

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

WELINGTON HARTMANN

**CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS, DE MANEJO E
HIGIENE NA PRODUÇÃO DE LEITE BOVINO NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ:
OCORRÊNCIA DE *Listeria monocytogenes***

CURITIBA

2009

WELINGTON HARTMANN

**CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS, DE MANEJO E
HIGIENE NA PRODUÇÃO DE LEITE BOVINO NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ:
OCORRÊNCIA DE *Listeria monocytogenes***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Lucia Masson

CURITIBA

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS
COORDENAÇÃO DE PROCESSOS TÉCNICOS

Hartmann, Welington

Características físico-químicas, microbiológicas, de manejo e higiene na produção de leite bovino na região oeste do Paraná : ocorrência de *Listeria monocytogenes* / Welington Hartmann. – Curitiba, 2009.

76f. : il., tabs.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Lúcia Masson

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.

Inclui referências e apêndices

1. Leite – Produção – Paraná. 2. *Listeria*. 3. Segurança alimentar. I. Masson, Maria Lúcia, 1958-. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. III. Título.

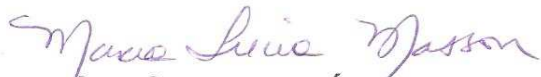
CDD 637.1

Andrea Carolina Grohs CRB 9/1.384

WELINGTON HARTMANN

**CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS,
DE MANEJO E HIGIENE NA PRODUÇÃO DE LEITE BOVINO NA
REGIÃO OESTE DO PARANÁ: OCORRÊNCIA DE *Listeria
monocytogenes***


Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de
Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão
formada pelos professores:


Orientadora: Prof^a. Dr^a. MARIA LÚCIA MASSON
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof. Dr. ERNEST ECKEHARDT MULLER
Centro de Ciências Agrárias, UEL


Prof^a. Dr^a. MARILDE TEREZINHA BORDIGNON LUIZ
Centro de Ciências Agrárias, UFSC


Prof^a. Dr^a. MARIA BERENICE REYNAUD STEFFENS
Setor de Ciências Biológicas, UFPR


Prof. Dr. JULIO EDUARDO ARCE
Setor de Ciências Agrárias, UFPR

Curitiba, 03 de julho de 2009.

DEDICO

Às minhas filhas, Mariana e Angela

AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente a todas as pessoas que auxiliaram na concretização deste trabalho:

- À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná.
- À Prof. Dra. Maria Lúcia Masson, orientadora.
- À Prof. Dra. Maria Berenice Reynaud Steffens, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.
- Ao Prof. Dr. Julio Eduardo Arce, do Curso de Engenharia Florestal da UFPR.
- Ao Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná, do convênio Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa/Universidade Federal do Paraná.
- Aos colegas do Programa de Pós-Graduação, Dr. Uriel Vinicius Cotarelli de Andrade e Dr. Felipe Richter Reis.
- À equipe do Laboratório de Fixação de Nitrogênio da UFPR: Marco Antonio Seiki Kadowaki e Mariana Soares Hartmann.
- Ao Laborclin – Produtos para Laboratórios Ltda.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO GERAL.....	3
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 IDENTIFICAÇÃO DE <i>Listeria monocytogenes</i>	5
2.1.1 Em meio de cultura.....	5
2.1.2 Reação de polimerase em cadeia (PCR).....	6
2.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	7
2.2.1 Características da doença.....	9
2.2.2 Mecanismo de patogenicidade.....	10
2.2.3 Epidemiologia.....	11
2.2.4 Medidas de controle.....	12
2.3 REGULAMENTAÇÃO SOBRE <i>L. monocytogenes</i> EM ALIMENTOS	12
2.4 FATORES QUE INFLUENCIAM A QUALIDADE DO LEITE CRU.....	13
2.4.1 Higiene ambiental.....	14
2.4.2 Temperatura de armazenamento do leite	14
2.4.3 Práticas higiênicas utilizadas no manejo da ordenha.....	16
2.4.4 Limpeza dos copos coletores.....	17
2.4.5 Qualidade da água utilizada na higienização dos equipamentos de ordenha	17
2.5 PARÂMETROS UTILIZADOS PARA A AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO LEITE CRU.....	18
2.5.1 Contagem de microrganismos mesófilos e psicrotróficos.....	19

2.6	A BACIA LEITEIRA DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ	20
2.7	BOAS PRÁTICAS DE PRODUÇÃO.....	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	MATERIAL	24
3.1.1	Caracterização das propriedades.....	24
3.1.1.1	Verificação das propriedades <i>in loco</i>	24
3.1.2	Instrumento de coleta de dados.....	25
3.1.3	Amostras de leite cru.....	27
3.1.4	Colheita de amostras de superfície dos copos coletores e vasilhames.....	28
3.1.5	Colheita de amostras de água.....	29
3.1.6	Classificação higiênico-sanitária das propriedades rurais.....	29
3.2	PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS.....	30
3.2.1	Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis, e contagem de psicotróficos.....	30
3.2.2	Contagem de células somáticas.....	30
3.2.3	Contagem bacteriana total.....	30
3.2.4	Determinação da acidez titulável.....	30
3.2.5	Determinação da densidade relativa.....	31
3.2.6	Determinação do índice crioscópico.....	31
3.2.7	Pesquisa de resíduos de antibióticos.....	31
3.2.8	Determinação da concentração de matéria gorda e proteína.....	31
3.2.9	Determinação da concentração de extrato seco desengordurado.....	31
3.3	PESQUISA DE <i>Listeria monocytogenes</i>	32
3.3.1	Isolamento e identificação de <i>Listeria monocytogenes</i>	32
3.3.2	Reação de PCR.....	32
3.3.2.1	Eletroforese em gel agarose.....	34
3.3.2.2	Interpretação dos resultados.....	34
3.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	35
3.4.1	Contagem de mesófilos, psicotróficos e contagem bacteriana total eletrônica.....	35

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1	MÉDIAS ESTIMADAS DAS VARIÁVEIS DEPENDENTES ESTUDADAS.....	46
4.2	ESTUDO DOS EFEITOS DE MEIO SOBRE A QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE CRU.....	52
4.2.1	Higiene ambiental.....	54
4.2.2	Temperatura de armazenamento do leite cru.....	55
4.2.3	Práticas higiênicas no manejo da ordenha.....	57
4.2.4	Limpeza dos copos coletores.....	58
4.2.5	Qualidade da água utilizada para limpeza dos equipamentos.....	59
4.3	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Listeria monocytogenes</i>	60
5	CONCLUSÕES	65
	RECOMENDAÇÃO	66
	REFERÊNCIAS	67
	APÊNDICE 1 – LOCALIZAÇÃO DA BACIA LEITEIRA	74
	APÊNDICE 2 – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	ESTIMATIVA DE PRODUTORES SEGUNDO O PRINCIPAL MÉTODO DE ARMAZENAMENTO POR REGIÃO NO ESTADO DO PARANÁ – OUTUBRO, 2007	21
TABELA 2	CRITÉRIOS E VALORES REFERENTES AOS ITENS DE JULGAMENTO.	27
TABELA 3	CLASSIFICAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA DAS PROPRIEDADES RURAIS.....	29
TABELA 4	REAGENTES UTILIZADOS PARA O PREPARO DA SOLUÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DE PCR.....	33
TABELA 5	CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES RURAIS ESTUDADAS NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ-2006.....	38
TABELA 6	PRÁTICAS DE MANEJO ADOTADAS NAS PROPRIEDADES RURAIS NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ-2006.....	39
TABELA 7	CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES QUANTO ÀS INSTALAÇÕES E EQUIPAMENTOS DE ORDENHA-2006.....	40
TABELA 8	CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES QUANTO AOS PROCEDIMENTOS DE ORDENHA-2006.....	41
TABELA 9	DESCRIÇÃO DAS PROPRIEDADES SEGUNDO OS FATORES DE VARIAÇÃO.....	44
TABELA 10	CLASSIFICAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA DAS PROPRIEDADES RURAIS DA REGIÃO OESTE-2006, REFERENTE À ATIVIDADE LEITEIRA.....	45
TABELA 11	MÉDIAS, LIMITES DAS MÉDIAS, VALORES MÍNIMOS E MÁXIMOS E ERRO PADRÃO DAS AMOSTRAS DE LEITE DA BACIA LEITEIRA DO OESTE DO PARANÁ EM 2006 (N = 816)	46
TABELA 12	INFLUÊNCIA DOS FATORES DE VARIAÇÃO SOBRE A CONTAGEM DE MESÓFILOS, PSICOTRÓFICOS E CONTAGEM BACTERIANA TOTAL..	53
TABELA 13	CONTAGEM DE MESÓFILOS, PSICOTRÓFICOS, E CONTAGEM BACTERIANA TOTAL NAS AMOSTRAS DE LEITE CRU SEGUNDO O EFEITO DE HIGIENE AMBIENTAL (N=816).....	55
TABELA 14	CONTAGEM DE MESÓFILOS, PSICOTRÓFICOS, E CONTAGEM BACTERIANA TOTAL NAS AMOSTRAS DE LEITE CRU SEGUNDO O EFEITO DE TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO (N = 816).....	57
TABELA 15	CONTAGEM DE MESÓFILOS, PSICOTRÓFICOS, E CONTAGEM BACTERIANA TOTAL NAS AMOSTRAS DE LEITE CRU SEGUNDO O EFEITO DE HIGIENE NA ORDENHA (N = 816).....	58
TABELA 16	CONTAGEM DE MESÓFILOS, PSICOTRÓFICOS, E CONTAGEM BACTERIANA TOTAL NAS AMOSTRAS DE LEITE CRU SEGUNDO O EFEITO DE LIMPEZA DOS COPOS COLETORES (N = 816).....	59
TABELA 17	CONTAGEM DE MESÓFILOS, PSICOTRÓFICOS, E CONTAGEM BACTERIANA TOTAL NAS AMOSTRAS DE LEITE CRU SEGUNDO O EFEITO DE QUALIDADE DA ÁGUA UTILIZADA PARA A LIMPEZA DOS EQUIPAMENTOS (N = 816).....	60
TABELA 18	RESULTADOS DAS AMOSTRAS DE LEITE CRU, DIRETAMENTE DOS TANQUES REFRIGERADORES DE 34 PROPRIEDADES, EM AGAR-ALOA.....	61

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	RESULTADO DO TESTE DE PCR DA AMOSTRAGEM REALIZADA NO MÊS DE OUTUBRO/2006 COM PRIMER LL	62
FIGURA 2	RESULTADO DO TESTE DE PCR DA AMOSTRAGEM REALIZADA NO MÊS DE DEZEMBRO/2006 COM PRIMER LL	63
FIGURA 3	MAPA DO ESTADO DO PARANÁ INDICANDO A REGIÃO DE TOLEDO, ONDE FOI REALIZADO O PRESENTE ESTUDO.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALOA	Agar Listeria Otaviani-Agosti
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APCBRH	Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa
APHA	American Public Health Association
CCS	contagem de células somáticas
CBT	contagem bacteriana total
DNA	ácido desoxi-ribonucléico
ESD	estrato seco desengordurado
FDA	Food and Drug Administration
°H	graus Hortvett
IN	Instrução Normativa
PCR	reação de polimerase em cadeia
PC-PLC	fosfatidilcolina fosfolipase
PI-PCL	fosfatidilinositol específico da atividade de fosfolipase C
RBQL	Rede Brasileira Laboratórios Centralizados de Controle de Qualidade do Leite
UFC	unidades formadoras de colônias

RESUMO

As características físico-químicas e microbiológicas em leite cru produzido na região oeste do Paraná foram investigadas, bem como sua contaminação microbiológica, e correlacionadas às características tecnológicas e de segurança alimentar dos sistemas de produção empregados nas propriedades rurais localizadas nesta região. Foram estudadas 34 propriedades rurais, no período de janeiro a dezembro de 2006, com 816 amostras de leite coletadas diretamente dos tanques resfriadores ou vasilhames equivalentes. Os fatores de variação observados foram: higiene ambiental, temperatura do leite armazenado, manejo higiênico na ordenha, limpeza dos insufladores e qualidade da água utilizada para limpeza dos equipamentos de ordenha. Estes demonstraram ser significativos ($P < 0,05$), influenciando os resultados encontrados. Os parâmetros indicadores da qualidade do leite cru refrigerado encontrados foram: acidez titulável: 15,57^oD, densidade relativa: 1,029 g/mL, índice crioscópico: -0,542^oH, contagem de células somáticas: 5,73 log₁₀ células/mL, contagem bacteriana total: 5,47 log₁₀ UFC/mL, concentração de gordura: 3,72 g/100g, concentração de proteína: 3,16 g/100g, e concentração de sólidos não gordurosos: 8,43 g/100g. Do total de amostras, 29,33% estavam fora dos limites de 750.000 UFC/mL para contagem bacteriana total e 29,21% acima de 750.000 céls./mL para contagem de células somáticas. A análise microbiológica de superfície dos copos coletores das ordenhadeiras apresentou média de $9,2 \times 10^2$ UFC/mL. Em 68,75% das amostras de água utilizada para limpeza dos equipamentos de ordenha, provenientes de poços, foram isoladas colônias de coliformes termotolerantes. De 68 amostras de leite cru submetidas a pesquisa de *L. monocytogenes*, duas (2,9%) apresentaram resultado positivo em agar-Aloa com confirmação em PCR. Os resultados apresentados mostram que persistem os problemas relacionados ao leite cru refrigerado na região oeste do Paraná. Em muitas propriedades observa-se haver falta de recursos para investimento em estrutura, que viesse a resultar em melhores condições de produção.

