-se 0,25 ml de plasma de coelho, adicionado um volume de 0,5 ml de uma cultura da cepa teste em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI - Difco), crescida 24 horas a 35°C. O tubo foi incubado a 35°C, com leituras em 3, 6 e 24 horas. O teste é considerado positivo quando ocorrer a coagulação da mistura.

Para identificação de *S. aureus*, as cepas positivas nas duas provas anteriores foram submetidas ao kit "Staphytest Test Dry Spot" (Oxoid), onde partículas azuis de látex são recobertas com fibrinogênio humano e imunoglobulinas tipo G contra a proteína A de *S. aureus*, o Fator Clumping e a cápsula de *S. aureus* metilicina-resistente. A seguir foi realizado um teste de Voges Proskauer (VP) para a separação de *S. aureus* (VP +) e *S. intermedius* (VP -). Para o cálculo de número de UFC/g, o número de colônias confirmadas foi multiplicado por 10 e pelo fator inverso de diluição da placa de contagem (LANCETTE & BENNETT, 2001).

4.2.4. Detecção da presença *Salmonella*:

Para a detecção da presença de *Salmonella*, 25 mL de amostra foram homogeneizados em 225 mL de água tamponada peptonada a 1 % (Difco) e incubado a 35°C por 24 horas. Em seguida, foi transferido 1 mL do homogeneizado para um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo tetracionato com iodeto de potássio. O tubo foi incubado a 35°C por 24 horas. Outra alíquota de 0,1 mL foi transferida para um tubo com 10 mL de caldo Rapaport, sendo incubado a 42°C por 24 horas. Após este período, uma alçada de cada tubo foi semeada em placas de Petri contendo ágar XLD (xilose-lisina-desoxicolato - Difco) e ágar CHROMagar (Biolife), sendo as placas incubadas invertidas a 35°C por 24 horas. A seguir, as colônias características de *Salmonella* foram isoladas e repicadas para tubos de ensaio contendo ágar TSA (Difco), sendo incubados a 35°C por 24 horas (Cepas Estoque). A partir das cepas estoque foram realizados os testes bioquímicos com ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI- Difco) e Agar Fenilalanina (Difco) como testes de triagem.

Após a leitura positiva desses, as cepas suspeitas foram submetidas ao API 20 E (Biomérieux) e, a seguir, foram testadas frente aos soros polivalente somático e flagelar (ANDREWS et al., 2001).

4.2.5. Detecção da presença de *Listeria*:

Na detecção de *Listeria*, 25 ml foram homogeneizados com 225 ml de caldo LEB (*Listeria* Enrichment Broth - Oxoid) e pré incubado a 30°C por 4 horas. A seguir, foram acrescentados os agentes seletivos (40 mg/L de ácido nalidíxico, 50 mg/L de cicloheximide e 15 mg/L de acriflavina) com reincubação sob mesma temperatura, por 48 horas. Em 24 e 48 horas, alíquotas foram semeadas, com o auxílio de um alça de níquel cromo, em ágar Palcam (Oxoid), incubado a 35°C por até 48 horas. Após esse período, até 5 colônias características (pretas com halos pretos, devido a quebra da esculina) foram transferidas para um tubo com ágar TSAE (TSA acrescido de 0,6% de extrato de levedura), incubado a 35°C/24 horas. A partir desse estoque foram realizadas provas preliminares de identificação, como coloração de Gram (são bastonetes Gram positivos), prova da catalase (reação positiva) e semeadura em ágar motilidade para observação do crescimento “em forma de guarda-

chuva”. A seguir, as colônias suspeitas foram identificadas com o auxílio do API *Listeria* (Biomeriéux) (RYSER & DONNELLY, 2001)

Para a detecção por PCR, foi utilizada uma alíquota de 1 mL do caldo LEB, após as 48 horas de incubação.

4.3. PCR de *S. aureus* e *Listeria*

4.3.1. Extração e Purificação de DNA:

Sendo *S. aureus* e *Listeria* bactérias Gram positivas, foi utilizado o mesmo kit de extração de DNA, recomendado para sangue e bactérias Gram positivas, em geral.

Para extração e purificação do DNA, as cepas isoladas de *S. aureus* foram cultivadas em caldo BHI, a 35°C/24 h e 1 mL de cada crescimento foi transferido para tubos de microcentrifuga de 1,5 mL (Axygen) e submetidos a extração e purificação do DNA empregando-se o kit comercial “GFX” (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. Em relação a *Listeria*, foi usado 1 mL do caldo de enriquecimento, LEB.

Para tal, o tubo foi centrifugado em rotação máxima (13.000 rpm) por 30 segundos (Eppendorf 5415R), o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 40µl de tampão de lisozima (USB) e imediatamente homogeneizado com o auxílio de um vortex, para ressuspensão das células bacterianas. Em seguida, foram adicionados 10 µL lisozima, o tubo foi homogeneizado e mantido em temperatura ambiente por 15 minutos, com homogeneização ocasional. Após, foram adicionados 10µL de proteinase K (USB), homogeneizado e incubado a 55°C/ 15 minutos, homogeneizando ocasionalmente. Após o período de incubação, foram adicionados 500µL de solução de extração, homogeneizado e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos.

A mistura foi transferida para uma coluna GFX e centrifugada a 8.000 rpm durante 1 minuto. O volume filtrado foi descartado e novamente foram adicionados 500µL de solução de extração na coluna que foi centrifugada a

8.000 rpm por 1 minuto, descartando-se o volume filtrado. Em seguida, foram adicionados 500 μ L de solução de lavagem e centrifugado a 12.000 rpm por 3 minutos, com descarte do filtrado. A coluna foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL (Axygen), com adição de 500 μ L de solução de eluição (água Milli Q autoclavada e previamente aquecida a 56°C em banho-maria), incubado à temperatura ambiente por 1 minutos e centrifugado a 8.000 rpm durante 1 minuto. A amostra foi congelada a - 20°C até o momento do uso para a reação em cadeia pela polimerase (PCR) (JOHNSON et al., 1991).

4.3.2. Amplificação do ácido nucléico (PCR):

Para as reações de PCR foram utilizados tubos de microcentrífuga de 0,5 mL (Axygen) num volume total de 25 μ L, composto por 2,5 μ L de PCR Buffer 10x (Invitrogen), 2,0 μ M de Cloreto de Magnésio (Invitrogen), 200 μ M de cada dNTP (Invitrogen), 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 10 picomoles de cada *primer* (Tabela 1), água ultrapura autoclavada (qsp) (Milli-Q Plus, Millipore) e 3 μ L da amostra de DNA.

Para *S. aureus*, a incubação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) empregando-se os parâmetros de um ciclo inicial a 94°C durante 5 minutos para desnaturação inicial, 94°C durante 2 minutos para desnaturação e 72°C durante 1 minuto para extensão. Em relação à temperatura de anelamento dos “primers”, para as toxinas A, B, C, D, E, I e J, foi utilizada a temperatura inicial de 50°C, com redução de 1°C por ciclo, nos 4 ciclos seguintes. No sexto ciclo, a temperatura de anelamento se encontrava a 45°C, sendo mantida para os próximos 25 ciclos. Ao final dos 30 ciclos a temperatura de extensão final foi de 72°C por 5 minutos. Para a toxina G e H, todos os parâmetros foram os mesmos, com exceção das temperaturas de anelamento, que foram de 55°C e 46,4°C, respectivamente, conforme Tabela 1. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água ultrapura. Os controles positivos usados foram *S. aureus* ATCC 13565 (SEA), ATCC 14458 (SEB), ATCC 19095

(SEC), FRI 361 (SED, SEG, SEI e SEJ), ATCC 27664 (SEE) e FRI 137 (SEH) e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

Para a detecção do gene *inlA*, a incubação foi realizada no mesmo modelo de termociclador, com ciclo inicial a 94°C durante 5 minutos para desnaturação inicial, 94°C durante 2 minutos para desnaturação, 57°C/1 minuto para o anelamento dos primers e 72°C durante 1 minuto para extensão. Ao final dos 30 ciclos a temperatura de extensão final foi de 72°C por 10 minutos (JOHNSON et al., 1991).

4.3.3. Visualização dos produtos amplificados

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese (Electrophoresis Power Supply Model EPD 600 – Amersham-Pharmacia Biotech Inc.) em gel de agarose 1,5% (Sigma Aldrich) em tampão de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) e revelados com brometo de etídio (0,5 mg/ml - Invitrogen). Os fragmentos de DNA foram analisados comparativamente com marcadores de DNA de 50 bp (50 Base Pair Ladder – Amersham – Pharmacia Biotech Inc.), sendo analisados e fotografados em analisador de imagens (Alphaimager – Alpha Esasy FC Software – AlphaInotech Corporation).

TABELA 01: Oligonucleotídeos e seus propriedades utilizados na detecção de *Listeria monocytogenes* e de *Staphylococcus aureus*, produtores de toxinas A, B, C, D, E, G, H e I, J.

Gene	Primer	Seqüência	Tamanho produto (bp)	Temperatura de anelamento	Referências
<i>Sea</i>	SEA-1	ttgaaacggtaaaacgaa	120	50°C	JOHNSON et al. (1991)
	SEA-2	gaacctcccatcaaaaaca			
<i>Seb</i>	SEB-1	tcgcatcaaactgacaaacg	478	50°C	JOHNSON et al. (1991)
	SEB-2	gcaggactctataagtcc			
<i>Sec</i>	SEC-1	gacataaaagctaggaattt	257	50°C	JOHNSON et al. (1991)
	SEC-2	aaatcggattaacattatcc			
<i>Sed</i>	SED-1	ctagtttggaatatctcct	317	50°C	JOHNSON et al. (1991)
	SED-2	taatgctatatcttataggg			
<i>See</i>	SEE-1	aggtttttcacaggatcc	209	50°C	MEHROTRA et al. (2000)
	SEE-2	cttttttctcggatcaatc			
<i>Seg</i>	SEG-1	aagtagacattttggcgtcc	287	55°C	OMOE et al. (2002)
	SEG-2	agaaccatcaaactcgtatagc			
<i>She</i>	SHE-1	gtctatatggaggtaaacact	213	46,4°C	OMOE et al. (2002)
	SHE-2	gaccttactatctcgtctgc			
<i>Sei</i>	SIE-1	ggtgatattggttaggtaac	454	50°C	OMOE et al. (2002)
	SIE-2	atccatattcttgccttaccag			
<i>Sej</i>	SEJ-1	catcagaactgtgtccgctag	142	50°C	NASHEV et al. (2004)
	SEJ-2	ctgaattttaccatcaaaggtagc			
<i>inIA</i>	inIA- 1	aatctagcaccactgtcggg	733	57°C	ROSSEAU et al. (2004)
	inIA- 2	tgtgaccttctttacgggc			

4.4. Análise estatística

Os dados relativos ao número de coliformes termotolerantes presentes nas amostras analisadas foram submetidos ao teste de Friedman para comparação entre três grupos de amostras dependentes. O teste utilizado para comparação entre os tratamentos foi o Student Newman Keuls. O software empregado foi o Sigma Stat (Jandel Corporation) e o nível de significância adotado foi de 5%.

O número de amostras positivas para detecção de *Listeria monocytogenes* pela metodologia clássica, em comparação com a PCR foi submetida ao Teste Exato de Fisher.

5. RESULTADOS

Foram coletadas 54 amostras de leite *in natura*, 54 amostras de leite após pasteurização e o mesmo número de amostras, para serem analisado na data de validade, em cinco laticínios da região oeste do estado de São Paulo, de março a novembro de 2006.

A Tabela 2 apresenta os resultados das análises microbiológicas, do Laticínio 1, do leite *in natura* (IN) ou cru, recém pasteurizado (P) e do leite na data de validade (V), quanto à determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes (CT), pesquisa da presença de *Listeria monocytogenes* e de *Salmonella* sp e enumeração de *Staphylococcus aureus*.