Termos de indexação: boas práticas, leite cru, segurança alimentar

ABSTRACT

The physico-chemical and microbiological tests on raw milk produced in the western region of Paraná were investigated, and their microbiological contamination, and correlated to the technological characteristics and safety of food production systems used in rural properties located in this region. The study was effected with 34 farms in the period January to December 2006 with 816 samples of milk collected directly from the bulk tanks or equivalent containers. The factors of variation observed were: environmental hygiene, temperature of stored milk, hygienic management in milking, cleaning of the blowers and quality of water used for cleaning the milking equipment. These have been shown to be significant ($p < 0.05$), influencing the results. The indicators of the quality of refrigerated raw milk were: acidity: 15.57 °D, relative density: 1.029 g/mL, cryoscopic index: -0.542 °H, somatic cell count: 5.73 log₁₀ cells/mL, total bacterial count : 5.47 log₁₀ CFU/mL, concentration of fat: 3.72 g/100g, concentration of protein: 3.16 g/100g, and concentration of solids non fat: 8.43 g/100g. Of the total sample, 29.33% were outside the limits of 750,000 CFU/mL for total bacterial count and 29.21% over 750,000 céls./mL for somatic cell count. The microbiological analysis of surface of milking collectors cups had an average of 9.2×10^2 CFU/mL. In 68.75% of samples of water used for cleaning the milking equipment from wells, have been isolated colonies of thermotolerant coliforms. Of 68 samples of raw milk subjected to search of *L. monocytogenes*, two (2.9%) showed positive result in ALOA-agar with confirmation in PCR. The results showed persistent problems related to raw milk refrigerated in the western region of Paraná. In many farms there was a shortage of resources for investment in infrastructure, which would result in better production conditions.

Key words: food safety, good practices, raw milk

1 INTRODUÇÃO

O leite é um alimento fundamental nas diversas faixas etárias, consumido sob diversas apresentações. Devido ao seu valor nutricional, à diversidade de produtos e à sua presença nas mesas de praticamente todas as famílias brasileiras, a cadeia produtiva do leite deve ser organizada com muita responsabilidade. Os produtores rurais devem ter por compromisso produzir leite de qualidade, possibilitando às indústrias a elaboração de produtos seguros, de acordo com as exigências internacionais.

O Estado do Paraná produziu 2,7 bilhões de litros de leite no ano de 2007, tendo a região oeste como a maior produtora do Estado, respondendo por 30% da produção (IPARDES-EMATER, 2008). Dos 10 municípios brasileiros que mais produzem leite, os três primeiros colocados estão no Paraná: Castro, Marechal Cândido Rondon e Toledo, localizando-se esses dois últimos na região oeste. A atividade está presente na vida de 100 mil produtores e 377 laticínios com inspeção federal, estadual e municipal. A grande maioria da produção se concentra em pequenas e médias propriedades, sendo que a agricultura familiar responde por quase 50% da produção estadual de leite (IPARDES-EMATER, 2008).

Para o setor de laticínios, o período compreendido entre 1990 e 1998, caracterizou-se por profundas transformações no setor, devido principalmente à mudança no sistema de captação do leite nas propriedades rurais, que passou do acondicionamento e transporte em latões, para o sistema a granel, em tanques rodoviários isotérmicos. Através da implantação desse sistema obteve-se como maior benefício, o transporte do leite refrigerado (SANTOS e FONSECA, 2002).

Apesar do desenvolvimento tecnológico atingido, persistem ainda graves problemas em nível de produção de leite, que depreciam a matéria prima e impedem o seu beneficiamento para consumo humano, mesmo nas regiões onde a pecuária leiteira é tradicional (OLIVEIRA e GALLO, 2008). Há importantes limitações para o correto funcionamento do sistema, dentre os quais: eletrificação rural, estrutura viária, custo do tanque refrigerador e treinamento dos produtores.

Do ponto de vista tecnológico, a qualidade da matéria prima é um dos maiores entraves ao desenvolvimento e consolidação da indústria de laticínios no

Brasil. Os critérios empregados para definir a qualidade do leite cru vêm sendo modificados para atender a demandas regulamentares oficiais, da indústria e dos consumidores e visam atender, prioritariamente, a requisitos de segurança alimentar e melhor rendimento industrial. Uma das exigências atuais da sociedade é a disponibilidade de alimentos seguros, saudáveis e nutritivos de todos os segmentos da rede de empresas, organizações, aparelhos reguladores do Estado e instituições que constituem a cadeia produtiva do leite (BRESSAN e MARTINS, 2004).

Ainda hoje nos países em desenvolvimento o leite cru provém de ordenhas extremamente contaminadas. A microbiota deste leite inclui principalmente bactérias aeróbias mesófilas, que devido a falhas nos sistemas de refrigeração, passam a constituir a população dominante.

Na região oeste do Paraná, desde 1988, quando foi elaborado o “Plano Técnico para a Produção de Leite”, grandes mudanças passaram a ser observadas, com relação ao avanço tecnológico dos produtores. A bacia leiteira da região oeste passou a ser a maior do Estado, com um rebanho melhorado geneticamente, com ênfase para a alimentação e a nutrição, e com a implantação do sistema de coleta do leite em tanques rodoviários isotérmicos, que trouxe como consequência direta a necessidade de refrigeração do leite nas propriedades (HARTMANN, 1992).

O segmento produtivo do leite no Brasil está em busca da melhoria da qualidade dos produtos, porém encontra barreiras estabelecidas pela alta carga bacteriana presente no leite produzido, deficiências no sistema de refrigeração, longas distâncias percorridas com o leite cru, altas temperaturas ambientes e falhas nos cuidados com higiene ao longo da cadeia de produção.

A partir do ano 2000 a cadeia produtiva do leite no Brasil passou a se organizar com a finalidade de contribuir para a re-edição da legislação sobre as análises do leite cru, que até então seguiam o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura, editado em 1952. Como resultado, foi editada a Instrução Normativa 51/2002 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que dispõe sobre o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado, Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Pasteurizado, e

Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite tipo A, B e Leite Pasteurizado. Este fato gerou a maior transformação no sentido da modernização do setor produtivo do leite no Brasil. O limite estabelecido por essa nova legislação, apesar de brando sob o ponto de vista técnico, está sendo de difícil assimilação por parte dos produtores rurais, devido às limitações inerentes à área rural.

1.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ocorrência de contaminação microbiológica no leite cru refrigerado produzido no oeste do Paraná, com especial interesse na presença de *Listeria monocytogenes*, e correlacionar as características tecnológicas e de segurança alimentar dos sistemas de produção empregados nas propriedades rurais localizadas nesta região.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- caracterizar as propriedades rurais, através da visitação *in loco* e da coleta de informações;
- realizar análise microbiológica da água utilizada para limpeza dos equipamentos de ordenha nas propriedades rurais estudadas;
- analisar as variações da contagem de mesófilos, psicrotróficos e contagem bacteriana total no leite cru refrigerado em função de: higiene ambiental, temperatura do leite armazenado, práticas de higiene na ordenha, análise microbiológica de superfície e qualidade da água utilizada para lavar os equipamentos de ordenha;
- verificar a qualidade do leite obtido tendo em vista os critérios estabelecidos pela legislação em vigor (I.N. 51/2002), através das análises de: acidez titulável, densidade, índice crioscópico, concentração de matéria gorda, proteína e sólidos não gordurosos, contagem bacteriana total e contagem de células somáticas, e pesquisa de resíduos de antibióticos;

- investigar a presença de contaminação por *Listeria monocytogenes* em amostras de leite de tanques;
- correlacionar as características de produção com a contaminação do leite, através dos parâmetros verificados, e agrupar em um modelo único as que apresentem significância estatística no teste de médias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O *Food and Drug Administration* (FDA) tem alertado repetidamente aos consumidores sobre os perigos relacionados ao consumo de leite cru, associados a listeriose (FDA, 2007). *Listeria monocytogenes* é um patógeno emergente, apresenta contínua adaptação ao meio, e aparece freqüentemente relacionada a surtos de infecções alimentares (CHEN et al., 2003; FDA, 2008). Tendo em vista sua importância em relação à segurança alimentar, em outros países há planos governamentais específicos para reduzir os riscos de surtos alimentares causados por *L. monocytogenes* (FDA, 2005a).

De acordo com FREITAS (2008), o consumo de leite sem inspeção no Brasil, é da ordem de 30%. No Estado do Paraná, estima-se que o consumo de leite informal é de 40%, sendo 15% consumidos na própria fazenda produtora e 25% sob a forma de venda informal no varejo (FAEP, 2004). Assim, constitui-se uma grande preocupação, devido aos surtos alimentares serem associados ao consumo de leite cru, queijos (particularmente queijos moles) e leite pasteurizado (SUTHERLAND et al., 2003; BULL et al., 2005).

2.1 IDENTIFICAÇÃO DE *Listeria monocytogenes*

A diferenciação laboratorial entre espécies de *Listeria* pode ser realizada através da observação de hemólise em ágar-sangue, do teste de CAMP (Christie, Atkins e Munch-Petersen), e da produção de ácidos a partir de açúcares (QUINN et al., 2007).

2.1.1 Em meio de cultura

O meio agar-ALOA (Agar *Listeria* Ottaviani–Agosti)¹ usado para identificação laboratorial de *Listeria monocytogenes* é baseado na detecção de fosfatidilinositol específico da atividade de fosfolipase C (PI-PLC) da *L. monocytogenes* (HITCHINS, 2003). As fosfolipases de *L. monocytogenes* são determinantes essenciais de

¹ peptona de carne, triptona, extrato de levedura, piruvato de sódio, glicose, glicerolfosfato de magnésio, sulfato de magnésio, cloreto de sódio, cloreto de lítio, fosfato anidro dissódico hidrogenado, 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-glicopiranosídeo e agar

patogenicidade e a atividade de PI-PLC é expressa somente para *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* patogênicas, e tem sido utilizada como marcador para diferenciação entre espécies de *Listeria* patogênicas e não patogênicas. Desta forma, o meio agar-ALOA tem demonstrado excelentes resultados na diferenciação de *L. monocytogenes* de outras espécies de *Listeria* não patogênicas (AURORA et al., 2008). No meio agar-ALOA todas *Listeria spp.* formam colônias verde-azul devido à presença de um composto cromogênico, a x-glicosidase, que detecta β -glicosidase presente em todas as espécies do gênero *Listeria*. *Listeria spp.* patogênica pode ser diferenciada de outras *Listeria spp.* não patogênicas através da produção de PI-PLC, que é detectado pela formação de halos opacos ao redor das colônias (AURORA et al., 2008).

2.1.2 Reação de polimerase em cadeia (PCR)

A técnica de reação da polimerase em cadeia, também chamada *polimerase chain reaction* (PCR) passou a ter um grande impacto nas análises moleculares, desde a sua divulgação (GASANOV, 2004).

Com esta técnica é possível multiplicar um único fragmento de DNA para milhões de cópias de si mesmo em poucas horas. A multiplicação é exponencial e é catalisada pela enzima DNA polimerase que, tendo um segmento de DNA de fita simples como molde, é capaz de construir a fita complementar a esse segmento, através da polimerização de nucleotídeos adicionados ao sistema. O início da cópia se dá a partir de um oligonucleotídeo iniciador (*primer*) complementar à extremidade do fragmento de DNA a ser copiado. De forma geral, na metodologia do PCR, cada ciclo envolve três passos: desnaturação do DNA dupla fita e separação em fitas simples (95° C por um minuto); ligação dos oligonucleotídeos iniciadores (37°- 50°C por dois minutos), e polimerização com formação da fita complementar (72° C por três minutos). Sintetizada a primeira cópia, o processo recomeça. O mesmo pode se repetir até 20 a 30 vezes, permitindo uma amplificação para até 10⁵ a 10⁶ cópias de cada fragmento de DNA original (GOWS e LIEDEMANN, 2005).