Foram analisadas 12 amostras de leite *in natura*, com a presença de CT em todas elas, em concentrações variando de $1,5 \times 10^3$ NMP/ml a $1,1 \times 10^6$ NMP/ml, com redução significativa ($p < 0,001$) dessa microbiota, após a pasteurização. Entretanto, das 12 amostras, somente em 4 (33,3%), não houve a detecção desses indicadores após a pasteurização e nas oito amostras restantes (66,7%), a concentração observada estava acima do limite permitido, segundo a RDC N°12 (2001). Nas 12 amostras analisadas na data de validade, a presença de coliformes termotolerantes foi observada nas mesmas oito amostras pasteurizadas, com aumento não significativo ($p > 0,001$) da concentração em seis delas.

Observa-se que *Salmonella* não foi encontrada em nenhuma das 36 amostras analisadas. Entretanto foram isoladas cinco cepas de *Listeria* sp, pela metodologia clássica, em quatro amostras de leite cru (33,3%), sendo 1 *L. monocytogenes* (20%), 2 *L. innocua* (40%) e 2 *L. ivanovii* (40%). Pela PCR, três (25%) amostras do leite cru foram positivas para *L. monocytogenes*, sendo que esse microrganismo só foi observado em uma amostra (8,3%), pela metodologia clássica. Das 3 amostras de *L. monocytogenes* encontradas no leite cru pela PCR, somente em uma de leite recém pasteurizado, esse microrganismo foi novamente detectado, sendo também observado na amostra na data de validade. Todas as cepas de *Listeria* sp observadas no leite cru, continuaram a ser isoladas nas amostras da data de validade. *S. aureus* foi observado em 7 (58,3%) das 12 amostras de leite cru analisadas, em concentrações de até $7,9 \times 10^4$ UFC/ml. Após a pasteurização, esse

microrganismo não foi observado, sendo detectado, em uma amostra da data de validade (8,3%) na concentração de 4×10^2 UFC/ml.

TABELA 2. Resultados das análises microbiológicas, no Laticínio 1, do leite *in natura*, pasteurizado e na data de validade, 2006

Coleta	Etapa	CT (NMP/ml)	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>		<i>S. aureus</i> (UFC/ml)
				clássico	PCR	
1	IN	$4,6 \times 10^3$	-	-	-	$7,9 \times 10^4$
	P	93	-	-	-	< 100
	V	15	-	-	-	$4,0 \times 10^2$
2	IN	$4,3 \times 10^4$	-	<i>L.monocytogenes</i> <i>L. innocua</i>	+	$6,1 \times 10^3$
	P	91	-	<i>L.monocytogenes</i>	+	< 100
	V	93	-	<i>L.monocytogenes</i> <i>L. innocua</i>	+	< 100
3	IN	$4,6 \times 10^3$	-	-	-	< 100
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	< 3	-	-	-	< 100
4	IN	$2,4 \times 10^5$	-	<i>L. ivanovii</i>	+	$3,8 \times 10^3$
	P	36	-	-	-	< 100
	V	75	-	<i>L. ivanovii</i>	-	< 100
5	IN	$1,1 \times 10^6$	-	-	-	$4,2 \times 10^4$
	P	35	-	-	-	< 100
	V	46	-	-	-	< 100
6	IN	$2,8 \times 10^3$	-	<i>L. innocua</i>	+	< 100
	P	< 3	-	<i>L. innocua</i>	-	< 100
	V	< 3	-	<i>L. innocua</i>	-	< 100
7	IN	$1,5 \times 10^4$	-	-	-	< 100
	P	91	-	-	-	< 100
	V	46	-	-	-	< 100
8	IN	$1,1 \times 10^4$	-	-	-	$2,0 \times 10^2$
	P	23	-	-	-	< 100
	V	28	-	-	-	< 100
9	IN	$1,5 \times 10^3$	-	<i>L. ivanovii</i>	-	< 100
	P	23	-	-	-	< 100
	V	35	-	<i>L. ivanovii</i>	-	< 100
10	IN	$4,6 \times 10^3$	-	-	-	< 100
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	< 3	-	-	-	< 100
11	IN	$1,5 \times 10^4$	-	-	-	$7,0 \times 10^2$
	P	73	-	-	-	< 100
	V	93	-	-	-	< 100
12	IN	$4,6 \times 10^4$	-	-	-	$4,0 \times 10^2$
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	< 3	-	-	-	< 100

IN: *in natura*, P: pasteurizado; V: data de validade; CT: coliformes termotolerantes; PCR: reação em cadeia da polimerase; UFC: Unidades Formadoras de Colônias; NMP: Número Mais Provável

Pela Tabela 3, observa-se que, no Laticínio 2, as 12 amostras de leite cru apresentaram CT, cuja concentração variou de $2,1 \times 10^2$ NMP/ml a $4,6 \times 10^4$ UFC/ml. O tratamento térmico foi significativo ($p < 0,001$), com redução para somente duas amostras (16,7%) com concentrações de CT acima do permitido pela legislação. Na data de validade, outras 5 amostras, totalizando 7 (58,3%) estavam fora dos padrões.

A presença de *Salmonella* sp não foi detectada nas 36 amostras analisadas. Em relação à *Listeria*, através da metodologia clássica, três amostras (25%) foram positivas para *Listeria* sp, dentre as 12 de leite cru, sendo 2 *L. monocytogenes* (75%) e 1 *L. grayi* (25%). Pela PCR, as mesmas amostras positivas na metodologia clássica, foram positivas para *L. monocytogenes*. *L. grayi* não foi mais detectada após a pasteurização e observou-se uma cepa de *L. innocua* numa amostra na data de validade, onde havia sido isolada *Listeria monocytogenes* no leite cru.

S. aureus foi encontrado em 9 (75%) das 12 amostras analisadas, em concentrações de até $8,7 \times 10^5$ UFC/ml no leite cru, sendo encontrado em somente uma amostra (8,3%) após a pasteurização e em duas (16,7%), na data de validade em concentrações de até $3,2 \times 10^3$ UFC/ml.

TABELA 3. Resultados das análises microbiológicas, no Laticínio 2, do leite *in natura*, pasteurizado e na data de validade, 2006

Coleta	Etapa	CT (NMP/ml)	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>		<i>S. aureus</i> (UFC/ml)
				clássico	PCR	
1	IN	$9,1 \times 10^2$	-	-	-	< 100
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	< 3	-	-	-	< 100
2	IN	$9,1 \times 10^3$	-	-	-	$4,5 \times 10^3$
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	9	-	-	-	< 100
3	IN	$7,5 \times 10^3$	-	-	-	< 100
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	36	-	-	-	< 100
4	IN	$2,1 \times 10^2$	-	-	-	$4,6 \times 10^4$
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	21	-	-	-	< 100
5	IN	$1,1 \times 10^4$	-	<i>L.monocytogenes</i>	+	$7,5 \times 10^3$
	P	< 3	-	-	+	< 100
	V	< 3	-	<i>L.monocytogenes</i>	+	< 100
6	IN	$2,4 \times 10^4$	-	-	-	$1,0 \times 10^2$
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	< 3	-	-	-	< 100
7	IN	$1,1 \times 10^3$	-	<i>L.monocytogenes</i>	+	$6,4 \times 10^4$
	P	23	-	-	+	< 100
	V	15	-	<i>L. innocua</i>	+	$2,0 \times 10^2$
8	IN	$4,6 \times 10^3$	-	-	-	$8,7 \times 10^5$
	P	23	-	-	-	$2,0 \times 10^2$
	V	75	-	-	-	$3,2 \times 10^3$
9	IN	$1,5 \times 10^3$	-	-	-	< 100
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	< 3	-	-	-	< 100
10	IN	$1,5 \times 10^3$	-	<i>L. grayi</i>	-	$6,1 \times 10^3$
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	< 3	-	-	-	< 100
11	IN	$4,6 \times 10^4$	-	-	-	$7,0 \times 10^2$
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	43	-	-	-	< 100
12	IN	$9,3 \times 10^3$	-	-	-	$3,0 \times 10^3$
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	43	-	-	-	< 100

IN: *in natura*, P: pasteurizado; V: data de validade; CT: coliformes termotolerantes; PCR: reação em cadeia da polimerase; UFC: Unidades Formadoras de Colônias; NMP: Número Mais Provável

A Tabela 4 apresenta os resultados nas análises do Laticínio 3, onde os coliformes termotolerantes também estavam presentes nas 12 amostras de leite *in natura*, em concentrações que variaram de $1,1 \times 10^3$ NMP/ml a $1,1 \times 10^5$ NMP/ml. No leite pasteurizado, essa concentração diminuiu significativamente ($p < 0,001$), sendo que das 12 amostras analisadas, apenas 2 (16,7%) encontravam-se em desacordo com a Legislação vigente e, na data de validade, o número de amostras fora dos padrões aumentou para 9 (75%), sendo que essa diferença de concentração bacteriana entre o leite pasteurizado e o leite na data de validade, foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$)

Utilizando metodologia clássica para a detecção de *Listeria* sp, nas 12 amostras de leite cru, 3 foram positivas (25%), observando-se a presença isolada de *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. ivanovii*, em cada uma delas. Na PCR, foram detectadas 2 amostras positivas para *L. monocytogenes*, sendo que em uma das amostras, pela metodologia clássica, foi detectada somente a presença de *L. innocua*. No leite pasteurizado, a metodologia clássica detectou *L. monocytogenes* na amostra que anteriormente havia sido observada *L. innocua*.

No leite analisado na data de validade, pela metodologia clássica, foram encontradas 2 cepas de *Listeria* sp, uma *L. monocytogenes* e uma *L. ivanovii*. Nessa etapa, houve diferença significativa ($p > 0,01$) entre a qualidade do leite recém pasteurizado e na data de validade, em relação ao número de coliformes termotolerantes.

A presença de *Salmonella* não foi detectada nas 36 amostras analisadas. *S. aureus* foi observado em 7 (58,3%) das 12 amostras de leite cru analisadas, em concentrações de até $9,8 \times 10^3$ UFC/ml. Após a pasteurização, esse microrganismo não foi observado, sendo detectado, em uma amostra da data de validade (8,3%) na concentração de 3×10^2 UFC/ml.

TABELA 4. Resultados das análises microbiológicas, do Laticínio 3, do leite *in natura*, pasteurizado e na data de validade.

Coleta	Etapa	CT (NMP/ml)	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>		<i>S. aureus</i> (UFC/ml)
				clássico	PCR	
1	IN	$1,1 \times 10^4$	-	-	-	$3,0 \times 10^3$
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	< 3	-	-	-	< 100
2	IN	$4,6 \times 10^3$	-	<i>L.. monocytogenes</i>	+	$4,2 \times 10^3$
	P	< 3	-	-	+	< 100
	V	< 3	-	-	+	< 100
3	IN	$2,1 \times 10^3$	-	-	-	< 100
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	< 3	-	-	-	< 100
4	IN	$3,6 \times 10^3$	-	-	-	< 100
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	43	-	-	-	< 100
5	IN	$1,1 \times 10^5$	-	-	-	$3,4 \times 10^3$
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	15	-	-	-	< 100
6	IN	$1,1 \times 10^5$	-	-	-	$2,2 \times 10^2$
	P	91	-	-	-	< 100
	V	93	-	-	-	< 100
7	IN	$2,5 \times 10^5$	-	<i>L.. innocua</i>	+	$8,7 \times 10^3$
	P	91	-	<i>L. monocytogenes</i>	+	< 100
	V	43	-	<i>L. monocytogenes</i>	+	$3,0 \times 10^2$
8	IN	$2,1 \times 10^3$	-	-	-	< 100
	P	<3	-	-	-	< 100
	V	43	-	-	-	< 100
9	IN	$2,1 \times 10^4$	-	<i>L. ivanovii</i>	-	$1,5 \times 10^3$
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	36	-	<i>L. ivanovii</i>	-	< 100
10	IN	$1,1 \times 10^5$	-	-	-	$9,8 \times 10^3$
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	15	-	-	-	< 100
11	IN	$1,1 \times 10^3$	-	-	-	< 100
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	91	-	-	-	< 100
12	IN	$2,1 \times 10^3$	-	-	-	< 100
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	93	-	-	-	< 100

IN: *in natura*, P: pasteurizado; V: data de validade; CT: coliformes termotolerantes; PCR: reação em cadeia da polimerase; UFC: Unidades Formadoras de Colônias; NMP: Número Mais Provável

A Tabela 5 apresenta os resultados das análises do Laticínio 4. Nas 12 amostras de leite cru, a concentração dos coliformes termotolerantes variou de $1,1 \times 10^3$ NMP/ml a $9,3 \times 10^4$ NMP/ml. Após a pasteurização, 6 (50%) amostras estavam em desacordo com a legislação e, no leite analisado na data de validade, esse número subiu para 8 (66,7%).