A polimerase utilizada nesses testes (Taq DNA polimerase) é termorresistente, o que permite que todas essas etapas sejam realizadas em um

único recipiente: basta adicionar todos os componentes necessários e variar apenas a temperatura. Aparelhos de alta sensibilidade e rápido ajuste de temperatura, chamados termocicladores, foram especialmente desenvolvidos para as técnicas de PCR (FRANCO e LANDGRAF, 2005). As colônias de *L. monocytogenes* podem ser identificadas através da utilização dos procedimentos de PCR com a amplificação de uma seqüência específica de DNA do gene da listeriolisina (*hlyA*). O *primer* utilizado na reação de PCR é altamente específico para *L. monocytogenes* e não amplifica o DNA presente em nenhuma outra espécie de *Listeria* ou de outros microrganismos. O fragmento de DNA *hlyA* amplificado possui tamanho molecular específico, e é identificado através da eletroforese em gel agarose (BLAIS e PHILLIPPE, 2002).

2.2 *Listeria monocytogenes*

Dentre as seis espécies que constituem o gênero *Listeria*, três são patogênicas. *Listeria monocytogenes*, o mais importante desses patógenos, tem sido implicado em doenças de humanos e animais no mundo todo. Pertence ao grupo de bacilos Gram-positivos, se move por meio de flagelos, é suscetível aos desinfetantes comuns mas fortemente resistente à desidratação, ao congelamento e descongelamento, e pode ainda sobreviver por meses nos alimentos, apesar de não ser esporulada. Apresenta-se como bacilos pequenos, microaerófilos ou aeróbios facultativos, capazes de se multiplicar em temperatura de refrigeração. Em humanos, causa septicemia, aborto, endocardite, conjuntivite, meningoencefalite, meningite e encefalite, infecções urinárias, e outras enfermidades (DIMAIO, 2000). Pode crescer em condições de anaerobiose, e sobreviver à pasteurização, pois tem localização intracelular e é tolerante ao calor (QUINN et al., 2007; LIU, 2006; FDA, 2007). Em animais, vários casos de mastite bovina devido a este microrganismo têm sido relatados. Leite de vaca não pasteurizado pode conter o microrganismo e é uma fonte potencial de infecções humanas (CARTER et al., 1995). *Listeria monocytogenes* apresenta crescimento dentro de uma grande margem de temperatura, na faixa de 2,5°C a 44°C, embora existam relatos sobre o crescimento a 0°C. Pode tolerar valores de pH entre 5,5 e 9,6. O tempo de geração em leite cru a 4°C é de 25,3 horas, e a 15°C é de 7,4 horas (QUINN et al., 2007; FDA, 2005b).

Apresenta reação catalase positiva e oxidase negativa; expressa beta-hemolisina, produzindo uma zona de clareamento em agar sangue. Produz ácido por fermentação de glicose, frutose, manose, galactose, celobiose, maltose, melezitose, trealose e ramnose, sem formação de gás; hidrolisa esulina, salicina, amigdalina e hipurato de sódio; apresenta teste vermelho metil positivo; produz amônia a partir da arginina; reage negativamente para produção de sulfeto de hidrogeno, indol e nitrato redutase; hidrolisa gelatina, amido e uréia, reduz telurito; e é parcialmente inibida por 0,02% de azida e cianida (JAY, 2005). A diferenciação entre as espécies de *Listeria spp.* geralmente é realizada pela produção de hemolisina, incluindo o teste de Christie, Atkins e Munch-Petersen (CAMP), pela produção de ácido a partir de D-xilose, L-ramnose e manitol, e pela atividade hemolítica (BUSSE, 2000). No entanto, testes mais rápidos e de grande sensibilidade e especificidade para a diferenciação de *L. monocytogenes* das outras espécies de *Listeria* são essenciais para o efetivo controle da listeriose (LIU, 2006). Os outros dois patógenos, *L. ivanovii* e *L. innocua*, estão menos freqüentemente implicados em veiculação de doenças através de produtos de origem animal. Espécies de *Listeria* podem replicar-se no meio ambiente. Estão amplamente distribuídas e podem ser recuperadas de pastagens, fezes de animais saudáveis, efluentes e corpos d'água (QUINN et al., 2007).

2.2.1 Características da doença

A listeriose é claramente diagnosticada quando o organismo é isolado de sangue, fluido cérebro-espinhal, ou de outros órgãos e organismos normalmente estéreis, como por exemplo, placenta e feto (FDA, 2007).

O intestino humano é o ponto de entrada de *L. monocytogenes* no organismo, através das células epiteliais do ápice das microvilosidades. Elas difundem-se, então, não só pelo interior desta célula como também de uma célula para outra. Na fase seguinte, são fagocitadas por macrófagos, mas tal fato não induz a uma resposta inflamatória significativa. As células de *L. monocytogenes*, uma vez dentro dos macrófagos, encontram-se protegidas dos leucócitos polimorfonucleares. Cepas virulentas são capazes de se multiplicar em macrófagos, rompendo estas células e produzindo septicemia. Quando isto ocorre, os microrganismos podem atingir outras

áreas do organismo, podendo envolver o sistema nervoso central, o coração e outros órgãos e sistemas. Em mulheres grávidas pode haver a invasão do feto e, dependendo do estágio em que a gravidez se encontra, pode ocorrer aborto, parto prematuro, nascimento de natimorto ou haver septicemia neonatal. Quando um recém-nascido é infectado no momento do parto, os sintomas típicos de listeriose são de meningite. Essa sintomatologia tem início de quatro dias a quatro semanas após o nascimento. Na fase entérica a sintomatologia é semelhante à da gripe, acompanhada de diarreia e febre moderada. Em casos de bacteremia por *L. monocytogenes* em adultos, o sintoma mais comum é febre moderada, fadiga, mal-estar, podendo haver também vômitos e diarreia. Quando há comprometimento do sistema nervoso central, a principal manifestação é meningite, encefalite e abscessos. Nesses casos, o desenvolvimento clínico é fulminante, com mortalidade de aproximadamente 70% em recém-nascidos e idosos (MCLAUCHLIN et al., 2004; FRANCO e LANDGRAF, 2005).

O principal grupo de risco é constituído por mulheres gestantes, pessoas imunocomprometidas, pacientes diabéticos, asmáticos, e mesmo pessoas normais, aparentemente saudáveis, que tenham contato com alimentos contaminados (FDA, 2007).

2.2.2 Mecanismo de patogenicidade

Segundo Franco e Landgraf (2005), após entrar no organismo hospedeiro pela via oral, *L. monocytogenes* atinge o trato intestinal aderindo e invadindo a mucosa. Em seguida, a célula bacteriana é fagocitada por macrófagos. Após a lise da membrana fagocítica, é liberada no citoplasma da célula do hospedeiro, onde se multiplica rapidamente.

Vários são os fatores de virulência que explicam o mecanismo de patogenicidade de *L. monocytogenes*. Dentre eles:

- *Listeriolisina O (LLO)*. A hemolisina produzida por *L. monocytogenes* é sem dúvida o melhor determinante da patogenicidade desta espécie bacteriana. Sua função é mediar a lise dos vacúolos que contêm a célula bacteriana, uma vez que células mutantes não produtoras de listeriolisina são geralmente

encontradas no interior destes vacúolos sendo, conseqüentemente, incapazes de se multiplicar intracelularmente. Listeriolisina O é considerada como um dos fatores de virulência, pois permite à bactéria o acesso ao citoplasma.

- *Fosfolipases.* *Listeria monocytogenes* produz pelo menos outras duas hemolisinas, além da listeriolisina: a fosfatidilinositol-fosfolipase C (PI-PLC) e a fosfatidilcolina fosfolipase C (PC-PLC), também conhecida como lecitina. Diferentemente da listeriolisina que lisa as células do hospedeiro através da formação de poros na membrana, as fosfolipases hidrolisam os lipídeos da membrana, tais como o fosfatidilinositol e fosfatidilcolina, causando a ruptura da célula.
- *P60.* Todas as cepas de *L. monocytogenes* secretam essa proteína, que tem peso molecular de 60kDa, como principal produto extracelular. Esta proteína parece estar associada à capacidade invasiva da bactéria, uma vez que está envolvida com a fagocitose de *L. monocytogenes*.
- *Internalina.* É uma proteína envolvida no mecanismo de invasão da célula do hospedeiro.

O fato de *L. monocytogenes* produzir fosfatidilinositol-fosfolipase C (PI-PLC) se traduz em grande importância para o diagnóstico laboratorial, devido à formação de halos opacos ao redor das colônias em meio ALOA (AURORA et al., 2008).

2.2.3 Epidemiologia

Listeria monocytogenes pode entrar na cadeia alimentar através do leite e das fezes dos animais devido à sua capacidade de resistência às condições adversas do meio (CHAN et al., 2007). Estudando fazendas leiteiras na Espanha, Vilar et al. (2007) isolaram *L. monocytogenes* em amostras de leite cru de tanques refrigeradores, amostras de fezes de vacas em lactação e amostras de silagem, respectivamente, 6,1; 9,3 e 6,0%. O sistema de ordenha e o inadequado controle de entrada das vacas infectadas com mastite na sala de ordenha também foram

significativos para o aumento da contaminação por *L. monocytogenes* nas amostras de leite do tanque.

Nas propriedades rurais, *L. monocytogenes* pode se replicar no meio ambiente, e está amplamente distribuída em pastagens, fezes de animais e cursos d'água. A preocupação com essas bactérias em alimentos de consumo humano, especificamente o leite, se deve a sua habilidade de crescer em temperaturas de refrigeração, sob condições de anaerobiose, e poder sobreviver à pasteurização, quando realizada inadequadamente (QUINN et al., 2007), podendo se transformar em um fator de risco potencial para a segurança alimentar (CHEN et al., 2003). Surtos de listeriose devido a produtos lácteos têm apresentado importantes implicações na área de saúde dos consumidores na Europa, Canadá e Estados Unidos (LUNDEN, 2004; CDC, 2008).

Diversos surtos de alta gravidade já foram registrados, como o do Canadá em 1985, o da Filadélfia (E.U.A.) em 1987, e o de Massachussets (E.U.A.) em 2007 com altos índices de mortalidade, e muitos deles tendo origem em leite pasteurizado e em queijos, onde o microrganismo pode se multiplicar mesmo em baixas temperaturas (FDA, 2007; CDC, 2008). Segundo o CDC (Centers for Disease Control and Prevention), órgão do governo americano ligado ao HHS (Department of Health and Human Service), cerca de 2,5 mil casos de listeriose são registrados anualmente nos Estados Unidos, sendo que 90% deles levam a hospitalizações e 20% a óbitos (CDC, 2008). No Brasil não há estatísticas oficiais sobre casos de listeriose, pois sua notificação não é obrigatória.

Estudando 65 amostras de gelados comestíveis caseiros e de origem comercial na Costa Rica, Windrantz e Arias (2000) isolaram *L. monocytogenes* em 8 amostras (12,3%). A prevalência de *L. monocytogenes* em queijos elaborados com leite cru relatada na Inglaterra em 2004 foi de 0,9%; na Bélgica em 2001 foi de 46,7%; e na Suécia em 1994 foi de 42% (LITTLE et al., 2008). Recentemente, Koseki et al. (2007) desenvolveram estudos sobre a utilização de alta pressão no processamento do leite para obter a inativação de *L. monocytogenes* durante o armazenamento.

2.2.4 Medidas de controle

Uma vez que esta bactéria encontra-se amplamente distribuída na natureza (solo, água, vegetais, animais, insetos, seres humanos), deve-se prevenir sua entrada no ambiente da indústria de alimentos. Para tanto, deve-se fazer o controle do microrganismo nos pontos de origem da matéria prima através de medidas que minimizem as chances de contaminação (FRANCO e LANDGRAF, 2005). Estas medidas compreendem: higiene geral na propriedade rural, eliminação de áreas de acúmulo de barro e dejetos, limpeza na sala de ordenha, higienização correta dos equipamentos de ordenha, hierarquização da entrada das vacas na sala de ordenha, manejo higiênico da ordenha e atenção especial aos casos de infecções mamárias (MÜLLER, 2002).

2.3 REGULAMENTAÇÃO SOBRE *L. monocytogenes* EM ALIMENTOS

Alguns países estabeleceram limites legais para o número de microrganismos permitidos em alimentos, especialmente para os produtos prontos para o consumo. Destes, o governo dos Estados Unidos é o que tem a legislação mais rígida, na qual *L. monocytogenes* tem sido considerada como um adulterante. Qualquer alimento que contenha esse microrganismo pode ser considerado adulterado, e deve ser recolhido para substituição. O requerimento é a ausência do microrganismo em amostras de 50 g. Na comunidade europeia também foi estabelecida tolerância zero em queijos moles e ausência em 1 g para os demais produtos (JAY, 2005). No Brasil, listeriose não é enfermidade de notificação obrigatória.

Produtos lácteos constituem um importante veículo de *L. monocytogenes* causando surtos de listeriose relatados em diversos países. Leite cru e produtos de leite cru estão claramente ligados aos fatores de risco e portanto, informações sobre os riscos do consumo de leite não pasteurizado devem ser veiculadas continuamente. Os riscos da contaminação pós-processamento também devem ser observados (LUNDEN et al., 2004).

2.4 FATORES QUE INFLUENCIAM A QUALIDADE DO LEITE CRU

O conhecimento dos fatores que agem sobre determinado alimento permite prever sua estabilidade microbiológica, bem como conhecer a capacidade de crescimento de microrganismos patogênicos eventualmente presentes (FRANCO e LANDGRAF, 2005). A qualidade microbiológica do leite cru varia de acordo com diversos fatores extrínsecos, tais como higiene ambiental, temperatura do leite armazenado, práticas de higiene na ordenha, análise microbiológica de superfície e qualidade da água utilizada para lavar os equipamentos de ordenha (NEIVA e NEIVA, 2006; HARVEY et al., 2007; VANEGAS et al., 2009).

2.4.1 Higiene ambiental

As propriedades leiteiras diferem entre si quanto ao grau de limpeza geral. Este fator é intrínseco a cada produtor. A manutenção dos animais em ambientes higiênicos, secos e confortáveis tem como objetivo em primeiro plano minimizar os problemas relativos às mastites ambientais, mas indiretamente tem reflexo nos índices de mastite contagiosa. Animais com presença de sujidades no úbere exigem maiores cuidados por ocasião da ordenha. Deve ser dada atenção especial às instalações para vacas secas, novilhas e vacas em lactação como piquetes, sombreamento, dimensão correta das instalações nos diferentes sistemas de confinamento, natureza da cama e baias ou piquetes de parição (MÜLLER, 2002).

Para esta avaliação, deve-se observar criteriosamente: destino das águas residuárias e dejetos, presença excessiva de moscas, formação de barro, acúmulo de dejetos, limpeza dos animais. Fatores de manejo como a correta secagem das vacas antes do parto, prevenção da mastite ambiental, não permitir ordenha incompleta nem sobre-ordenha, desprezar os primeiros jatos, manter a higiene correta da linha de canalização do leite, refrigeração imediata, e outras práticas, diferenciam os produtores (NEIVA e NEIVA, 2006).

As pessoas que colhem, manipulam, armazenam, transportam, processam ou preparam alimentos são muitas vezes responsáveis por sua contaminação. Todo manipulador pode transferir microrganismos patogênicos a qualquer tipo de alimento, mas isso pode ser evitado através de higiene pessoal, comportamento e manipulação adequada (INPAAZ, 2001).

2.4.2 Temperatura de armazenamento do leite

A refrigeração do leite nas propriedades rurais tem adquirido grande importância para as indústrias de laticínios principalmente após a implantação do sistema de coleta em tanques rodoviários isotérmicos. O binômio tempo x temperatura de permanência é o principal responsável pela multiplicação bacteriana, a partir da contagem inicial (HARTMANN et al., 2008). Nas propriedades rurais deve existir local próprio e específico para a instalação do tanque de refrigeração e armazenagem do leite, mantido sob condições adequadas de limpeza e higiene (BRASIL, 2002).

Geladeiras de uso doméstico são comumente utilizadas por produtores de pequena escala de produção. Nestas, o leite se mantém entre 8 a 12° C, constituindo-se em uma faixa de temperatura susceptível ao crescimento dos psicrotóxicos. Além disso, o leite cru fica armazenado juntamente com diversos outros alimentos de uso familiar, sujeito a contaminantes. Dentre os produtores de leite do Paraná, 11,2% utilizam geladeira para refrigeração do leite. Além disso, congeladores (*freezers* horizontais) são utilizados por um grande número de produtores no Estado (30,1%) (IPARDES-EMATER, 2008). Seu principal inconveniente é a formação de cristais de gelo, que interfere nas provas de densidade, crioscopia e gordura, bem como, provoca perdas significativas de qualidade devido à lipólise (WHITEMORE, 1981).

Refrigeradores de imersão, cuja característica é a troca de calor efetuada pelo leite em latões submersos em uma cuba com água gelada, são utilizados em 21,5% das propriedades do Paraná (IPARDES-EMATER, 2008), principalmente as de pequeno e médio porte. Refrigeradores de expansão são preconizados como o

melhor método para refrigeração do leite nas propriedades rurais, possibilitando um resfriamento mais uniforme, através da expansão de gás em câmaras internas e com agitação mecânica. Possuem temporizador, assim, quando o leite atinge 4°C, passa a ligar e desligar automaticamente em espaços regulares para manter a temperatura constante e o leite homogêneo, evitando o acúmulo de gordura na parte superior (HORST, 2006). Porém estão presentes em apenas 25,3% das propriedades produtoras de leite no Estado do Paraná (IPARDES-EMATER, 2008).

2.4.3 Práticas higiênicas utilizadas no manejo da ordenha

Segundo Fonseca e Santos (2000), o sistema utilizado pelos produtores na ordenha de suas vacas, tendo em vista a adoção das práticas preconizadas de higiene do ordenhador, da ordenhadeira, e dos utensílios, constitui-se em um importante fator a ser considerado na contagem de microrganismos.

A ordenha é o momento mais importante da atividade leiteira por possibilitar a prevenção e controle da mastite e, conseqüentemente, a melhoria da qualidade do leite. A ordenha deve ser realizada por pessoas treinadas, com tranqüilidade, obedecendo a uma rotina pré-estabelecida. As seguintes etapas são essenciais para uma ordenha correta:

- estabelecer a ordem de entrada das vacas na sala de ordenha;
- realizar o teste da caneca telada; limpeza inicial dos tetos com água clorada; imersão dos tetos em solução anti-séptica por 30 segundos (*pre-dipping*); e secagem dos tetos com papel toalha descartável.

Este conjunto de procedimentos, além de propiciar a higienização dos tetos é de fundamental importância para uma ordenha mais rápida e completa. Após terminada a ejeção de leite pela glândula mamária, é recomendado:

- retirar os insufladores; realizar a imersão dos tetos em solução anti-séptica; e promover a desinfecção dos insufladores.
- promover a correta limpeza do equipamento de ordenha. As principais etapas de limpeza do equipamento constituem-se de enxágüe com água morna (32 a 41°C),

enxágüe com água e detergente alcalino clorado (71 a 74°C), enxágüe ácido e sanificação pré-ordenha.

Em relação à instalação e manutenção do equipamento devem ser obedecidas as normas internacionais (ISO 5707-3 A) dando ênfase ao dimensionamento da bomba de vácuo, nível de vácuo, pulsação e troca de copos coletores (MULLER, 2002).

No Estado do Paraná, estima-se que aproximadamente 10,7% dos produtores não realizam procedimentos de higiene na ordenha, 75,1% o fazem inadequadamente, e apenas 14,2 realizam adequadamente (IPARDES-EMATER, 2008).

2.4.4 Limpeza dos copos coletores

A desinfecção dos insufladores por meio de imersão em solução desinfetante é uma prática que pode trazer resultados benéficos em termos de controle da mastite. No entanto essa medida apresenta limitações de ordem prática, uma vez que pode comprometer a seqüência do manejo da ordenha e gerar aumento do tempo de ordenha. A avaliação da adoção de boas práticas de ordenha nas propriedades deve ser somada à coleta de material para análise microbiológica de superfície dos equipamentos de ordenha, particularmente dos insufladores, para fornecer subsídios mensuráveis à tomada de decisões sobre as condições higiênicas relacionadas à obtenção do leite (FONSECA e SANTOS, 2000).

No Estado do Paraná, estima-se que apenas 30,8% dos produtores utilizam produtos recomendados para a desinfecção dos equipamentos de ordenha (IPARDES-EMATER, 2008).

2.4.5 Qualidade da água utilizada na higienização dos equipamentos de ordenha

A grande maioria das fazendas leiteiras utiliza fontes de água durante o processo de produção leiteira, que não sofrem nenhum tipo de tratamento prévio. Essas fontes podem estar contaminadas com microrganismos de origem fecal e de uma ampla variedade de fontes como solo e vegetação. Se ocorrer a utilização

dessas fontes de água para limpeza dos equipamentos de ordenha, esses microrganismos terão pouco efeito imediato sobre a carga bacteriana total do leite, no entanto, pode ocorrer intensa multiplicação desses microrganismos em resíduos de leite no equipamento de ordenha. O uso de água não tratada para enxágüe final do equipamento de ordenha pode contribuir para o aumento na contagem bacteriana no leite (FONSECA e SANTOS, 2000; CHAPAVAL e PIEKARSKI, 2000).

A detecção dos agentes patogênicos, principalmente bactérias, protozoários e vírus, em uma amostra de água é extremamente difícil, em razão de suas baixas concentrações. Portanto, a determinação da potencialidade de um corpo d'água ser portador de agentes causadores de doenças pode ser feita de forma indireta, através dos organismos indicadores de contaminação fecal do grupo dos coliformes. Os coliformes estão presentes em grandes quantidades nas fezes do ser humano e dos animais de sangue quente. A presença de coliformes na água não representa, por si só, um perigo à saúde, mas indica a possível presença de outros organismos causadores de problemas à saúde. Os principais indicadores de contaminação fecal são as concentrações de coliformes termotolerantes, expressa em número de organismos por 100 mL de água. Está regulamentado (portaria nº. 36 do Ministério da Saúde, 1990) que a população de microrganismos mesófilos aeróbios deve ser inferior a 500 UFC/mL de água e que deve haver ausência de coliformes termotolerantes em 100 mL (NEIVA e NEIVA, 2006).

No Estado do Paraná, aproximadamente 8,7% dos produtores utilizam água de rede pública, 20,5% de poço convencional, 11,1% utilizam água de poço artesiano, e 59,8%, água de nascentes, córregos, rios ou açudes (IPARDES-EMATER, 2008).

2.5 PARÂMETROS UTILIZADOS PARA A AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO LEITE CRU

No Brasil, a produção de leite de qualidade tem sido um desafio para produtores, técnicos e indústrias, tendo em vista as exigências dos consumidores nacionais e as perspectivas de busca de mercados internacionais. Estes fatos levaram o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento a estabelecer o

padrão para o leite cru refrigerado através da Instrução Normativa 51/2002 (BRASIL, 2002). Esta prevê os seguintes parâmetros para avaliar a qualidade do leite cru refrigerado:

- Acidez titulável: de 0,14 a 0,18 g de ácido láctico por 100 mL,
- Densidade relativa a 15°C: entre 1,028 e 1,034 g/cm³,
- Índice crioscópico máximo: – 0,512° C, o que equivale a – 0,530° H,
- Matéria gorda: mínimo de 3,0 g/100 g,
- Proteína: mínimo de 2,9 g/100g,
- Extrato seco desengordurado ou sólidos não gordurosos: mínimo 8,4 g/100 g,
- Contagem de células somáticas: máximo de 1,0 x 10⁶ células/mL até o mês de julho/2008, e 7,5 x 10⁵ células/mL de agosto/2008 a julho/2011;
- Contagem bacteriana total: 1,0 x 10⁶ UFC/mL até o mês de julho/2008, e 7,5 x 10⁵ UFC/mL de agosto/2008 a julho/2011.

E de acordo com a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), os seguintes resíduos de antibióticos no leite também devem ser monitorados:

- Limites máximos de resíduos de antibióticos do grupo dos beta-lactâmicos: < 0,05 UI penicilina/mL; < 10 ppb ampicilina/litro; < 10 ppb amoxicilina/litro; < 10 ppb cloxacilina/litro; < 10 ppb cephapirina/litro; < 10 ppb ceftiofur/litro (ANVISA, 2005).