Quanto à presença de *Listeria* sp, pela metodologia clássica, 4 amostras no leite *in natura* (33,3%) foram positivas para a presença desse microrganismo, sendo isoladas 3 *L. monocytogenes* e 2 *L. innocua* e, em uma dessas amostras, houve o isolamento simultâneo das duas espécies. Pela PCR foram detectadas 5 (41,7%) amostras positivas para *L. monocytogenes*.

Após tratamento térmico ($p < 0,001$), pela metodologia clássica, foi detectada a presença de uma amostra contaminada por *L. monocytogenes* e outra, por *L. innocua*. A técnica de PCR continuou detectando *L. monocytogenes* nas amostras pasteurizadas, correspondentes às de leite cru. No leite analisado na data de vencimento, pela metodologia clássica, observou-se a presença de uma amostra positiva para *L. monocytogenes* e uma para *L. innocua*. Detectou-se a presença de *L. monocytogenes* por PCR, nas mesmas amostras anteriormente positivas. A presença de *Salmonella* sp não foi detectada entre as amostras analisadas.

S. aureus foi encontrado em 11 (91,7 %) das 12 amostras, em concentrações que variaram entre $1,4 \times 10^3$ UFC/ml a $8,9 \times 10^5$ UFC/ml. Esse microrganismo também foi encontrado no leite pós processamento térmico em 7 (58,3 %) das amostras e, na data de vencimento, esse número continuou o mesmo.

TABELA 5. Resultados das análises microbiológicas, no Laticínio 4, do leite *in natura*, pasteurizado e na data de validade, 2006

Coleta	Etapa	CT (NMP/ml)	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>		<i>S. aureus</i> (UFC/ml)
				clássico	PCR	
1	IN	$2,3 \times 10^3$	-	-	-	$5,1 \times 10^5$
	P	28	-	-	-	$3,0 \times 10^2$
	V	15	-	-	-	$8,7 \times 10^3$
2	IN	$9,3 \times 10^3$	-	-	+	$7,2 \times 10^4$
	P	23	-	-	+	$1,0 \times 10^2$
	V	95	-	-	+	$2,9 \times 10^3$
3	IN	$9,3 \times 10^3$	-	-	-	$3,6 \times 10^4$
	P	< 3	-	-	-	$2,0 \times 10^2$
	V	< 3	-	-	-	$3,0 \times 10^2$
4	IN	$4,6 \times 10^3$	-	-	-	$9,7 \times 10^3$
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	$4,6 \times 10^2$	-	-	-	< 100
5	IN	$2,1 \times 10^3$	-	<i>L. monocytogenes</i>	+	$8,4 \times 10^4$
	P	$1,5 \times 10^2$	-	-	+	$3,0 \times 10^2$
	V	$2,9 \times 10^2$	-	<i>L. monocytogenes</i>	+	$5,0 \times 10^2$
6	IN	$1,1 \times 10^3$	-	-	-	$1,4 \times 10^3$
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	< 3	-	-	-	< 100
7	IN	$1,1 \times 10^3$	-	<i>L. monocytogenes</i>	+	< 100
	P	< 3	-	<i>L. monocytogenes</i>	+	< 100
	V	< 3	-	-	+	< 100
8	IN	$4,3 \times 10^4$	-	<i>L. monocytogenes</i> <i>L. innocua</i>	+	$2,7 \times 10^4$
	P	91	-	-	+	$1,0 \times 10^2$
	V	23	-	-	+	$4,0 \times 10^2$
9	IN	$4,6 \times 10^4$	-	<i>L. innocua</i>	+	$8,9 \times 10^5$
	P	35	-	<i>L. innocua</i>	+	$3,0 \times 10^2$
	V	75	-	<i>L. innocua</i>	+	$5,6 \times 10^3$
10	IN	$7,5 \times 10^3$	-	-	-	$3,7 \times 10^4$
	P	35	-	-	-	$1,0 \times 10^2$
	V	$4,6 \times 10^2$	-	-	-	$4,0 \times 10^2$
11	IN	$4,6 \times 10^3$	-	-	-	$8,4 \times 10^3$
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	< 3	-	-	-	< 100
12	IN	$9,3 \times 10^4$	-	-	-	$7,9 \times 10^3$
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	23	-	-	-	< 100

IN: *in natura*, P: pasteurizado; V: data de validade; CT: coliformes termotolerantes; PCR: reação em cadeia da polimerase; UFC: Unidades Formadoras de Colônias; NMP: Número Mais Provável

Na Tabela 6 estão os resultados obtidos pelas análises do leite do Laticínio 5, num total de 18 amostras. Nas 6 amostras de leite cru, a concentração de CT variou de $1,1 \times 10^4$ UFC/ml a $1,1 \times 10^5$ NMP/ml. Nas amostras do leite pasteurizado houve significativa diminuição dos CT ($p < 0,001$), não sendo detectada a presença destes microrganismos, que também estavam ausentes na data de validade das amostras.

Na pesquisa de *Listeria*, a metodologia clássica realizada com o leite cru detectou a presença de 2 (16,7%) amostras positivas para *Listeria* sp, sendo uma contaminada com *L. innocua* e a outra, com *L. ivanovii*. Após a pasteurização não foi observado nenhuma amostra positiva para *Listeria* sp, por ambas as metodologias.

TABELA 6. Resultados das análises microbiológicas, no Laticínio 5, do leite *in natura*, pasteurizado e na data de validade, 2006

Coleta*	Etapa	CT (NMP/ml)	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>		<i>S. aureus</i> (UFC/ml)
				clássico	PCR	
1	IN	$1,1 \times 10^4$	-	-	-	< 100
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	< 3	-	-	-	< 100
2	IN	$9,3 \times 10^4$	-	-	-	$9,3 \times 10^4$
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	< 3	-	-	-	< 100
3	IN	$2,3 \times 10^4$	-	<i>L. innocua</i>	-	< 100
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	< 3	-	-	-	< 100
4	IN	$1,1 \times 10^5$	-	-	-	$1,9 \times 10^3$
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	< 3	-	-	-	< 100
5	IN	$2,1 \times 10^4$	-	<i>L. ivanovii</i>	-	$3,7 \times 10^3$
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	< 3	-	-	-	< 100
6	IN	$3,6 \times 10^4$	-	-	-	9×10^2
	P	< 3	-	-	-	< 100
	V	< 3	-	-	-	< 100

IN: *in natura*, P: pasteurizado; V: data de validade; CT: coliformes termotolerantes; PCR: reação em cadeia da polimerase; UFC: Unidades Formadoras de Colônias; NMP: Número Mais Provável

* Neste laticínio, só foram realizadas 6 coletas, devido a problemas gerenciais.

Considerando-se as 54 amostras de leite cru dos cinco laticínios visitados, todas estavam contaminadas por coliformes termotolerantes, em concentrações que variaram de $2,1 \times 10^2$ NMP/ml a $1,1 \times 10^6$ NMP/ml de leite. *S. aureus* foi observado em 38 (70,4%) dessas amostras, em concentrações de até $8,9 \times 10^5$ UFC/ml. Em relação à presença de *Listeria* sp, pela metodologia tradicional, foram detectadas 16 amostras positivas (29,6%), sendo 7 de *L. monocytogenes* (13% do total de amostras), 6 de *L. innocua* (11,1%), 4 de *L. ivanovii* (7,4%), e 1 de *L. grayi* (1,9%). Pela técnica de PCR, *L. monocytogenes* foi observada em 12 amostras (22,2%), conforme Figura 1. Essa técnica revelou-se mais sensível que a tradicional ($p < 0,001$).

O tratamento térmico foi estatisticamente eficiente na redução da concentração de coliformes termotolerantes ($p < 0,001$). Dentre as 54 amostras de leite pasteurizado, 18 amostras (33,3%) (pertencentes somente aos laticínios que realizavam o envase do leite em sacos plásticos) estavam fora dos padrões estabelecidos pela RDC N°12, em relação ao número de coliformes termotolerantes, alcançando concentrações de até $1,5 \times 10^2$ NMP/ml.

Foi observada positividade em 5 amostras (9,3%) em relação à presença de *Listeria* sp, sendo 3 de *L. monocytogenes* (5,6%) e 2 de *L. innocua* (3,7%). Porcentagem maior foi obtida, na positividade de *L. monocytogenes*, com a utilização da PCR, de 18,5% (10 amostras positivas). *S. aureus* foi observado em 8 (14,7%) das 54 amostras, em concentração de até $8,7 \times 10^3$ UFC/ml, conforme Tabela 5.

Nas 54 análises de leite na data de validade, houve um aumento de 18 (33,3%) para 32 (59%) amostras em desacordo com os padrões, atingindo concentração de até $2,1 \times 10^2$ NMP/ml de coliformes termotolerantes, entretanto somente no Laticínio 3 houve diferença estatisticamente significativa, em relação ao aumento do número de coliformes termotolerantes ($p > 0,01$). *Listeria* sp foi detectada em 10 amostras (18,5%), sendo de 4 de *L. monocytogenes* e de *L. innocua* (7,4%) e três de *L. ivanovii* (5,6%). Pela PCR, 10 amostras (18,5%) foram positivas para *L. monocytogenes*. *S. aureus* foi isolado a partir de 11 amostras (20,4%) do leite na data do vencimento, com concentração máxima de $8,7 \times 10^3$ UFC/ml.

Salmonella não foi isolada em nenhuma das 162 amostras analisadas

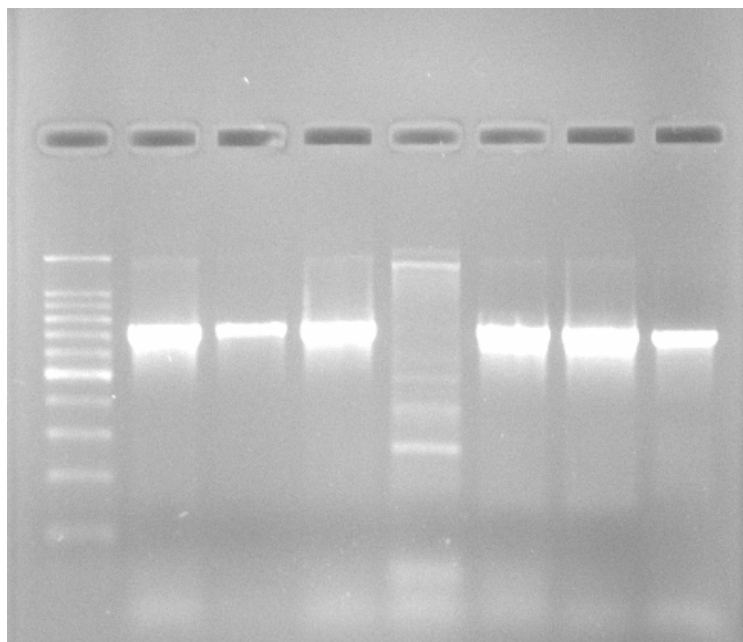


FIGURA 1: Gel de eletroforese do produto da PCR do gene *inIA*, usando *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (722pb)

Quanto às toxinas de *S. aureus*, foram pesquisados os genes responsáveis pela produção das clássicas (A, B, C, D e E) e das descobertas mais recentemente (G, H, I e J).