2.5.1 Contagem de microrganismos mesófilos e psicotróficos

O grupo dos mesófilos inclui bactérias que têm temperatura ótima de crescimento compreendida entre 20°C e 45°C (SANTOS e FONSECA, 2001). Todas as bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas. Portanto, uma alta contagem de mesófilos, significa que houve condições para que esses patógenos se multiplicassem (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

As normas da *International Dairy Federation (IDF)* definem os psicotróficos como sendo os microrganismos que apresentam temperatura ótima de crescimento entre 20 e 40° C, mas que podem crescer a 7° C ou menos, e por isso, traduzem-se de grande importância nos sistemas de refrigeração e permanência do leite cru nas propriedades rurais ou em postos de refrigeração. Os psicotróficos não constituem um grupo taxonômico específico de microrganismos, apresentando aproximadamente 15 gêneros diferentes que foram isolados do leite e produtos derivados. Estes gêneros são compostos por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bacilos, cocos, víbrios, formadores ou não de esporos; assim como microrganismos aeróbios e anaeróbios. Alguns gêneros de bolores e leveduras também apresentam características do grupo dos psicotróficos e podem causar problemas na qualidade do leite (SANTOS e FONSECA, 2001). As bactérias psicotróficas predominam em situações em que há deficiência de higiene na ordenha, problemas de limpeza e sanitização do equipamento de ordenha associados com refrigeração marginal do leite (refrigeração à temperatura entre 5 a 15° C), ou quando o tempo de permanência do leite cru é demasiadamente longo (SANTOS e FONSECA, 2002).

2.6 A BACIA LEITEIRA DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ

A microrregião de Toledo/Marechal Cândido Rondon (Apêndice 1), no oeste paranaense, objeto de estudo deste trabalho, destaca-se como a quarta maior produtora de leite e derivados do país, tendo produzido 319 milhões de litros de leite no ano de 2007 (SECRETARIA DA AGRICULTURA, 2008). Esta região constitui a maior bacia leiteira do estado do Paraná, com solos férteis, onde a pecuária compete em espaço com a agricultura. Em consequência, são grandes as distâncias percorridas diariamente pelos tanques rodoviários, que realizam a captação do leite. Observa-se que predominam os pequenos produtores, assim, em 2006, dos 18.600 produtores de leite da região, 38,9% produziam menos de 50 litros de leite por dia; 25,4% entre 51 a 100; 25,9% entre 101 a 250; 6,2% de 251 a 400; e 3,42% acima de 401 litros (BRAGA et al., 2006).

Segundo dados do IPARDES-EMATER (2008), ainda há um grande número de produtores (36%) que utilizam sistemas não recomendados para a refrigeração do leite cru nas suas propriedades (Tabela 1).

Nesta região, as temperaturas ambientais médias mínimas e máximas no inverno são de 11,2 e 20,9°C, respectivamente, caracterizando clima subtropical mesotérmico superúmido. Na primavera, as temperaturas médias oscilam entre 12,5 a 26°C, e no verão entre 18,5 a 28°C (KOEHLER, 2001). Nessas condições, o rápido resfriamento do leite imediatamente após a sua obtenção é considerado de importância fundamental para a preservação da sua qualidade (HARTMANN et al., 2008).

TABELA 1: ESTIMATIVA DE PRODUTORES SEGUNDO O PRINCIPAL MÉTODO DE ARMAZENAMENTO DO LEITE POR REGIÃO NO ESTADO DO PARANÁ – OUTUBRO, 2007

PARANÁ E REGIÕES	PRODUTORES	PRINCIPAL LOCAL DE ARMAZENAMENTO DO LEITE (%)				
		latão	geladeira	Freezer comum	Refrigerador imersão	Refrigerador expansão
Ponta Grossa	2.243	9,4	7,6	6,3	7,9	68,8
Oeste	20.731	3,1	10,6	25,4	34,5	26,4
Sudoeste	25.343	0,8	11,0	49,8	24,7	13,6
Demais regiões	51.256	21,2	11,6	23,4	15,1	28,7
Paraná	99.573	11,9	11,2	30,1	21,5	25,3

FONTE: IPARDES-EMATER (2008)

A composição genética do rebanho na região oeste é de vacas da raça Holandesa (49,5%), Jersey (12,2%), Pardo-Suiço (5,8%), Girolanda (13%) e mestiços (19,5%). O parque industrial apresenta-se com capacidade instalada para processar 1.758.600 litros de leite/dia, ou proporcionalmente a 22,2% do total da capacidade instalada dos laticínios no estado (SECRETARIA DA AGRICULTURA, 2008).

Em Marechal Cândido Rondon, localiza-se a mais moderna Fábrica de Queijos do Estado, que produz os queijos mussarela, prato, parmesão e provolone; leite fluído longa vida, iogurte, bebidas lácteas, manteiga e leite condensado. A partir de

1990, diversas iniciativas foram adotadas por parte das indústrias de laticínios, que contribuíram decisivamente para o crescimento da atividade leiteira na região: o melhoramento genético através da inseminação artificial; o financiamento de tanques refrigeradores, equipamentos de ordenha, e implementos para silagem e fenação; treinamentos para produtores, dias de campo, viagens técnicas; incentivo financeiro para os melhores produtores em quantidade e qualidade; e a implantação do sistema de coleta do leite em tanques rodoviários (PORTUGAL e BOTELHO, 2000).

2.7 BOAS PRÁTICAS DE PRODUÇÃO

O Guia para Boas Práticas em Fazendas Leiteiras constitui um conjunto de medidas publicadas por iniciativa da International Dairy Federation (2004). Tendo em vista os procedimentos adotados nas indústrias, procura-se desta forma estabelecer critérios que auxiliem aos produtores e às assessorias técnicas no estabelecimento de procedimentos que visem melhorar a produção, atendendo as exigências de qualidade por parte das cadeias internacionais de varejo que incluem, além dos critérios usuais de composição, higiene e segurança, outros aspectos do processo produtivo, como o respeito ao ambiente, as adequadas condições de trabalho, higiene e saúde dos trabalhadores. Devido às particularidades regionais, não há adoção de um critério, isto é, as diretrizes são amplas e não definitivas. Recomenda-se a formação de uma equipe de trabalho, para a elaboração de um Manual de Boas Práticas para cada propriedade.

As potenciais vantagens para os produtores que implantam esses programas são o aumento da competitividade, o oferecimento de produtos diferenciados e a maior garantia de permanência dos mercados. Para os consumidores, a principal vantagem é a garantia de alimentos seguros e de alta qualidade. Durante os últimos anos, várias empresas captadoras e cooperativas em diversos países do mundo têm desenvolvido programas de qualidade, os quais têm como base a aplicação de medidas nas fazendas leiteiras para a garantia da segurança dos derivados lácteos. Esses programas buscam melhorias nas seguintes áreas dentro das fazendas leiteiras: a) saúde animal, b) higiene de ordenha, c) alimentação animal e fornecimento de água, d) bem estar animal, e) ambiente. A implantação de

programas de Boas Práticas na Agricultura tem sido incentivada por várias entidades e por força de legislação em algumas indústrias de alimentos (SANTOS, 2007). Os primeiros programas estão sendo timidamente implantados, em trabalhos desenvolvidos por indústrias e universidades. Tendo em vista o universo da produção brasileira de leite, os programas atuais ainda não têm significância numérica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido na bacia leiteira da região oeste do Paraná, nos municípios de Toledo, Marechal Cândido Rondon, Mercedes, Quatro Pontes, Entre Rios do Oeste e Pato Bragado.

As amostras de leite foram coletadas diretamente nos tanques refrigeradores ou recipientes nas propriedades rurais, acompanhando a coleta de amostras realizada pelos caminhões de transporte de leite, de janeiro a dezembro de 2006.

Nas mesmas datas, foram acompanhadas as ordenhas com a finalidade de se observar os procedimentos utilizados pelos produtores e a higiene geral das propriedades, utilizando-se como referência o Manual de Boas Práticas de Produção (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 2004).

3.1 MATERIAL

3.1.1 Caracterização das propriedades

Dos produtores da região, 34 foram escolhidos aleatoriamente, representativos dos produtores desta bacia leiteira, pelos seguintes critérios:

- disponibilidade de colaborar com o presente estudo;
- atuar profissionalmente na atividade leiteira;
- distribuição em toda a área geográfica do estudo;
- não possuir histórico de adulterações na produção;
- representar o perfil dos produtores da região.

3.1.1.1 Verificação das propriedades *in loco*

Nas visitas realizadas às propriedades, foram verificadas:

- a) as condições de higiene ambiental: foi observada a existência de áreas de acúmulo de barro, condições das cercas, local de pernoite das vacas em ordenha, destino dos dejetos e controle de moscas, em consonância com

o Manual de Boas Práticas de Produção, reconhecido internacionalmente (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 2004);

- b) a temperatura do leite armazenado nos refrigeradores;
- c) as condições de higiene dos procedimentos de ordenha: a ordem de entrada das vacas segundo o *status* de saúde da glândula mamária, a lavagem dos tetos e posterior secagem com toalhas individuais descartáveis, o teste da caneca telada após desprezar os primeiros jatos, a ordenha completa e finalmente o *pos-dipping* (pós-imersão dos tetos). Nas propriedades com ordenha manual foi observada a higiene pessoal do responsável por esta tarefa. Nas propriedades com ordenhadeira mecânica foi observada a correta realização da lavagem dos equipamentos de ordenha. Estas observações foram realizadas conforme recomendações do Manual de Boas Práticas de Produção (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 2004);

3.1.2 Instrumento de coleta de dados

Nas visitas às propriedades, que foram realizadas durante as ordenhas, foram verificados os seguintes aspectos:

- Sistema de criação dos animais: extensivo, semi-intensivo, intensivo.
- Local de permanência das vacas durante o período da noite: no pasto, no estábulo.
- Fornecimento de silagem de milho às vacas em produção.
- Existência de vacas deitadas em área de formação de barro na propriedade.
- Condições de limpeza dos úberes das vacas ao entrarem na sala de ordenha: limpos, intermediários, sujos com barro.
- Realização do teste preventivo do caneco de fundo preto.
- Limpeza dos tetos antes da ordenha com água clorada em todas as ordenhas
- Realização do *pre-dipping* (pré-imersão dos tetos) com solução antisséptica antes da ordenha.

- Secagem dos tetos antes da ordenha.
- Realização do *pos-dipping* (pós-imersão dos tetos) com solução antisséptica após a ordenha.
- Destino correto dos dejetos e águas residuárias.
- Origem da água utilizada para lavar os equipamentos de ordenha e utensílios.
- Sistema utilizado para o refrigeração do leite: tanque refrigerador de expansão direta, refrigerador de imersão em água gelada, geladeira residencial, congelador (freezer).
- Sistema de ordenha: ordenhadeira canalizada; ordenhadeira com balde-ao-pé; não possui ordenhadeira.
- Correta lavagem dos equipamentos (em propriedades que possuem ordenhadeira).

Este conjunto de informações foi utilizado posteriormente para classificar os produtores com relação aos fatores de variação estudados: higiene ambiental, práticas higiênicas utilizadas no manejo da ordenha, análise microbiológica de superfície dos copos coletores presentes nos equipamentos de ordenha ou vasilhames, temperatura do leite armazenado nas propriedades sob refrigeração, e qualidade da água utilizada para limpeza dos equipamentos de ordenha. O instrumento de coleta de dados (Apêndice 2), referente às boas práticas de produção de leite, foi desenvolvido a partir da Resolução RDC nº. 275, de 21 de outubro de 2002 (ANVISA, 2002).

Foram adotados valores para cada item avaliado no instrumento de coleta de dados, conforme está demonstrado na Tabela 2.

TABELA 2 – CRITÉRIOS E VALORES REFERENTES AOS ITENS DE JULGAMENTO

VALOR DO ITEM AVALIADO	CRITÉRIOS
0	Quando o item em avaliação não estiver em conformidade.
1	Quando o item em avaliação estiver em parcialmente em conformidade.
3	Quando o item em avaliação estiver em conformidade.

Os critérios da Tabela 2 foram estabelecidos de modo a definir se o item avaliado estava em conformidade ou não com os parâmetros de boas práticas de produção, sendo o escore adotado de 0 (zero) para itens em não-conformidade, 1 (um) para itens parcialmente em conformidade, e 3 (três) para os itens em conformidade.

3.1.3 Amostras de leite cru

As amostras foram coletadas em triplicata, totalizando 816 amostras, no período de janeiro a dezembro de 2006. Foram coletadas nas propriedades rurais estudadas, diretamente dos tanques refrigeradores ou recipientes, durante a coleta efetuada pelos transportadores de leite cru, transportadas sob refrigeração em caixas isotérmicas. As amostras foram colhidas em frascos esterilizados de 300 mL, mantidas sob refrigeração, e transportadas até o laboratório de análises microbiológicas localizado na indústria de laticínios em Marechal Cândido Rondon-PR. As amostras foram subdivididas.