Os primers utilizados nesse trabalho, na análise pela PCR geraram os produtos observados na Figura 2 (JOHNSON et al., 1991; MEHROTRA et al., 2000; OMOE et al., 2002; NASHEV et al., 2004)

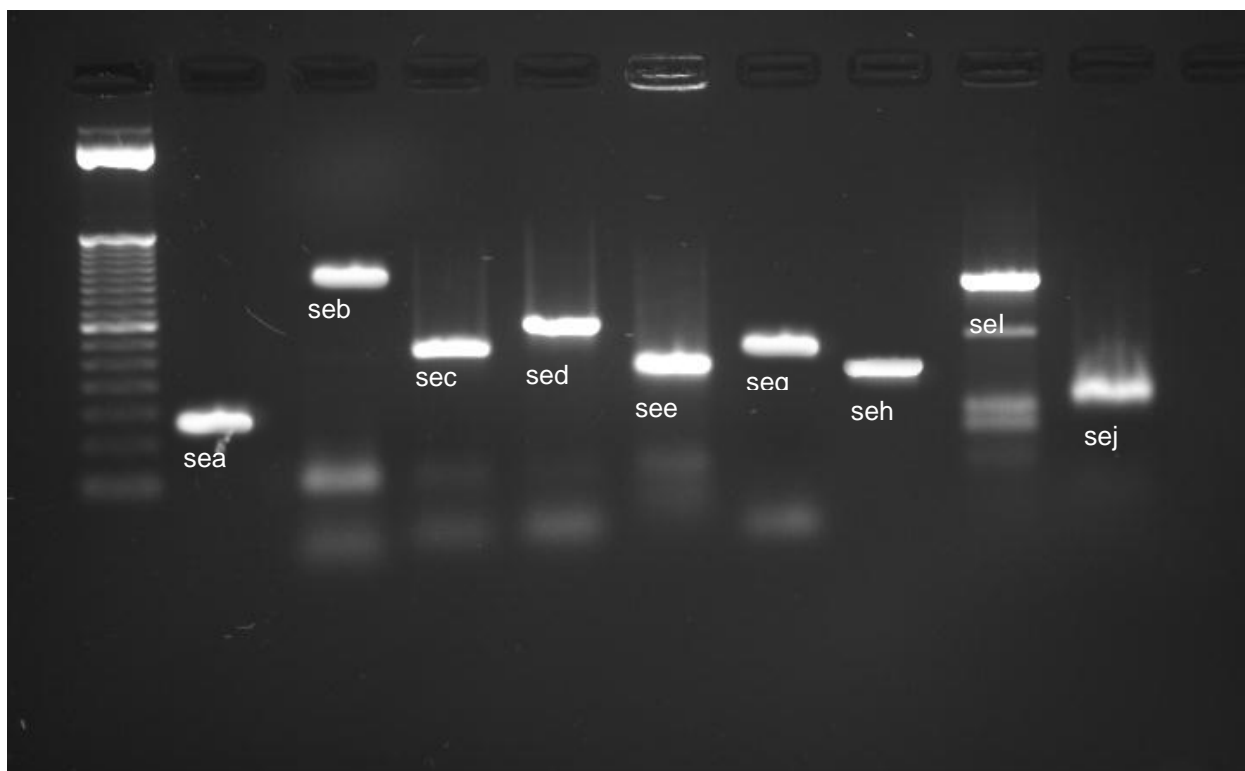


FIGURA 2. Gel de eletroforese do produto da PCR das toxinas A, B, C, D, E, G, H, I e J de *Staphylococcus aureus*. ATCC 13565 (*sea* - 120 pb), ATCC 14458 (*seb* - 478 pb), ATCC 19095 (*sec* - 257 pb), FRI 361 (*sed* - 317 pb; *seg* - 287 pb; *sei* - 454 pb e *sej* - 142 pb), *see* (ATCC 27664 - 209 pb) e FRI 137 (*seh* - 213 pb).

A Tabela 7 apresenta os resultados dos testes da presença dos genes que codificam para as toxinas tipos A, B, C, D, E, G, H, I e J, realizados nas 57 cepas de *S. aureus*, das quais 39 (68,4%) foram positivas para um ou mais genes que codificam para as diversas enterotoxinas pesquisadas e 12 genótipos distintos foram observados.

Por essa tabela verifica-se que, das 38 cepas isoladas a partir do leite cru, 27 (71,1%) possuíam genes para a produção de, pelo menos, um tipo de toxina. A partir do leite pasteurizado e na data de validade, essas porcentagens foram de 62,5% (5 em 8 cepas) e de 63,6% (7 em 11 cepas), respectivamente.

Independentemente de sua origem, a presença de somente um gene responsável pela produção de enterotoxinas foi observada em 25 cepas (64,1%), 9 apresentaram genes para a produção de duas enterotoxinas e 2 (5,1%), para três genes, *sea+sec+seh*. Perfil genotípico para a produção de até quatro enterotoxinas ocorreu em 3 cepas (7,7%), sendo uma *sea+seg+sei+sej*, outra *sea+sed+seg+sei* e a última, *seb+seg+seh+sei*. Genes para as enterotoxinas H, I e J não foram observados isoladamente.

TABELA 7: Perfil genotípico das cepas de *S. aureus*, isolados a partir do leite cru, pasteurizado e na data de validade, em relação às toxinas A, B, C, D, E, G, H, I e J.,

Perfil genotípico	Cru (N= 38)	Pasteurizado (N= 8)	Data de validade (N= 11)
<i>a</i>	8	2	2
<i>b</i>	2	-	-
<i>c</i>	3	1	2
<i>d</i>	1	-	1
<i>e</i>	2	-	-
<i>g</i>	1	-	-
<i>g+i</i>	4	2	1
<i>d+j</i>	2	-	-
<i>a+c+h</i>	2	-	-
<i>a+g+i+j</i>	1	-	-
<i>a+d+g+i</i>	-	-	1
<i>b+g+h+i</i>	1	-	-

Pela Figura 3, observa-se que entre os genes que codificam para enterotoxinas clássicas (SEA a SEE), *sea* foi o mais encontrado, em 16 isolados (41%), seguido por *sec*, em oito (20,5%), *sed* (5/12,8%) e *seb* (3/7,7%) e *see* (2/5,1%).

Quanto às enterotoxinas mais recentes, *seg* foi o mais frequentemente observado, em 11 cepas (28,2%), seguida de *sei*, com somente uma a menos (25,6%) e *seh* e *sej*, com três cada uma (7,7%).

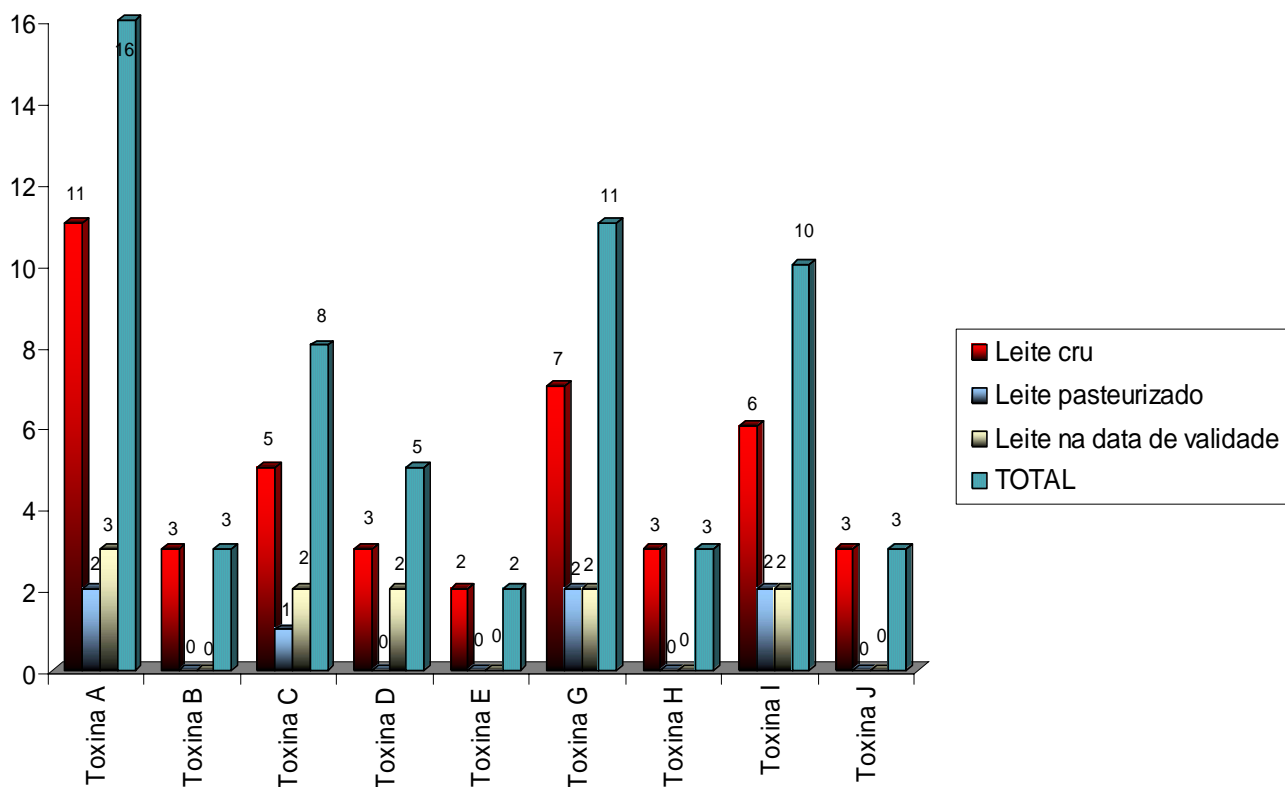


FIGURA 3. Distribuições dos genes produtores de enterotoxinas A, B, C, D, E, G, H, I e J, das cepas cepas isoladas do leite cru, pasteurizado e na data de validade

6. DISCUSSÃO

A qualidade do leite destinado ao consumo humano sempre foi uma preocupação de pesquisadores e das autoridades competentes, devido sua importância nutricional, econômico-social e de saúde pública, pois leite com má qualidade microbiológica pode acarretar em perdas econômicas e riscos à saúde do consumidor. No Brasil, a maioria das propriedades leiteiras, apresenta pouca tecnologia, deficiência no controle sanitário dos animais e na higienização, gerando um produto de baixa qualidade. Devido sua riqueza em nutrientes, o leite é suscetível ao ataque de um grande número de microrganismos do meio ambiente, do próprio animal, do homem e de utensílios e equipamentos utilizados na ordenha.

Neste estudo, a partir de 5 laticínios, foram analisadas 54 amostras de leite cru, de leite recém pasteurizado e do leite na data de validade.

As 54 amostras de leite cru, dos cinco laticínios visitados, estavam contaminadas por coliformes termotolerantes, em concentrações que variaram de $2,1 \times 10^2$ NMP/ml a $1,1 \times 10^6$ NMP/ml de leite. Na Malásia, Chye et al. (2004) observaram que 64,5% das 930 amostras de leite cru apresentaram *E. coli*.

No Brasil, Passos et al. (2005), na cidade de Senhor do Bonfim (BA), analisaram 20 amostras de leite e todos apresentaram coliformes termotolerantes em concentrações que variaram de $2,4 \times 10^2$ a $2,4 \times 10^5$ NMP/ml.

S. aureus foi observado em 38 (70,4%) das 54 amostras, em concentrações de até $8,9 \times 10^5$ UFC/ml. Em Minas Gerais, valores maiores foram observados por Arcuri et al. (2006), onde 22 (91,7%) de 24 amostras de leite cru apresentavam esse microrganismo. Na Malásia, Chye et al. (2004) observaram valores semelhantes aos valores nesse trabalho, quanto à presença de *S. aureus*, onde 60,7% de 930 amostras de leite cru também estavam contaminadas.

Esse trabalho não detectou *Salmonella*, a partir das amostras analisadas, pois a microbiota acaba interferindo nos procedimentos laboratoriais de detecção de patógenos de alimentos. Quando o alimento está muito contaminado, os microrganismos, em competição por sobrevivência,

desenvolvem-se, produzindo substâncias decorrentes de seu metabolismo, que podem tornar as condições do meio insatisfatórias para o cultivo e isolamento do microrganismo alvo da pesquisa (NERO, 2005)

Em Minas Gerais, Arcuri et al (2006) também não observaram esse microrganismo nas amostras de leite cru. Anteriormente, em 2005, Moraes et al, confirmaram a baixa prevalência de *Salmonella* sp em leite bovino pela ausência deste gênero nas 42 propriedades pesquisadas, no Rio Grande do Sul, assim como Ávila & Gallo (1996), em Piracicaba (SP) e Garrido et al. (2001), em Ribeirão Preto (SP). Na Malásia, esse microrganismo foi encontrado por Chye et al. (2004), que isolaram *Salmonella* em somente 1,4% das 930 amostras de leite analisadas.

Em relação à presença de *Listeria* sp, pela metodologia tradicional, foram detectadas 16 amostras positivas (29,6%), com o isolamento de 18 cepas, sendo 7 de *L. monocytogenes* (13% do total de amostras), 6 de *L. innocua* (11,1%), 4 de *L. ivanovii* (7,4%), e 1 de *L. grayi* (1,9%). Pela técnica de PCR, *L. monocytogenes* foi observada em 12 amostras (22,2%).

L. monocytogenes e *L. innocua* estiveram associadas em 4 amostras de leite cru. Segundo Klauser & Donnelly (1991), *L. innocua* é usada como bactéria indicadora da presença de *L. monocytogenes*. Essa associação também foi verificada na Itália por Massa et al. (1990) em queijos moles, no Rio Grande do Sul por Schwab et al. (1996) em queijo colonial artesanal e nos Estados Unidos por Ryser & Marth (1999) em queijo Jalisco. Estes resultados são justificados, segundo Varnam & Evans (1991), pelo fato de que ambas possuem o mesmo habitat, sendo que a detecção de *Listeria innocua* pode ser indicativo da presença de *Listeria monocytogenes*.

No México, Vásquez-Salinas et al. (2001) relataram 23% de positividade de *Listeria* sp em amostras de leite cru, valores semelhantes aos 29,6% encontrados nesse trabalho e, pela metodologia tradicional, os autores também detectaram 13% de *L. monocytogenes*. Entretanto, pela PCR, a porcentagem de detecção desse microrganismo aumentou para 24%. *L. ivanovii* também foi encontrada por esses autores em porcentagens muito semelhantes às nossas, de 6% (nesse trabalho foi 7,4%). Quanto a *L. innocua*, essa positividade foi bem menor, de somente 1%, enquanto o atual trabalho encontrou 11,1%. Deve ser

ressaltado que o México é um país em desenvolvimento, com características sócio-econômicas semelhantes às do Brasil.

Entretanto, valores menores e maiores também foram observados. Em 2004, Chye et al. (2004), na Malásia, observaram *Listeria* sp em somente 4,4% das 903 amostras de leite cru pesquisadas. Na Índia, Kalorey et al. (2007), pesquisando 2060 amostras de leite cru, detectaram *Listeria* sp em 139 (6,74%), das quais 105 (5,1%) eram *L. monocytogenes*. Valores semelhantes foram observados por Vitas et al (2004), na Espanha, que encontraram 6,8% dessa espécie bacteriana em leite cru. Valores menores ainda foram observados por Hamdi et al. (2007), na Argélia, com positividade de somente 2,6% de 153 amostras de leite cru analisadas, por métodos imunológicos (VIDAS).

No Brasil, Catão e Ceballos (2001) analisaram 45 amostras de leite cru e encontraram *Listeria* sp em 33 (73,3%), das quais 17 (37,8%) eram *L. monocytogenes*. Entretanto, esse microrganismo não foi observado por Destro et al. (1991), em São Paulo, Oliveira et al. (1994), em Minas Gerais, Nero et al. (2005), no Rio Grande do Sul e por Arcuri et al. (2006), também em Minas Gerais. Segundo esses últimos autores, a frequência de isolamento de *Listeria monocytogenes* em leite cru, no Brasil, pode variar de 0% a 16,7%, sendo que, neste trabalho, pela metodologia tradicional, essa porcentagem foi de 13%.

Quanto ao leite pasteurizado, das 54 amostras, 18 amostras (33,3%) estavam fora dos padrões estabelecidos pela RDC N°12, em relação ao número de coliformes termotolerantes, chegando em concentração de até $1,5 \times 10^2$ NMP/ml. Todas as amostras provenientes do leite que sofria pasteurização UHT (Laticínio 5) apresentaram-se dentro das normas estabelecidas pela RDC N° 12.

No Brasil, Campos (2004) analisando 30 amostras de leite pasteurizado produzido de maneira convencional e orgânica, de três laticínios da região de Botucatu, observou que 43,3% das amostras apresentaram concentrações de coliformes termotolerantes fora dos padrões, valores maiores que os observados neste trabalho. Entretanto, alguns autores relataram percentuais menores, como Wendpap e Rosa (1995), com 11% e Nader Filho et al., (1995), com 13,6%. Oliveira (2005) coletou amostras de leite pasteurizado e 14,8% delas estavam fora dos padrões, segundo a Anvisa (2001).

Em Alagoas, Silva et al. (2005b) analisaram 110 amostras de leite tipo C e 65 (59,1%) estavam com excesso de coliformes termotolerantes. Entretanto, Rangel e Klein (2005), em Concórdia (SC) observaram que as 16 amostras de leite pasteurizado tipo C e as 20 UHT estavam dentro dos padrões estabelecidos pela RDC Nº12 da Anvisa (2001).

Deve ser observado que, apesar desses trabalhos relatarem a utilização de leite pasteurizado, não há informações se as análises foram feitas no limite da data de validade. No presente trabalho, quando isso aconteceu, a porcentagem de amostras fora dos padrões subiu de 18 (33,3%) para 32 (59%).

Ainda no leite pasteurizado, foi observada positividade em 5 amostras (9,3%) em relação à presença de *Listeria* sp, tendo sido isoladas 3 cepas de *L. monocytogenes* (5,6%) e 2 de *L. innocua* (3,7%). Porcentagem maior foi obtida, na positividade de *L. monocytogenes*, com a utilização da PCR, de 18,5% (10 amostras positivas).

Deve ser ressaltado que essa maior positividade pela PCR, pode ser decorrente de falso-positivos, devido a reações com DNA liberado pela morte das células. Entretanto, em duas amostras, *L. monocytogenes* foi observada nas três etapas pela PCR e somente no leite cru e no leite da data de validade pela metodologia tradicional, não sendo isolada da amostra do leite recém pasteurizado. Provavelmente esse isolamento não ocorreu devido ao stress da pasteurização, pois segundo (HERMAN, 1997), como consequência de um ambiente estressado, a bactéria pode perder sua capacidade de crescimento em meios de cultivos usados rotineiramente para seu isolamento. Em uma outra amostra, também positiva nas três etapas para a PCR, *L. monocytogenes* foi isolada somente no leite cru, não sendo detectada no leite recém pasteurizado ou no leite na data de validade. Entretanto, nessa última etapa, foi isolada *L. innocua*, pela metodologia tradicional, comprovando a sobrevivência desse gênero, após a pasteurização.

Uma possível via de recontaminação do leite pasteurizado pode ocorrer devido às embalagens, falta de poder germicida das lâmpadas ultravioleta (UV), utilizada no setor de ensacamento, ou ainda, inabilidade dos manipuladores (CATÃO & CEBALLOS, 2001)

Assim, é interessante que a pesquisa de patógenos pela PCR seja realizada, porém com métodos que detectem produtos do metabolismo, comprovando a viabilidade da célula bacteriana, como RT-PCR.

Catão e Ceballos (2001) observaram positividade bem maior nesse tipo de leite, onde 30 % das amostras apresentaram *Listeria* sp. Os mesmos autores afirmaram que o leite cru apresentou maior diversidade de espécies desse gênero em relação ao leite pasteurizado, encontrando no primeiro, as espécies *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* e *L. grayi*. No leite recém pasteurizado, os autores observaram somente *L. monocytogenes* e no leite ensacado, *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*. No atual trabalho, no leite cru foram detectadas as quatro espécies, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii* e *L. grayi* e depois do processo térmico, somente as duas primeiras.

S. aureus foi observado em 8 (14,7%) das 54 amostras, em concentração de até $8,7 \times 10^3$ UFC/ml.

Quanto aos genes produtores de enterotoxinas, 39 (68,4%) de 57 cepas de *S. aureus* foram positivas para, pelo menos, uma enterotoxina e a SEA A foi a mais observada, ocorrendo em 16 isolados (41%), seguida de 8 cepas positivas para SEC (20,5%), 5 (12,8%) para SED, 3 para SEB (7,7%) e 2 (5,1%) para SEE.

Embora a literatura apresente resultados muito variáveis na prevalência de *S. aureus* enterotoxigênicos devido o tipo de alimentos e o biovar envolvidos (MOSSEL & VAN NETTEN, 1990; MATHIEU ET AL., 1991), é consenso que a toxina A é a mais frequentemente observada entre as cepas de *S. aureus* (BERGDOLL, 1989; JABLONSKI & BOHACHI, 1997; PEACOCK et al., 2002; NORMANNO et al., 2005).

Asao et al. (2003) relataram um surto em Kansai, no Japão, onde 13.420 pessoas foram afetadas pelo consumo de leite desnatado e iogurte (produzido com leite em pó) contaminados com $\leq 0,38$ ng/ml e 3,7 ng/g (leite em pó) de toxina do tipo A, respectivamente. Segundo Tranter (1996), a quantidade mínima de enterotoxina necessária para causar a doença não é conhecida, mas a ingestão de, pelo menos, 1 μ g de toxina em 100g de alimento induz o aparecimento de sintomas clínicos. Balaban & Rasooly (2001) relataram dose menor, onde a ingestão de 10 ng já causaria os sintomas da intoxicação.

Scherrer et al., na Suíça, (2004) analisaram 172 amostras de leite de cabra e ovelha e verificaram que 65,2% das 296 cepas eram positivas para a presença de genes responsáveis pela produção de enterotoxinas, valor muito próximo ao observado neste trabalho, de 68,4%. Entretanto, entre as clássicas, o mais encontrado foi *sec* (42%), numa porcentagem muito maior à aqui observada (20,5%). Katsuda et al (2005), no Japão, observaram que 183 (67,8%) de 270 isolados de *S. aureus* foram positivos para a presença de genes para a produção de uma ou mais enterotoxinas.

Na Itália, em 2007, Morandi et al também relataram valores muito próximos, de 67% para o número de cepas de *S. aureus* positivas para a presença de genes para a produção de uma ou mais toxinas, isoladas de leite e derivados. O gene mais frequentemente observado foi *sed* (49,3%), seguido de *sea* (48%), mas pela detecção da produção de toxinas por aglutinação reversa passiva por látex (RPLA), SEA foi a mais observada (41,3%).