A amostra 1 foi destinada para a determinação laboratorial da densidade, índice crioscópico, acidez titulável, contagem de mesófilos, psicotróficos e pesquisa de resíduos de antibióticos. A amostra 2 foi destinada ao Laboratório Centralizado da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa/Universidade Federal do Paraná, resfriada e adicionada do conservante Bronopol® (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol), para contagem de células somáticas no equipamento modelo Somacount 500 (Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, MN), por citometria de fluxo (IDF/FIL 148 A), e para determinação da concentração de matéria gorda, proteína e extrato seco desengordurado, no equipamento automatizado Bentley 2000 (Bentley Instruments Incorporated, Chaska, MN) por leitura de absorção

infravermelha (BENTLEY INSTRUMENTS, 1997). E a amostra 3, coletada em frasco esterilizado, destinada ao mesmo laboratório, contendo o conservante Azidiol (BS Pharma, Belo Horizonte) composto por 0,11975mg de azida de sódio e 0,005 mg de cloranfenicol por mL, para contagem bacteriana total no equipamento IBC (Bentley Instruments Incorporated, Chaska, MN).

Nas primeiras seis coletas de amostras, foram realizadas coletas de informações para caracterizar as propriedades, verificações do desempenho dos resfriadores e das ordenhadeiras, e foram coletadas amostras de água e de esfregação de superfície dos equipamentos. Nas colheitas de amostras realizadas nos meses de outubro e dezembro, foram coletadas também amostras em frascos estéreis (amostra 4), destinadas à pesquisa de *L. monocytogenes* em meio seletivo.

3.1.4 Colheita de amostras de superfície dos copos coletores ou vasilhames

Foram coletadas amostras em swabs dos copos coletores das ordenhadeiras, ou dos vasilhames, no período compreendido entre ordenhas, através de esfregação de superfície, para estimar a contaminação dos mesmos, através da contagem de mesófilos. Foram utilizadas hastes estéreis de rayon com 20 cm de comprimento e tubos de ensaio contendo 10 mL de solução salina a 0,85%/tubo. As hastes foram embebidas na solução sendo em seguida friccionadas sobre as superfícies pesquisadas. Imediatamente após as coletas, as amostras foram transportadas em recipiente isotérmico para análise microbiológica.

3.1.5 Colheita de amostras de água

A água utilizada nas propriedades para a limpeza dos equipamentos de ordenha foi analisada para pesquisa e contagem de coliformes totais e coliformes fecais. Foram coletadas amostras de água de abastecimento das propriedades, especificamente da água utilizada na higienização de equipamentos e utensílios utilizados na obtenção do leite (ordenha).

Nas torneiras em que se efetuou a coleta, foi realizada a limpeza da área externa da saída com etanol 70%, deixando a água fluir por 2 minutos antes da coleta (SILVA et al., 1997). A avaliação microbiológica foi realizada através do método *Heterotrophic Plate Count* (CLESCERI et al., 1998).

3.1.6 Classificação higiênico-sanitária das propriedades rurais

O instrumento de coleta de dados elaborado foi aplicado em 34 propriedades rurais da bacia leiteira da região oeste do Paraná.

Ao final das avaliações, as propriedades foram classificadas como está demonstrado na Tabela 3.

TABELA 3 – CLASSIFICAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA DAS PROPRIEDADES RURAIS

CLASSIFICAÇÃO	PONTUAÇÃO
Precária	0 - 3
Regular	4 - 7
Boa	8 - 11
Excelente	12 - 15

3.2 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

3.2.1 Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis, e contagem de psicrotróficos

As contagens de mesófilos e de psicrotróficos foram estimadas seguindo o protocolo *Rapid Methods for Detecting Foodborne Pathogens* (FDA, 2006).

Os resultados foram transformados em logaritmo na base 10 (COELHO et al., 2001; SANTANA et al., 2001; SANTOS, 2002).

3.2.2 Contagem de células somáticas

Foram realizadas no Laboratório do Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná, em um prazo não superior a 24 horas após a coleta, no equipamento Somacount 500 (BENTLEY INSTRUMENTS INC.), segundo as normas FIL 148 A: 1995 (BRASIL, 2001). Os resultados foram transformados em logaritmo na base 10 (SANTANA et al., 2001; COELHO et al., 2001; SANTOS, 2002).

3.2.3 Contagem bacteriana total

Foram realizadas no Laboratório do Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná, em um prazo não superior a 24 horas após a coleta, no equipamento IBC (BENTLEY INSTRUMENTS INC.), segundo as normas FIL 100B: 1991 (BRASIL, 2001). Os resultados foram transformados em logaritmo na base 10 (SANTANA et al., 2001; COELHO et al., 2001; SANTOS, 2002).

3.2.4 Determinação da acidez titulável

Foi realizada segundo o método de análise LANARA/MA, 1981 (BRASIL, 2001).

3.2.5 Determinação da densidade relativa

Foi realizada segundo o método de análise AOAC, 15^a. ed., 952.22, 1990 (BRASIL, 2001).

3.2.6 Determinação do índice crioscópico

Foi realizada segundo o método de análise FIL 108A: 1969 (BRASIL, 2001).

3.2.7 Pesquisa de resíduos de antibióticos

Todas as amostras foram submetidas ao kit SNAP- β -lactâmicos, para pesquisa de resíduos dos principais antibióticos utilizados no tratamento de bovinos: penicilina G, ampicilina, amoxicilina, cefapirina e ceftiofur, e ao kit SNAP-tetraciclina, para pesquisa de resíduos de tetraciclina, de acordo com AUP/CGI/DIPOA n.º. 2699/2005.

3.2.8 Determinação da concentração de matéria gorda e proteína

As amostras foram analisadas segundo a metodologia internacional FIL 1C: 1987 (BRASIL, 2001) e FIL 20B: 1993 (BRASIL, 2001), respectivamente. O resultado foi expresso em g/100g.

3.2.9 Determinação da concentração de extrato seco desengordurado

Foi determinada pela diferença entre o extrato seco total e a matéria gorda (3.2.8).

3.3 PESQUISA DE *Listeria monocytogenes*

3.3.1 Isolamento e identificação de *Listeria monocytogenes*

As amostras de leite de tanques (25 mL) colhidas assepticamente foram homogeneizadas e em seguida transferidas para um recipiente contendo 225 mL de caldo Fraser e incubadas por 24 horas a 30°C (FRANCO e LANDGRAF, 2005). Em seguida foram transferidas para a superfície do agar-ALOA (Laborclin, Pinhais-PR)². Permaneceram por 24 horas em estufa bacteriológica a 35°C, com a finalidade de se observar o desenvolvimento de colônias azuladas com formação de halo (HITCHINS, 2003).

² Registrado na ANVISA sob no. 10097010134

3.3.2 Reação de PCR

As colônias típicas de *Listeria monocytogenes* no Agar-ALOA foram submetidas ao método de PCR no Laboratório de Fixação de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, com base nos protocolos previamente descritos por Goldsteyn Thomas et al. (1991), Blais e Phillippe (2002) e por Gows e Liedemann (2005). Colônias isoladas foram diluídas em 50 µL de 1x tampão PCR em um micro-tubo de 2 mL. Foram adicionados 50 µL de solução de Triton X a 2% nesta suspensão celular e então centrifugada. Em um dos tubos não foi inserida amostra, sendo o tubo negativo. A mistura foi aquecida a 100° C por 10 minutos e resfriada à temperatura ambiente, e em seguida, centrifugada a 2.000 rpm por um minuto. Para reação de amplificação foram utilizados 5 µL deste lisado celular.

Os *primers* utilizados foram:

- LL-5: [5'AACCTATCCAGGTGCTC3'] para a amplificação da região de 520 pares de bases do gene *hly*. E o *primer* reverso LL-4: [5'CGCCACACTTGAGATAT3'].
- 16S-5: [5'CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCATGG3'] para a amplificação de um fragmento 1,5 kb correspondente ao gene 16S rDNA. E o *primer* reverso:
16S-3: [5'CCCGGGATCCAAGTTTACCTTGTTACGACTT3'].

Os *primers* foram sintetizados pela Invitrogen (Carlsbad, CA, E.U.A.). O *primer* LL é específico para a identificação de *Listeria monocytogenes*, e o *primer* 16S é específico para as espécies de *Listeria* não patogênicas.

A solução para reação de PCR foi preparada utilizando-se reagentes, como demonstrado na Tabela 4:

TABELA 4: REAGENTES UTILIZADOS PARA O PREPARO DA SOLUÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DE PCR

SOLUÇÃO	VOLUME POR MICROTUBO (µL)
Água destilada estéril	32,5
Tampão PCR 10x	5,0
MgCl ₂ 25 mM	1,5
Primer U – 100 µM	1,0
Primer R – 100 µM	1,0
20 mM dNTP (dCTP, dATP, dTTP, dGTP)	2,0
Taq	2,0
Volume final	45,0

A solução tampão utilizada era composta por KCl 500 mM, tris-HCl 100 mM (pH 9,0) e Triton X-100 a 1%.

As condições de amplificação para o *primer* LL foram: 80° C por 10 minutos, desnaturação a 94° C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94° C por 30 segundos, continuação a 45° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 2 minutos. As condições de amplificação para o *primer* 16S foram: 90° C por 10 minutos, desnaturação a 94° C por 30 segundos, 25 ciclos de desnaturação a 42° C por 30 segundos, continuação a 72° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 5 minutos. O DNA amplificado foi analisado por eletroforese em gel agarose 1,2% coradas com brometo de etídio (3 µL/100 mL) e visualizado sob luz ultra-violeta (320 nm), de acordo com Czajka et al. (1993).

3.3.2.1 Eletroforese em gel agarose

Inicialmente foi preparada a solução de agarose (1,2%) com tampão TBE (Tris-Borato-EDTA). A agarose foi aquecida até o ponto de fusão, e em seguida resfriada (a 42° C), e então depositada na cuba para gel, contendo o pente para a formação dos poços. Após a solidificação do gel o pente foi retirado e o gel foi colocado na cuba de eletroforese. As amostras foram preparadas para eletroforese em microtubos, com 5 µL de corante. Em seguida a cuba foi preenchida com o tampão TBE, até o gel ficar submerso em uma camada de 5 mm de espessura. Foram preenchidos os poços no gel submerso com 8 µL de amostra. O aparelho foi

conectado a 90 volts, aguardando-se aproximadamente 1 hora, e verificando-se o deslocamento realizado pela eletroforese. Em seguida as amostras foram removidas do recipiente e mergulhadas em solução de brometo de etídio por 15 minutos. Em seguida a placa de gel foi lavada para a remoção do brometo de etídio, e as amostras foram observadas em luz ultravioleta (320 nm).

3.3.2.2 Interpretação dos resultados

A amplificação gerada pelas seqüências do gene *hlyA* de *L. monocytogenes* é um fragmento duplo de DNA de 520 pares de bases de comprimento. O teste de PCR é considerado positivo quando aparece uma banda intensa na placa de gel agar. Se não aparecer uma banda visível, o teste é considerado negativo.

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

3.4.1 Contagem de mesófilos, psicotróficos e contagem bacteriana total eletrônica

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições, em 8 ocasiões. Foi realizada a análise dos dados considerando os efeitos de: higiene ambiental (n=3, adequada, parcialmente adequada, inadequada), temperatura de armazenamento sob refrigeração (n=5, 0,1 a 3,0°C, 3,1 a 6,0 °C, 6,1 a 9,0 °C, 9,1 a 12 °C, maior que 12 °C), práticas higiênicas utilizadas no manejo da ordenha (n=3, adequadas, parcialmente adequadas, inadequadas), limpeza dos equipamentos de ordenha segundo a contaminação de superfície dos copos coletores (n=4, $\leq 10^1$, 10^2 , 10^3 , 10^4), análise da qualidade da água utilizada para higienização dos equipamentos de ordenha segundo a contagem de coliformes totais (n=4, ausentes, menor que 10^3 , 10^3 a 10^4 , superior a 10^4), e suas interações, conforme modelo estatístico:

$$Y_{pqrst} = \mu + A_p + C_q + H_r + M_s + W_t + e_{pqrst}$$

Onde:

Y_{pqrst} = média geral da contagem de mesófilos, psicrotróficos e contagem bacteriana total

μ = média

A_p = efeito da higiene ambiental (GL = 2)

C_q = efeito da temperatura de armazenamento sob refrigeração (GL = 4)

H_r = efeito das práticas higiênicas utilizadas no manejo da ordenha (GL = 2)

M_s = efeito da limpeza dos copos coletores dos equipamentos de ordenha ou vasilhames (GL = 3)

W_t = efeito da qualidade da água utilizada para higienização dos equipamentos de ordenha (GL = 3)

e_{pqrst} = erro aleatório associado a cada observação

Os resultados obtidos nas determinações microbiológicas das amostras (contagem de mesófilos, psicrotróficos e contagem bacteriana total), foram tratados estatisticamente pela análise de variância. Inicialmente as médias ajustadas pelo modelo foram avaliadas quanto a sua homogeneidade pelo teste de Tukey. Os resultados que revelaram diferenças estatisticamente significantes entre as médias dos tratamentos, foram comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Para o conjunto das análises estatísticas, foi utilizado o programa computadorizado *Statistica 6.0*.