Com a descoberta das novas enterotoxinas, aumentou a porcentagem de *S. aureus* enterotoxigênicos ou potencialmente enterotoxigênicos, pois 39 (68,4%) cepas revelaram-se positivas para a presença de, pelo menos, genes para uma enterotoxina. Considerando-se somente as enterotoxinas clássicas (SEA a SEE), esse número cai para 31 (52,5%). Rosec & Gigaud (2002) também observaram esse aumento do número de cepas enterotoxigênicas com a descoberta das novas SES, pois em seu estudo 30% das cepas genes para as toxinas clássicas e 57% para as novas. Entre as 75 cepas de *S. aureus* positivas para a presença de genes produtores de enterotoxinas pesquisadas por Morandi et al (2007), 19 (25%) eram portadores de genes somente para as enterotoxinas clássicas

O gene *seg* foi observado em 11 (28,2%) das 39 amostras de *Staphylococcus aureus* produtoras de, pelo menos, uma enterotoxina e em 90,9% das vezes, foi associado à presença de gene *sei*, que ocorreu em 10 isolados (25,6%). Valores semelhantes foram descritos por Rosec & Gigaud (2002), onde *seg* e *sei* estiveram associados em 80,6% das 155 cepas pesquisadas. Esses genes são frequentemente encontrados juntos por estarem presentes em posição sequencial, num fragmento de DNA de 3,2 Kb (JARRAUD et al., 2001). Nashev et al. (2004) também observaram essa associação em 50% das cepas de *S. aureus* pesquisadas. Anteriormente,

Jarraud et al. (1999) haviam relatado essa correlação em 57% das cepas toxigênicas isoladas de portadores e 67%, a partir de cepas isoladas de processos infecciosos. A pequena porcentagem de cepas onde havia presença de apenas uma dessas enterotoxinas poderia ser explicada por uma mutação do sítio de ligação de *seg* ou devido a uma variação do cluster dos genes dessas enterotoxinas (JARRAUD et al., 2001).

Zschock et al. (2005) também observaram a ocorrência simultânea desses dois genes, analisando leite de vacas com mastite e isolando 61 cepas de *S. aureus*, sendo que 36 tinham o gene para *seg* e 22, para *sei*, com 61% dessas cepas, com genes para ambas as toxinas. Lammler et al. (2000) e Omoe et al (2002) já haviam reportado que os genes *seg/sei* são frequentemente encontrados juntos em vacas com mastite e em leite cru.

Nesse trabalho, observou-se perfil genotípico, em três cepas (7,7%), para a produção de até quatro enterotoxinas, sendo uma SEA+SEG+SEI+SEJ, outra SEA+SED+SEG+SEI e a última, SEB+SEG+SEH+SEI. Nashev et al. (2004) também relataram perfis genéticos com presença de múltiplos genes, onde 9,1% das cepas de *S. aureus* apresentaram positividade para quatro toxinas (BGHI) e 4,5%, para cinco (ADGIJ). Omoe et al. (2005) também observaram que a maioria das 69 cepas de *S. aureus* isoladas de surtos de origem alimentar (alimentos ou material clínico dos pacientes) e manipuladores carregavam genes com mais de um tipo de enterotoxina, sendo que a principal combinação foi *sea-seb-seh-sek-seq*, ocorrendo em 21 isolados, seguido de *sea-seh-sek-seq*; *sea-seg-sei-sem-sen-seo*; *sea-sed-sej-ser*, com 5, 4, 2 isolados respectivamente.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, pode-se concluir que:

- O leite cru, obtido por ordenha manual ou mecânica, apresentou coliformes termotolerantes em todas as amostras, evidenciando práticas inadequadas durante a obtenção do mesmo.

- Embora a pasteurização clássica tenha sido eficiente e estatisticamente significativa, não foi suficiente para a eliminação dos coliformes termotolerantes. Enquanto na do tipo UHT, esses microrganismos não foram mais encontrados.

- Apesar da diferença de contaminação, por coliformes termotolerantes, entre o leite recém pasteurizado e o analisado na data de validade não ter sido estatisticamente significativa em quatro dos cinco laticínios, ocorreu um aumento considerável do número de amostras fora dos padrões microbiológicos exigidos.

- A PCR se mostrou mais sensível que a metodologia clássica, na detecção de *Listeria monocytogenes*, devendo esta técnica ser utilizada somente no leite cru.

- *Salmonella* não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas, não representando um problema nesse produto.

- Ocorreu a produção das toxinas clássicas (SEA a SEE) e das mais recentes (SEG, SEH, SEI e SEJ) pelos *Staphylococcus aureus* isolados nas diferentes etapas. A pesquisa das novas SES aumentou consideravelmente a porcentagem de cepas exenterotigênicas desse microrganismos, aumentando assim, o potencial patogênico dessas bactérias.

- O leite analisado neste trabalho apresentou baixa qualidade microbiológica, o que exige esforços governamentais e de toda a cadeia produtiva, visando a segurança do consumidor.

8. BIBLIOGRAFIA

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). RDC N°12 de 12 de janeiro de 2001. www.anvisa.br

AKINEDEN, O.; ANNEMULLER, C.; HASSAN, A. ; LAMMER, C.; WOLTER, W.; ZCHOCK, M. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 8, n. 5, p. 959-964, 2001.

ALMEIDA, P.F.; ALMEIDA, R.C.C. A PCR protocol using inl gene as a target for specific detection of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 11, p. 97– 101, 2000.

ANDERSON, J.B.; SHUSTER, T.A.; HANSEN, K.E.; LEVY, A.S.; VOLK, A. A camera's view of consumer food-handling behaviors. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 104, n. 2, p.186-191, 2004.

ANDREWS, W.H.; FLOWERS, R.S.; SILLIKER, J. *Salmonella* In: DOWNES, F.P; ITO, K. (Eds). **Compendium of Methods for the Microbiological: Examination of Foods**. Washington:Apha, 2001. p. 357-380.

ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M.; ÂNGELO, F.F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica de leite refrigerado nas fazendas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.

ASAO, T.; KUMEDA, Y.; KAWAI, T.; SHIBATA, T.; ODA, H.; HARUKI, K.; NAKAZAWA, H.; KOZAKI, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiol. Infect.**, v. 130, p. 33– 40.2003.

ATHAYDE, A.H.; CONCEIÇÃO, E.M.; TEIXEIRA, A.B.S.; TAVARES, A. N.; GONZALEZ, A. G. M. Qualidade microbiológica de leite “ultra high temperature” (UHT) integral. **Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Foz do Iguaçu, 2001.

AURELI, P.; FIORUCCI, G.C.; CAROLI, D.; MARCHIARO, G.; NOVARA, O.; LEONE, L.; SALMASO, S. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. **N. Engl. J. Med.**, v. 342, n. 17, p. 1236–1241, 2000.

ÁVILA C.R.; GALLO C.R. Pesquisa de *Salmonella* spp. em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo “Minas Frescal” comercializados no município de Piracicaba - SP. **Scientia. Agricola.**, v. 53, n. 1, p. 159-163, 1996.

AZNAR, R.; ALARCÓN, B. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. **J. Appl. Microbiol.**, v. 95, n. 5, p. 958-966. 2003.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Analytical chromatography for recovery of small amounts of staphylococcal enterotoxins from food. **Int. J. Food. Microbiol.**, v. 64, n. 1-2, p. 33-40, 2001.

BANNERMAN T. L.; MURRAY P. R.; BARON E.J.; JORGENSEN J. H.; PFALLER M. A.; YOLKEN R. H. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. Manual of Clinical Microbiology. **Am. Society Microbiol.**, p.384-404, 2003.

BAYLES, K.W.; IANDOLO, J.J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. **J. Bacteriol.**, v. 171, n. 9, p. 4799-4806, 1989.

BEAN, N.H.; GRIFFIN, P.M.; GOULDING, J.S. BEAN, N.H.; GRIFFIN, P.M.; GOULDING, J.S.; IVEY, C.B. Foodborne disease outbreaks, 5-year summary, 1983-1987. **J. Food. Prot.**, v. 53, p. 711-28, 1990.

BEAN, N.H.; GOULDING, J.S.; LAO, C.; ANGULO, F.J., Surveillance of foodborne disease outbreaks—United States, 1988–1992. **Morb. Mortal. Wkly. Rep. Surveill Summ.**, v. 45, n. 5, p. 1, 1996.

BELMONTE, E.A.; LAGO, N.C.M.R. Pesquisa de microrganismos indicadores em leite pasteurizado integral comercializado nas cidades de Ribeirão Preto e Sertãozinho, SP. **Anais do I Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**, Passo Fundo RS, 2004.

BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; SOUZA, J. A.; NERO, L. A.; SANTANA, E. H. W.; BALARIN, O.; CURIKI, Y. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado em Cornélio Procopio, Paraná. Controle do consumo e da comercialização. **Semina: Ciências Agrárias**, v.20, n.1, p.12-15, 1999.

BENNET, A.R.; GREENWOOD, D.; TENNANT, C.; BANKS, J.G.; BETTS, R.P. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 26, n. 6, p. 437 – 441, 1998.

BECKER, K.; FRIEDRICH, A.W.; LUBRITZ, G.; WEILERT, M.; PETERS, G.; EIFF, C. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 4, p. 1434-1439, 2003.

BERGDOLL, M.S. & ROBBINS, R.N. Characterization of types staphylococcal enterotoxins. **J. Milk Food Technol.**, v. 36, p. 610-2, 1973.

BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M.P. **Bacterial foodborne pathogens**. New York: Marcel Dekker, p. 464-523, 1989.

BERSOT, L.S.; MARQUES, K.R.; BARCELLOS, V.C.; GALVÃO, J. A. Avaliação de parâmetros de qualidade de leites UHT (Ultra High Temperature) comercializados na cidade de Palotina, Paraná, Brasil. **Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Foz do Iguaçu, 2005.

BETLEY, M.J.; BORST, D.W.; REGASSA, L.B. *Staphylococcal* enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. **Chem. Immunol.**, v. 55, p.1-35, 1992.

BLEEM, A. E. coli 0157:H7 in raw milk—a review. In: COLLINS, C.O.F (Ed.), **Animal Health Insight**. USDA, APHIS, VS Center for Epidemiology and Animal Health. BONFOH, B., WASEM, A., TRAORE, A.N., FANE, A.,

BOOR, K. J. Pathogenic microorganisms of concern to the dairy industry. **Dairy, Food and Environ. Sanit.**, v.17, n.11, p.714-717, 1997.

BORST, D.W.; BETLEY, M.J. Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression correlate with sea allele class. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 113- 118, 1994.

BRASIL. (1952) Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento de Inspeção Indústria e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Aprovado pelo Decreto 30691 (29/03/1952) e alterado pelo Decreto 1255 (25/06/1962). Rio de Janeiro. 174p.

BRYAN, F.L. Foodborne diseases in the United States associated with meat and poultry. **J. Food. Prot.**, v. 43, p. 140-50, 1980.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; NICOLAU, E. S.; J. R. G.; NEVES, R. B. S. Parameters of microbiological quality of raw milk and water in dairy farms in Goiás state - Brazil. **Anais do II Congresso Panamericano de Qualidade do Leite e Controle de Mastite**, Ribeirão Preto SP, 2002.

BUYSER, M.L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, L. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. **Int. J. Food. Microbiol.**, v. 67, n. 1, p. 1–17, 2001.

CAMPOS, E.P. Qualidade microbiológica, físico-química e pesquisa de resíduos de antibióticos e pesticidas no leite bovino produzido pelo sistema convencional e pelo sistema orgânico. 2004. 59f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R.; SOUZA, J.M.; SENA, M.J. An outbreak of Staphylococcal Food Poisoning in the Municipality of Passos, MG, Brazil. *Brazilian Arch. of Biol. Technol.*, v. 46, n. 4, p. 581-586, 2003.

CARMO, L. S., CUMMINGS, C.; LINARDI, V.R.; DIAS, R.S.; SOUZA, J.M.; SENA, M.J.; SANTOS, A.; SHUPP, J.W.; PEREIRA, R. K. P; JETT, M. A case study of a massive staphylococcal food poisoning incident. **Foodborne Pathog. Dis.**, v.1, n. 4, p.241–246, 2004.

CASTBERG, H.G. Lipase activity. **Int. Dairy Federation Bulletin**, Brussels, v. 271, p. 18-20, 1992.

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

CHAFFER, M.; LEITNER, G.; WINKLER, M.; GLICKMAN, A.; KRIFUCKS, O.; EZRA, E.; SARAN, A. Coagulase-negative Staphylococci. and mammary gland infections in cows. **Zentralbl. Veterinarmed. B.**, v. 46, n. 10, p. 707–712, 1999.

CHAMPAGNE, C.P., LAING, R.R., ROY, D., MAFRE, A. & GRIFFITHS, M.W. Psychrotrophs in dairy products: Their effects and their control. **Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.**, v.34, n.1, p.1-30, 1994.