As variáveis dependentes avaliadas foram:

- a) Log_{10} da contagem de mesófilos e psicrotróficos: é o resultado das análises laboratoriais, transformado em logaritmo na base 10.
- b) Log_{10} da contagem bacteriana total: é o resultado da leitura do equipamento IBC® (BENTLEY INSTRUMENTS, 2002), transformado em logaritmo na base 10.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os efeitos estudados (higiene ambiental, temperatura do leite armazenado no tanque de refrigeração ou sistema similar, práticas de higiene na ordenha, limpeza dos insufladores, e qualidade da água utilizada para limpeza dos equipamentos de ordenha e utensílios) apresentaram significância para o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Das amostras estudadas, nenhuma apresentou resíduos de antibióticos, para β -lactâmicos. Este fato provavelmente está relacionado às punições severas que foram impostas aos produtores em anos anteriores, representadas por condenação total do leite produzido em casos confirmados, e à conscientização destes, para atendimento aos critérios estabelecidos pela legislação (ANVISA, 2005).

Os resultados compreendem a caracterização das propriedades rurais, as médias gerais das variáveis dependentes, o estudo dos efeitos sobre a qualidade microbiológica do leite cru e a identificação de *L. monocytogenes* nas amostras.

A caracterização das propriedades rurais pode ser observada nas Tabelas 5 e 6.

Observa-se na Tabela 5, que há predomínio de propriedades com produções diárias menores que 200 litros de leite (67%), com áreas menores de 30 ha (64%), com mão de obra familiar (80%), e com média de 22 vacas em produção por propriedade.

Na Tabela 6 observa-se que 93% das propriedades possuem sistema de criação semi-intensiva (93%). Apesar das vantagens nutricionais do fornecimento de silagem de milho, e de ser uma técnica muito difundida entre os produtores, 26,4% dos produtores do presente estudo não a utilizam. Nas visitas realizadas, observou-se que em 23 propriedades (67,6%) havia vacas deitadas em áreas de terra e de formação de barro, e em 30 propriedades (88,2%) as vacas permaneciam nas áreas de pastagens durante a noite. Exames para diagnóstico de brucelose e tuberculose são realizados anualmente em todas as propriedades.

TABELA 5: CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES RURAIS ESTUDADAS NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ-2006

PRODUTOR	PRODUÇÃO (litros/dia)	ÁREA (ha)	REBANHO (nº. de vacas em produção)	MÃO DE OBRA	FREQUÊNCIA DE RECOLHIMENTO DO LEITE PELA INDÚSTRIA
1	1500	28	75	2	2
2	250	67	40	2	2
3	750	28	23	1	2
4	120	93	45	2	2
5	1000	62	55	3	1
6	260	50	35	3	2
7	400	130	22	2	2
8	760	40	65	1	1
9	200	30	15	1	2
10	300	4	22	1	2
11	250	20	18	1	1
12	200	6	20	1	1
13	200	8	20	1	2
14	250	12	25	1	1
15	100	9	15	1	1
16	150	7	18	1	1
17	160	16	28	1	1
18	220	50	20	1	1
19	100	47	12	1	2
20	200	30	15	1	2
21	35	8	20	1	1
22	250	40	30	3	1
23	100	40	22	1	1
24	65	50	15	1	2
25	15	6	6	1	2
26	18	30	8	1	1
27	15	12	7	1	2
28	15	12	6	1	2
29	9	10	4	1	2
30	18	10	10	1	1
31	15	20	8	1	2
32	8	4	6	1	2
33	18	32	24	1	2
34	12	16	12	1	2

Mão de obra: (1) familiar; (2) familiar e contratada; (3) contratada
 Frequência de recolhimento do leite pela indústria: (1) 24 h; (2) 48 h

TABELA 6: PRÁTICAS DE MANEJO ADOTADAS NAS PROPRIEDADES RURAIS DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ-2006

PRODUTOR	EXAMES DE BRUCELOSE E TUBERCULOSE	SISTEMA DE CRIAÇÃO	ACOMODAÇÃO DAS VACAS	SILAGEM DE MILHO	VACAS DEITADAS EM LOCAL IMPRÓPRIO
1	2	2	3	1	1
2	2	2	3	1	2
3	2	2	3	1	2
4	2	2	3	1	2
5	2	1	1	1	1
6	2	2	3	1	2
7	2	2	3	1	2
8	2	1	1	1	1
9	2	2	3	1	2
10	2	2	2	2	2
11	2	2	3	1	1
12	2	2	3	1	2
13	2	2	3	2	1
14	2	2	3	1	2
15	2	2	3	1	1
16	2	2	3	1	2
17	2	2	3	1	1
18	2	2	3	1	1
19	2	2	3	1	2
20	2	2	3	1	1
21	2	2	3	1	2
22	2	2	2	1	2
23	2	2	3	1	2
24	2	2	3	1	1
25	2	2	3	2	2
26	2	2	3	1	2
27	2	2	3	2	2
28	2	2	3	2	2
29	2	2	3	2	2
30	2	2	3	2	2
31	2	2	3	1	2
32	2	2	3	2	2
33	2	2	3	1	2
34	2	2	3	2	1

Exames de brucelose e tuberculose: (1) semestral; (2) anual; (3) não realiza

Sistema de criação (manejo): (1) estabulado tipo free-stahl; (2) semi-intensivo

Acomodação das vacas: (1) estábulo dia e noite; (2) no pasto durante o dia e pernoite no estábulo; (3) no pasto dia e noite

Silagem de milho: (1) fornece; (2) não fornece

Vacas deitadas em local impróprio (barro ou terra) por ocasião das visitas efetuadas: (1) nunca; (2) algumas vezes

Na Tabela 7 pode-se observar a caracterização das propriedades quanto às instalações específicas para a ordenha.

TABELA 7: CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES QUANTO ÀS INSTALAÇÕES E EQUIPAMENTOS DE ORDENHA-2006

PRODUTOR	ORIGEM DA ÁGUA	LIMPEZA DAS INSTALAÇÕES	SISTEMA DE ORDENHA	SISTEMA DE RESFRIAMENTO
1	1	1	1	1
2	3	2	2	1
3	2	3	1	1
4	3	2	2	1
5	2	2	1	1
6	3	2	1	1
7	2	2	1	1
8	2	1	1	1
9	1	1	1	1
10	1	1	2	1
11	1	2	2	1
12	1	2	2	1
13	1	2	2	1
14	1	3	2	1
15	1	2	2	2
16	1	3	2	2
17	1	3	2	1
18	3	2	2	2
19	3	3	2	2
20	1	3	2	2
21	1	2	2	1
22	2	4	2	1
23	3	3	2	2
24	3	3	2	2
25	1	3	3	4
26	3	3	3	3
27	3	3	3	4
28	3	3	3	4
29	1	3	3	4
30	1	3	3	3
31	3	3	3	4
32	3	4	3	4
33	1	4	3	2
34	3	4	3	3

Água utilizada na lavagem dos tetos e equipamentos: (1) rede pública; (2) poço artesiano; (3) poço convencional

Limpeza da sala de ordenha: (1) ótima; (2) boa; (3) regular; (4) ruim

Sistema de ordenha: (1) canalizada; (2) balde-ao-pé; (3) não possui ordenhadeira

Sistema de resfriamento do leite: (1) resfriador de expansão direta; (2) resfriador de imersão; (3) congelador doméstico; (4) geladeira residencial

Na Tabela 8 pode-se observar as características das propriedades com relação aos procedimentos utilizados na ordenha.

TABELA 8: CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES QUANTO AOS PROCEDIMENTOS DE ORDENHA-2006

PRODUTOR	ESTADO DE LIMPEZA VACAS	PRÉ-IMERSÃO	SECAGEM DOS TETOS	TESTE RÁPIDO	CALIFORNIA MASTITIS TEST
1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	2	1
3	2	1	1	2	2
4	2	1	1	2	1
5	1	1	3	1	1
6	3	1	3	2	2
7	1	1	1	2	2
8	1	1	3	1	1
9	1	1	1	1	2
10	1	1	3	1	1
11	1	1	1	2	2
12	1	1	1	2	2
13	1	2	2	2	2
14	2	1	2	2	2
15	1	1	1	1	1
16	2	2	2	2	3
17	1	1	1	1	2
18	1	2	1	2	2
19	1	1	1	2	3
20	1	1	1	2	2
21	2	1	2	2	2
22	1	1	1	1	3
23	1	2	2	2	3
24	1	2	2	2	3
25	1	2	2	2	3
26	1	2	4	2	3
27	2	2	2	2	3
28	1	2	4	2	3
29	1	1	1	2	3
30	2	2	4	2	3
31	2	2	4	2	3
32	1	2	4	2	3
33	3	1	1	2	2
34	1	2	4	2	3

Estado de limpeza das vacas ao entrarem na sala de ordenha: (1) limpas; (2) moderadamente apresentando sujidades com barro; (3) muitas sujidades com barro

Pré-dipping (limpeza prévia dos tetos): (1) efetua; (2) não efetua

Secagem dos tetos: (1) papel toalha descartável; (2) toalha seca individual; (3) toalha molhada individual; (4) toalha coletiva

Teste da caneca telada: (1) efetua; (2) não efetua

California mastitis test: (1) realiza semanalmente; (2) realiza quinzenalmente; (3) realiza mensalmente

Pode-se observar uma grande diversidade adotada nos procedimentos de manejo geral e manejo da ordenha especificamente. Em 10 (29,4%) propriedades observou-se haver vacas com sujidades, principalmente nos membros posteriores e no úbere, ao entrarem na sala de ordenha. Em 6 propriedades (17,6%) eram

utilizadas toalhas coletivas para secagem dos tetos, o que é totalmente desaconselhado. Em 13 propriedades (38,2%) não se realizava limpeza prévia dos tetos. Em 25 propriedades (73,5%) não era realizado diariamente o teste da caneca de fundo escuro ou caneca telada, como é recomendado. Em 27 propriedades (79,4%) o teste para detecção de mastite subclínica, denominado *California Mastitis Test*, não era realizado semanalmente, como é recomendado. Em 13 (38,2%) propriedades utilizava-se água de poço convencional para a limpeza das glândulas mamárias e dos equipamentos de ordenha. Em 19 propriedades (55,8%) as salas de ordenha não estavam adequadamente limpas. Das propriedades estudadas, 10 (29,4%) não possuíam ordenhadeira mecânica, e 9 (26,4%) não possuíam resfriador.

A higiene ambiental observada nas propriedades, considerando-se as áreas de permanência dos animais, demonstrou que apenas 11 (32,35%) propriedades dedicavam atenção à limpeza geral, não permitindo que haja áreas com formação de barro e acúmulo de dejetos, preservando assim a saúde das glândulas mamárias do rebanho, demonstrando observância à prevenção da mastite ambiental. Em 12 (35,29%) propriedades as áreas de permanência dos animais eram limpas, porém encontram-se não-conformidades. E em 11 (32,35%) propriedades os locais de permanência dos animais apresentavam-se inadequados (Tabela 7). A temperatura do leite armazenado foi medida por ocasião das coletas de amostras, e demonstrou também grande variabilidade. Do total de produtores, 4 (11,76%) apresentaram armazenamento do leite a temperaturas inferiores a 3°C, 14 (41,17%) apresentaram temperaturas entre 3,1 e 6°C, 10 (29,41%) apresentaram leite com temperaturas entre 6,1 a 9°C, 2 (5,88%) apresentaram temperaturas entre 9,1 a 12°C e 4 (11,76%) com temperaturas acima de 12,1°C. As práticas higiênicas utilizadas no manejo da ordenha, que refletem especificamente os cuidados dos produtores na obtenção higiênica do leite, e os cuidados com a prevenção da mastite contagiosa, demonstraram que em apenas 4 propriedades (11,76%) observava-se corretamente as práticas preconizadas. Em 24 propriedades (70,58%) havia aplicação dos conceitos de higiene da ordenha, porém com falhas, e em 6 propriedades (17,64%) não se observava higiene. Quanto à limpeza dos copos coletores das ordenhadeiras, avaliada através de esfregaço de superfície, foi possível observar que 2 propriedades (5,88%) apresentaram contagens menores que 10¹ UFC/mL.