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

CHHABRA, A. T.; CARTER, W. H.; LINTON; R. H.; COUSIN, M. A. A predictive model to determine the effects of pH, milkfat, and temperature on thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. **J. Food. Prot.**, v. 62, n. 10, p.11493-1149, 1999.

CHYE, F.Y.; ABDULLAH, A.; AYOB, M. K. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. **Food. Microbiol.**, v, 21, n. 5, p. 535–541, 2004.

COIA, J.E.; JOHNSTON, Y.; STEERS, N.J.; HANSON, M.F. A survey of the prevalence of *Escherichia coli* 0157 in raw meats, raw cows' milk and raw-milkcheeses in south-east Scotland. **Int. J. Food. Microbiol.**, v. 66, p. 63–69. 2001.

CORRY, J.E.; POST, P.C.; LAISNEY, M.J. Culture media for the isolation of campylobacters. **Int. J. Food. Microbiol.**, v. 26, n. 1, p. 43–76, 1995.

COUCH, J.L.; BETLEY, M.J. Nucleotide sequence of the type C3 staphylococcal enterotoxin gene suggests that intergenic recombination causes antigenic variation. **J. Bacteriol.**, v. 171, n. 8, p. 4507-4510, 1989.

COX, J.M. The significance of psychrotrophic *Pseudomonas* in dairy products. **Australian J. of Dairy Technol.**, v.48, n.2, 1993.

DENIS, M.; REFRÉGIER-PETTON, J.; LAISNEY, M.J.; ERMEL G.; SALVAT, G. *Campylobacter* contamination in French chicken production from farm to consumers, use of a PCR assay for detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **J. Appl. Microbiology.**, v. 91, n. 2, p. 255–267, 2001.

DESTRO, M.T.; SERRANO, A.M.; KABUKI, D.Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food. Control.**, v. 13, n. 2, p. 110-112, 1991.

DOYLE, M.P.; CLIVER, D.O. *Salmonella*. In: CLIVER, D. O. (Ed.). **Foodborne diseases**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 185-204.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.
<http://www.cnpqgl.embrapa.br/producao/producao.php>, acesso em 12 mar. 2007.

ENTICOTT, G. Risking the rural: nature, morality and the consumption of unpasteurised milk. **J. Rural Studies.**, v. 19, p. 411-424, 2003.

ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; FUSCO, V.; COPPOLA, S. PCR – based detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making. **J. App. Bacteriol.**, v. 6, p. 1090- 1096, 2004.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1992. 652p.

FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. **Microbiology.**, v. 61, p. 3872– 3874, 1991.

FERNANDEZ, M.M.; MARZI, M.C., BERGUER, P.; BURYZN, D.; LANGLEY, R.J.; PIAZZON, I.; MARIUZZA, R.A.; MALCHIODI, E.L. Binding of natural variants of staphylococcal superantigens SEG and SEI to TCR and MHC class II molecule. *Molecular Immunology*, 43: 927, 938, 2006.

FONSECA, L.F.L. Leite a granel: modelo moderno de estocagem e transporte. *Revista Leite & Derivados*, n.40, p.16-21, 1998.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo. Lemos Editorial, 2000, 176pp.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia de Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 1996, 182p.

FRANCO, R.M.; CAVALCANTI, R.M. S.; WOOD, P.C.B. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 68-69, p.70-77, 2000.

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

FRANK, J.F. Milk and dairy products. In DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R. & MONTVILLE, T.J. (eds) **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. ASM Press. 2ª ed. 2001.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. Microbiologia de los alimentos. 4.ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 667p.

FRENZEN, P.D. Deaths due to unknown foodborne agents. **Emerg. Infect. Dis.**, v.10, n.9, p.1536-1543, 2004.

FUEYO, J.M.; MARTIN, M.C.; GONZALEZ-HEVIA, M.A.; MENDOZA, M.C. Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins. **Int. J. Food. Microbiol.**, v. 67, p. 139-145, 2001.

GARRIDO N.S.; MORAIS J.M.; BRIGANTI R.C.; OLIVEIRA M.A.; BERGAMINI S.A.V. ; FÁVARO R.M.D. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de leite pasteurizado proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto/SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. v. 2, p. 141-146, 2001.

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

GOMES, H.A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxinas por linhagens isoladas a partir de leite cru, leite pasteurizado tipo c e queijo “Minas frescal”, comercializados em Piracicaba – SP. Piracicaba, 1994. 124p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo.

GRAN, H.M.; WETLESEN, A.; MUTUKUMIRA, A.N.; RUKURE, G.; NARVHUS, J.A. Occurrence of pathogenic bacteria in raw milk, cultured pasteurised milk and naturally soured milk produced at small-scale dairies in Zimbabwe. **Food Control**, v. 14, n. 8, p. 539–544, 2003.

GUNDOGAN, N.; CITAK, S.; TURAN, E. DNase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurised milk and ice cream samples. **Food. Control**, v. 17 p. 389–392, 2006.

HALPIN-DOHNALEK, M.I. ; MARTH, E.H. *Staphylococcus aureus*: production of extracellular compounds and behavior in foods – a review. **J. Food Prot.**, p. 267-282, 1989.

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

HAYES, P.R. **Microbiología e higiene de los alimentos**. Zaragoza: Acribia. 1993. 369p.

HERMAN, L. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* by PCR. **Food. Microbiol.**, v. 14, p. 103-110, 1997.

HOLECKOVA, B.; HOLODA, E.; FOTTA, M.; KALINACOVA, V.; GONDOL, J.; GROLMUS, J. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Ann. Agric. Environ. Med.**, v. 9, P. 179-182, 2002.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <http://www.ibge.gov.br> [mar 2004]

ICMSF. **Microorganisms in foods 5**. Microbiological specifications of food pathogens. London, Blackel Academic & Professional, p. 513, 1996.

JABLONSKI, L.M.; BAHACH, L.M. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M.P.; BUCHAT, L.R.; MONTEVILLE, T.J. (Eds). Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. American society of Microbiology Press, Washington, DC, pp. 353- 357, 1997.

JARRAUD, S.; COSON, G.; BES, M.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; LINA, G. Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, p.2446-2449, 1999.

JARRAUD, S.; PEYRAT, M.A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. EGC, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **J. Immunol.**, v. 166, p. 669- 677, 2001.

JAY, J.M. **Modern Food Microbiol.** 7 ed. ASPEN publishers, Gaithersburg, MD. 2005, 854 pp.

JINNEMAN, K.C.; HILL, W.E., *Listeria monocytogenes* lineage group classification by MAMA-PCR of the listeriolysin gene. **Curr. Microbiol.**, v. 43, p.129– 133, 2001.

JOHNS, Jr M.B.; KHAN, S.A. Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with a discrete genetic element. **J. Bacteriol.**, v. 170, p. 4033- 4039, 1988.

JOHNSON, W.M.; TYLER, S.D.; EWAN, F.E.; ASHTON, F.R.; POLLARD, D.R.; ROZEE, K.R. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 426-430, 1991.

KALOREY, D.R.; WARKE, S.R.; KURKURE, D.B.; 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, 2007.

KATSUDA, K.; HATA, E.; KOBAYASHI, H.; KOHMOTO, M.; KAWASHIMA, K.; TSUNEMITSU, H.; EGUCHI, M. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. **Vet. Microbiol.**, v.105, p. 301–305, 2005.

KLAUSER, R.B.; DONNELLY, C.W. Environmental sources of *Listeria* and *Yersinia* in Vermont dairy plants. **J. Food. Prot.**, v. 54, p. 607– 611, 1991.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES F.P; ITO, K. (Eds). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington:Apha, p. 69-80, 2001.

KOZAK, J.; BALMER, T.; BYRNE, R. Prevalence de *Listeria monocytogenes* in foods: Incidence in dairy products. **Food. Control.**, v.7, n. 4-5, p. 215-221, 1996.

KURODA, M., OHTA, T., UCHIYAMA, I. BABA, T., YUZAWA, H., KOBAYASHI, I., CUI, L., OGUCHI, A., AOKI, K., NAGAI, Y., LIAN, J., ITO, T., KANAMORI, M., MATSUMARU, H., MARUYAMA, A., MURAKAMI, H., HOSOYAMA, A., MIZUTANI-UI, Y., TAKAHASHI, N.K., SAWANO, T., INOUE, R., KAITO, C., SEKIMIZU, K., HIRAKAWA, H., KUHARA, S., GOTO, S., YABUZAKI, J., KANEHISA, M., YAMASHITA, A., OSHIMA, K., FURUYA, K., YOSHINO, C., SHIBA, T., HATTORI, M., OGASAWARA, N., HAYASHI, H., AND HIRAMATSU, K. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus*. **Lancet**, v.357, p.1225–1240, 2001.

KWOK A.Y.C.; CHOW A.W. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial *hsp60* gene sequences. **Int. Evol. Microbiol.**, v. 53, p. 87-92, 2003.

LAMMLER, C.H.; AKINEDEN, O.; ANNEMULLER, C.; WOLTER, W.; ZSCHOCK, M. Molecular analysis of virulence factors of *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis. In: Symposium on Immunology of Ruminant Mammary Gland, Stresa, p. 326–330, 2000

LAMPS, M.D.L.W. Pathology of food-borne infectious diseases of the gastrointestinal tract: an update. **Adv. Anat. Pathol.**, v.10, n.6, 2003.

LANCETTE, G.A; BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins. In: DOWNES F.P; ITO, K. (Eds). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington: Apha, 2001. p. 387-403.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of *Staphylococcus aureus*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 95, p. 38–43, 2003.

LINA, G.; BOHACH, G.A.; NAIR, S.P.; HIRAMATSU, K.; JOUVIN-MARCHE, E.; MARIUZZA, R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. **J. infect. Dis.**, v. 189, p. 2334- 2336, 2004.

LONGHI, C.; MAFFEO, A.; PENTA, M.; PETRONE, G.; SEGANTI, L.; CONTE, M. P. Detection of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheese. **J. Appl. Microbiol.**, v. 94, p. 879-875, 2003.

LOURENÇO, L.F.H.; SILVA, M.S.S. Análises físico-química e microbiológica como indicadores da qualidade do leite cru comercializado no município de Castanhal/Pará. **Anais do XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Fortaleza CE, 2000.

MACFADDIN, J.F. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. Baltimore, Williams & Wilkins, 1976. 312p.

MARR, J.C.; LYON, J.D.; ROBERSON, J.R.; LUPHER, M.; DAVIS, W.C.; BOHACH, G.A. Characterization of novel type C Staphylococcal enterotoxin: biological and evolutionary implications. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 4254-4262, 1993.

MASSA, S.; ESARONI, C.; PODA, G.; ROVATELLI, L.D. The incidence of *Listeria* spp. in soft cheeses, butter and raw milk in the province of Bologna. **J. Applied Bacteriol.**, v.68, p.153-156, 1990.

Mc LAUCHILN, J.; MITCHELL, R. T.; SMERDON, W. J.; JEWELL, R. *Listeria monocytogenes* and listeriosis : a review of hazard characterization for use in microbiological risk asesment of foods. **Int. J. Food Microbiol.** v. 92, p. 15-33, 2004.

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W.M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 1032-1035, 2000.

MEMPEL, M.; LINA, G.; HOJKA, M.; SCHOPP, C.; SEIDL, H.P.; SCHAFFER, T.; RING, J.; VANDENESCH, F.; ABECK, D. High prevalence of superantigens associated with the *egc* locus in *Staphylococcus aureus* isolates from patients with eczema. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.22, p. 306-209, 2003.

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

MORANDI, S.; BRASCA, M.; LODI, R.; CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. **Vet. Microbiol.**, v. 124, p. 66-72, 2007.

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

MOURA, S.M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D.G.M. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. *Int. J. Food Microbiol.*, v.19, p.229-237, 1993.

MUNSON, S.H.; TREMAINE, M.T.; BETLEY, M.J., WELCH, R.A. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, v. 66, p. 3337- 3348, 1998.

MYLLYS, V.; ASPLUND, K.; BROFELDT, E. Bovine Mastitis in inland in 1988 and 1995-changes in prevalence and antimicrobial resistance. *Acta Vet. Scand.*, v. 39, p. 119–126, 1998.

NADER FILHO, A.; AMARAL, L. A.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; NASCIF JÚNIOR, I. Influência das Fases da Ordenha Sobre O Número de Células Somáticas do Leite Bovino. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 15, n. 4, p. 117-120, 1995.

NASHEV, D.; TOSHKOVA, K.; ISRINA, S.; SALAISA, S.; HASSAN, A.A; LAMMLER, C.; ZSCHOCK, M. Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 233, p. 45-52, 2004.

NAUTA, M. J. Separation of uncertainty and variability in quantitative microbial risk assessment models. *Int. J. Food Microbiol.*, v.57, p.9-18, 2000.

NELSON, J.H. An overview of good manufacturing practice -1. *Bol. Int. Dairy Federation*, IIDF 276, p.10-11, 1992.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R. BELOTI, V.; PONTES NETTO, D.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M. Risk characterization in raw milk: Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and chemical residues. **Anais do Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Florianópolis, 2003.

NERO, L.A.; MAZIERO, D.; BEZERRA, M.M.S. Hábitos alimentares do consumidor de leite cru de Campo Mourão - PR. **Semina: Ci. Agr.**, v.24, n.1, p.21-26, 2003.

NERO, L.A. *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras do Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção. São Paulo, 2005, p. 141 Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Ciência de Alimentos. Área de Bromatologia.

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASTELLI, L.; MIONI, R.; SUCUOTA, S.; BOLZONI, G.; Di GIANNATALE, E.; SALINETTI, A. P.; La SALANDRA, G.; BARTOLI, M.; ZUCCON, F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARISI, A.; QUAGLIA, N.C.; CELANO, G. V. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in foods products marketed in Italy. **Food Microbiol.** v. 98, p. 73-79, 2005.

OLIVEIRA, A.N.; MESQUITA, A.J.; NUNES, I.A. Ocorrência de bactérias do gênero *Listeria* em Leite cru e pasteurizado em Goiânia, Goiás. **Anais do Congresso Nacional de Laticínios**, Juiz de Fora, 1994.

OLIVEIRA, A. J.; CARUSO, J. G. B. Controle de qualidade do leite. In: Leite: Obtenção e qualidade do produto fluido e derivados. Ed. 2 . Piracicaba: FEALQ, p. 27-43, 1996.

OLIVEIRA, R.P.S. Condições microbiológicas e avaliação da pasteurização em amostras de leite comercializado no município de Piracicaba – SP. 2005. 80f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

OMOE, K.; HU, D.L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 6088-6094, 2003.

OMOE, K.; HU, D.L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **Fems Microbiol. Lett.**, v. 256, p. 191-198, 2005.

ORRISS, G.D. Animal diseases of public health importance. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. 497-502, 1997.

ORWIN, P.M.; LEUNG, D.Y.M.; DONAHUE, H.L. NOVICK, R.P.; SCHLIEVERT, P. M. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 360-366, 2001.

ORWIN, P.M.; FITZGERALD, J.R.; LEUNG, D.Y.M.; Gutierrez, J.A., BOHACH, G.A.; SCHLIEVERT, P.M. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 2916-2919, 2003.

Paraná – Secretaria da Saúde do Estado do Paraná. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br> [mar 2001].

PASSOS, F.C.; LIMA, Y.L.N.; SILVA, S.C.; SILVA, G. P.; ALMEIDA, D. A. C. Qualidade bacteriológica do leite “in natura” comercializado na cidade de senhor do Bonfim, BA. **Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Santos, 2005.

PEREIRA, M.A.; RODRIGUES, K.L.; MOREIRA C.N. *Escherichia coli* verotoxigênica em leite cru e beneficiado em Pelotas, RS. **Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Santos, 2005.

PINTO, A.T.; MAROSO, M.D.; BRONZATO, M.J.; NISHIMURA, R. P.; GRECCO, D. Qualidade microbiológica de leite cru transportado em caminhões-tanque. **Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Foz do Iguaçu, 2001.

PITT, W. M.; HARDEN, T.J.; HULL, R.R. Behavior of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk during fermentation with lactic acid bacteria. **J. Food Prot.**, v. 63, n. 7, p. 916-920, 2000.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; POLÔNIO, A. L. C.; HONAGA, M. Y., Adequação do leite produzido na região de Araçatuba aos padrões preconizados pela IN51 - MARA. Parte 2: leite individual. **Anais do I Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**, Passo Fundo RS, 2004.

QUINTANA, R.C.; SILVA, L.C.; CARNEIRO, L.C. Avaliação comparativa do leite cru e pasteurizado em laticínios de Morrinhos – Goiás. **Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Foz do Iguaçu, 2001.

RANGEL, F.; KLEIN, C.S. Avaliação microbiológica de leite pasteurizado tipo c e longa-vida (UHT), comercializados na região urbana do município de concórdia-sc. In: **Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Foz do Iguaçu, 2001

REN, K.; BANNAN, J.D; PANCHOLI, V.; CHEUNG, A.L., ROBBINS, J.C., FISCHETTI, V.A.; ZABRISKIE, J.B.E. Characterization and biological properties of a new staphylococcal exotoxin. **J. Exp. Med.**, v. 180, p. 1675-83, 1994.

ROSEC, J.P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 77, p. 61-70, 2002.

ROUSSEAU, S.; OLIER, M.; LEMAITRE, J.P.; PIVETEAU, P.; GUZZO, J. 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. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 4, p. 2180 - 2185, 2004

RYSER, E.T., Public health concerns. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L. (Eds). **Appl. Dairy Microbiol.** Marcel Dekker, Inc., New York, 1998. p. 263–403.

RYSER, E.T.; MARTH, E.H. Occurrence of *Listeria* in foods: milk and dairy foods. In: MILLER, A.J.; SMITH, J.L.; SOMKUTI, G.A. (Eds.). *Topics in industrial microbiology: foodborne listeriosis*. London: Elsevier, 1990. Cap. 23, p.151-163.

RYSER, E.T; DONNELLY, C.W. *Listeria*. In: DOWNES F. P; ITO, K. (Eds). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington: Apha, 2001. p. 343-356.

São Paulo – http://www.cvs.saude.sp.gov.br/legis.asp?classe=legis_al2&name=Alimentos (acesso em 14/08/2007)

SCHERRER, D.; CORTI, S.; MUEHLHERR, J.E.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. **Vet. Microbiol.**, v. 101, p. 101–107, 2004.

SCHLECH, W.F. *Listeria* gastroenteritis. Old syndrome, new pathogen. **N. Engl. J. Med.**, p.130–132, 1997.

SCHWAB, J.P.; BECHTEL, M.A.B.; SCHUCH, D.T.M. *Listeria monocytogenes*. In farm-made colonial cheese marketable in Porto Alegre. **Arqu. Faculd. Vet. UFRGS.**, v.24, n.1, 1996.

SHAFER, W.M.; IANDOLO, J.J. Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. **Infect. Immun.**, v. 20, p. 273- 278, 1978.

SHAH, N.P. Psychrotrophs in milk: a review. **Milchwissenschaft**, v. 49, n. 8, p.432-437, 1994.

SHALITA, Z.; HERTMAN I.; SAND, S. Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin production in *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v. 129, p. 317- 325, 1977.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. São Paulo: Varela, 295p, 1997.

SILVA, P.H.F.; PORTUGAL, J.A.B.; CASTRO, M.C.D. **Qualidade e competitividade em laticínios**. Juiz de Fora: EPAMIG – Centro Tecnológico – ILCT, 1999. 116p.

SILVA, W. P.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian Dairy farms. **Braz. J. Microbiol.**, v. 31, n. 2, p. 103-106, 2000.

SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 81, p. 241-248, 2001.

SILVA, D.Z.; TENÓRIO, M.R.; OLIVEIRA, L.C.S.; Silva, M. D. C.; PERDIGÃO, A. C. B.; PANTOJA, L. D. M.; COUTO, M. S.; PINHEIRO, R, P.; GONDIN, F. A. L. Deterioração por microrganismos psicrotrófilos de duas marcas de leite pasteurizado tipo “c” comercializados em Fortaleza-Ceará. In: **Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Foz do Iguaçu, 2005a.

SILVA, M.C.D.; SILVA, J.V.L.; CONCEIÇÃO, E.M.; TAVARES, A. T. ANDRADE, J. R.; GONZALEZ, A. G. M. Avaliação da qualidade microbiológica e pesquisa de *Escherichia coli* diarreiogênica em leite pasteurizado tipo C

produzido para merenda escolar em Maceió-AL. In: **Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Foz do Iguaçu, 2005b.

SIQUEIRA, R. S. Manual de Microbiologia dos Alimentos. Brasília: EMBRAPA, 159p, 1995

SLUTSKER, L.; SCHUCHAT, A., Listeriosis in humans. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. (Eds.), *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 1999. p. 75– 95.

SOBRINHO, F.F.; COUTINHO, G.H.; COURA, J.D. Coleta do leite a granel. *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. 1995. Dissertação (Mestrado) – Fundação João Pinheiro, Belo Horizonte

SOUZA, R.A; FREITAS, K.N; VEIGA, S.M.O.M. Isolamento de cepas de *Salmonella* sp. em amostras de leites crus e pasteurizados e avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos mais utilizados. **Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Foz do Iguaçu, 2005.

STILES, B.G.S.; KRAKAUER, T. Staphylococcal enterotoxins: a purging experience in review, Part I. **Clin. Microbiol. Newsletter**, v. 27, n. 23, p. 179-185, 2005.

SU, Y.C ; WONG, A.C.L. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. **J. Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 1438-43, 1995.

TRANter, H.S. Foodborne illness: foodborne staphylococcal illness. **Lancet**, v. 336, p. 1044-1046, 1996.

TREMAINE, M.T.; BROCKMAN, D.K.; BETLEY, M.J. Staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression is not affected by the accessory gene regulator (agr). **Infect. Immun**, v. 61, p. 356- 359, 1993.

VANDENBUSSCHE, R.A.; LYON, J.D.; BOHACH, G.A. Molecular evaluation of the staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxin gene family. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 2, p. 281- 292, 1993.

VARNAM, A.H. & EVANS, M.G. Foodborne pathogens: an illustrated text. Londres, Wolfe, 1991. 550p.

VÁSQUEZ-SALINAS, C.; RODAS_SUÁRES, O.; QUIÑONES-RAMÍREZ, E.I. Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms on the outskirts of Mexico city. **Food. Microbiol.**, v. 18, n. 2, p. 187-181, 2001.

VIANA, L. R.; HENZEL, A.; SPRICIGO, D. A.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; VARGAS, A. C. Qualidade do leite *in natura* recebido pela usina escola de laticínios da UFSM. Anais do **XXIX Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Gramado RS, 2002.

VITAS, A.L.; GARCIA-JALON, V.A. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **Int. J. Food Microbiol.**, v. 90n. 3, p. 349-356, 2004.

VON EIFF, C.; BECKER K.; MACHKA K.; STAMMER H.; PETERS G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, p. 11-6, 2001.

WENDPAP, L.L.; ROSA, O.O. Qualidade microbiológica de leite pasteurizado tipo C comercializado em Cuiabá – MT. **Higiene Alimentar.**, v. 9, n. 39, p. 11-13, 1995.

WENDTLAND, A.; BERGANN, T. *Listeria monocytogenes*: occurrence in a factory for slaughtering, carvening and meat processing. **Fleischwirtschaft.**, v. 74, p. 1329– 1331, 1994.

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

ZSCHÖCK, M.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W.; HAMANN, H.P.; LAMMLER, CH
Pattern of enterotoxin genes seg, seh, sei and sej positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Vet. Microbiol.**, v. 108, n. 3-4, p. 243–249, 2005.