Em 8 propriedades (23,52%) as contagens foram da ordem de 10^2 UFC/mL. Em 3 propriedades (8,82%), 10^3 UFC/mL, e em 21 propriedades (61,76%) os copos coletores mostraram contagens bacterianas superiores a 10^4 UFC/mL. A observação da qualidade da água utilizada para limpeza dos equipamentos de ordenha, através da contagem de coliformes totais, apresentou: 20 propriedades (58,82%) com ausência de coliformes nas amostras, 2 (5,88%) com contagem menor que 10^3 UFC/mL, 11 (32,35%) entre 10^3 e 10^4 UFC/mL e 1 (2,94%) com contagem superior a 10^4 UFC/mL.

Na Tabela 9 estão apresentadas as características das propriedades estudadas, relacionadas aos fatores de variação utilizados no presente estudo.

TABELA 9: DESCRIÇÃO DAS PROPRIEDADES RURAIS SEGUNDO OS FATORES DE VARIAÇÃO

IDENTIFICAÇÃO	HIGIENE AMBIENTAL	TEMPERATURA DO LEITE ARMAZENADO	PRÁTICAS HIGIÊNICAS NA ORDENHA	LIMPEZA DOS EQUIPAMENTOS DE ORDENHA	QUALIDADE DA ÁGUA DE LIMPEZA
1	3	3	3	3	3
2	1	3	1	1	1
3	0	3	1	1	0
4	0	3	1	0	0
5	3	3	1	0	0
6	0	1	1	0	1
7	1	1	1	1	0
8	3	3	1	0	0
9	3	3	3	3	3
10	1	3	3	0	3
11	3	1	3	1	3
12	1	1	1	0	3
13	3	1	1	0	3
14	0	1	1	1	3
15	3	1	1	1	0
16	0	0	1	0	3
17	3	1	1	0	3
18	1	0	1	0	0
19	1	0	3	3	3
20	3	1	1	1	3
21	0	0	1	1	0
22	1	1	1	0	3
23	1	1	1	0	3
24	3	0	1	1	0
25	3	0	1	0	3
26	1	0	0	0	0
27	0	0	0	0	3
28	1	0	0	1	3
29	1	0	1	0	3
30	0	0	0	0	3
31	0	0	0	0	0
32	1	0	0	0	3
33	0	0	1	0	1
34	0	0	0	0	0

Higiene ambiental: (0) inadequada; (1) parcialmente adequada; (3) adequada.

Temperatura do leite armazenado: (0) inadequada; (1) parcialmente adequada; (3) adequada.

Práticas higiênicas utilizadas na obtenção do leite: (0) inadequadas; (1) parcialmente adequadas; (3) adequadas.

Limpeza dos copos coletores dos equipamentos de ordenha: (0) inadequada; (1) parcialmente adequada; (3) adequada.

Qualidade da água utilizada na limpeza dos equipamentos de ordenha: (0) inadequada; (3) adequada

As propriedades rurais foram classificadas através da somatória dos 5 itens observados, como pode-se observar na Tabela 10.

TABELA 10: CLASSIFICAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA DAS PROPRIEDADES RURAIS DA REGIÃO OESTE-2006, REFERENTE À ATIVIDADE LEITEIRA

IDENTIFICAÇÃO	PONTUAÇÃO	CLASSIFICAÇÃO
1	15	excelente
2	7	regular
3	5	regular
4	4	regular
5	7	regular
6	3	precária
7	4	precária
8	7	regular
9	15	excelente
10	10	boa
11	11	boa
12	6	regular
13	8	boa
14	6	regular
15	6	regular
16	4	regular
17	8	boa
18	2	precária
19	10	boa
20	9	boa
21	2	precária
22	6	regular
23	6	regular
24	5	regular
25	7	regular
26	1	precária
27	3	precária
28	5	regular
29	5	regular
30	3	precária
31	0	precária
32	4	regular
33	2	precária
34	0	precária

Das propriedades rurais estudadas, 2 (5,8%) foram classificadas como excelentes pelos critérios higiênico-sanitários, 6 (17,6%) boas, 16 (47,0%) regulares e 10 (29,4%) precárias. Dentre as precárias, 2 não obtiveram nenhuma pontuação.

4.1 MÉDIAS ESTIMADAS DAS VARIÁVEIS DEPENDENTES ESTUDADAS

Na Tabela 11 estão apresentadas as médias estimadas das variáveis dependentes estudadas.

TABELA 11: MÉDIAS, LIMITES DAS MÉDIAS, VALORES MÍNIMOS E MÁXIMOS E ERRO PADRÃO DAS AMOSTRAS DE LEITE DA BACIA LEITEIRA DO OESTE DO PARANÁ EM 2006 (N = 816)

VARIÁVEL	MÍNIMO ABSOLUTO	LIMITE INFERIOR A 95%	MÉDIA	LIMITE SUPERIOR A 95%	MÁXIMO	ERRO PADRÃO (%)
Acidez titulável (°D)	11,00	15,48	15,57	15,66	21,00	0,3059
Densidade relativa (g/mL)	1,022	1,029	1,029	1,029	1,033	0,0064
Índice crioscópico (°H)	0,520	0,541	0,542	0,543	0,575	0,8302
Mesófilos ^a	3,30	6,25	6,33	6,41	8,66	0,6731
Psicrotróficos ^a	2,90	5,83	5,92	6,01	8,57	0,7721
CBT ^a	3,47	5,43	5,47	5,52	7,32	0,4308
CCS ^b	4,56	5,71	5,73	5,75	6,54	0,1664
Matéria gorda (g/100g)	0,41	3,67	3,72	3,77	6,37	0,6659
Proteína (g/100g)	2,51	3,14	3,16	3,17	3,91	0,2607
ESD (%)	7,05	8,41	8,43	8,46	9,57	0,1523

D: graus Dornic; CBT: contagem bacteriana total; CCS: contagem de células somáticas; ESD: extrato seco desengordurado / a: valores expressos em Log₁₀ UFC/mL / b: valores expressos em Log₁₀ células/mL

O valor médio encontrado referente à acidez titulável das amostras foi de 15,57°D. Este valor foi maior do que os descritos por Zanella et al. (2006), 15,30 °D no Rio Grande do Sul, e por Lorenzetti (2006), 14,35 e 14,60 °D respectivamente, para as regiões de Curitiba e do Alto Vale de Santa Catarina. Estudos desenvolvidos por Vieira et al. (2003) no Pará e por Nascimento et al. (2004) em Sergipe, encontraram valores médios de 16,3°D e 19°D, respectivamente. Sá (2004), estudando rebanhos em Santa Catarina, obteve valores de 16 a 26,5°D, e Gonzalez et al. (2006) em Pelotas, descreveu a média de 16,26 °D. Valores de acidez entre 14 e 18°D (ou 0,14 a 0,18 g ácido láctico/100 mL) indicam que o leite coletado possui baixa carga de microrganismos mesófilos e que foi conservado sob refrigeração adequada, pois são os microrganismos mesófilos presentes no leite que sob temperatura inadequada de armazenamento transformam a lactose do leite no ácido láctico que é medido nesta prova de acidez (GOUNOT, 1986). Na região do presente

estudo, a refrigeração do leite nas propriedades está gradativamente sendo implementada, principalmente a partir da vigência da I.N. 51/2002 (BRASIL, 2002). Do total de amostras coletadas, apenas 48 (5,8%) estavam fora dos limites de acidez titulável estabelecidos pela legislação. Portanto, observa-se que as condições básicas de preservação da matéria-prima estão sendo atendidas.

A densidade relativa média das amostras foi 1,02973 g/mL. Este valor é considerado dentro dos limites (de 1,028 a 1,034 g/mL). De 816 amostras coletadas, 91 (11,15%) estavam fora dos limites máximos e mínimos (BRASIL, 2002). No caso de densidade baixa, a legislação prevê a necessidade de confirmação através da prova de crioscopia, para caracterizar adulteração das características normais do leite. Zanella et al. (2006) encontraram médias de 1,02860 g/mL em amostras de leite no Rio Grande do Sul.

A média do índice crioscópico foi $-0,542^{\circ}\text{H}$. Este valor foi semelhante ao descrito por Lorenzetti (2006) na região de Curitiba ($-0,540^{\circ}\text{H}$). Do total de amostras do presente estudo, 24 (2,94%) estavam acima dos limites legais ($-0,530^{\circ}\text{H}$). Nascimento et al. (2004) encontraram valores de $-0,549$ a $-0,513^{\circ}\text{H}$ no Estado de Sergipe. Lorenzetti et al. (2005) encontraram média de $-0,550^{\circ}\text{H}$ para amostras da região de Curitiba. A análise de crioscopia é utilizada para confirmação da análise de densidade, nos casos de suspeita de fraude. Além disso, o valor da crioscopia está relacionado a fatores de ambiente, manejo, alimentação, e fatores intrínsecos ao animal, como por exemplo a composição racial e fase de lactação (LORENZETTI et al., 2005). Portanto, deve-se ter cuidado ao julgar os resultados.

A contagem média de mesófilos foi de $6,33 \log_{10}$ UFC/mL. Este valor foi superior à média de $5,58 \log_{10}$ UFC/mL descrita por Fagundes (2004) no Rio Grande do Sul e inferior à média de $6,42 \log_{10}$ UFC/mL obtida nos estudos de Santos (2002) realizados em Santa Catarina. Equipamentos de ordenha mal sanitizados, falhas nos procedimentos de ordenha, higiene ambiental inadequada, falta de refrigeração imediata após a ordenha, entre outros fatores, são causas das altas contagens de mesófilos em leite cru. As bactérias mesófilas se caracterizam por causar fermentação láctica indesejável quando o leite é mantido em temperatura ambiente (VILLAR et al., 1996; FONSECA e SANTOS, 2000). A legislação brasileira não contempla limites para contagem de mesófilos. Esta está incluída na contagem

bacteriana total, porém não podem ser comparadas por se tratar de outra metodologia.

A média encontrada para contagem de psicotróficos foi de 5,92 log₁₀ UFC/mL. Este valor foi inferior às médias descritas por Lorenzetti (2006), estudando amostras de leite cru nas regiões de Curitiba e Alto Vale (SC), de 6,16 e 8,99 log₁₀ UFC/mL, respectivamente; e inferior também às médias (8,36 log₁₀ UFC/mL) descritas por Brum (2004) para leite cru do sul do Paraná. Porém superior ao valor médio descrito por Santos (2002) de 5,74 log₁₀ UFC/mL em Santa Catarina. Devido a sua capacidade de reprodução no leite refrigerado, as psicotróficas constituem grande preocupação às indústrias de laticínios. A legislação brasileira não contempla limites de contagem de psicotróficos. Estes microrganismos fazem parte da contagem bacteriana total, porém não se estabelece comparação, por se tratar de outra metodologia.

A contagem bacteriana total (CBT) obtida por método eletrônico apresentou média de 5,47 log₁₀ UFC/mL. Do total de amostras, 25,18% estavam acima do limite estabelecido pela legislação (BRASIL, 2002), que era de 1 x 10⁶ UFC/mL por ocasião da realização do estudo. Este resultado reflete a influência da higiene ambiental, manejo higiênico da ordenha, sistema de resfriamento do leite, limpeza dos equipamentos de ordenha, e outras causas. A contagem bacteriana total constitui um grande desafio às áreas técnicas das indústrias, tendo em vista os critérios da I.N. 51/2002, que prevê alterações no limite máximo de CBT, que passou a 750.000 UFC/mL a partir de julho/2008 (BRASIL, 2002). Trabalhos de Zanella et al. (2008) no Rio Grande do Sul, estudando 11 propriedades durante um ano, apresentaram variações de contagem bacteriana total entre 1,4 x 10⁴ e 9,6 x 10⁶.

A média de CCS encontrada foi 5,73 log₁₀ células/mL. Este valor foi menor que o limite estabelecido pela legislação (BRASIL, 2002). Apesar disso, 13,93% das amostras estavam acima do limite de 1 x 10⁶ células/mL. Lorenzetti (2006), relatou médias de 5,61 e 5,59 log₁₀ células/mL para amostras de leite cru na região de Curitiba e do Alto Vale (SC), respectivamente. Neves et al. (2004) em Minas Gerais, descreveu médias de 5,77 log₁₀ células/mL. Bueno et al. (2004) obtiveram médias de 5,54 log₁₀ células/mL em Goiás. Paula et al. (2004) obtiveram a média de 5,67 log₁₀

células/mL em 257.540 amostras de leite de tanques de Santa Catarina, Paraná e São Paulo. Não existem regulamentações para CCS no comércio internacional, mas os países estão trabalhando com regulamentações internas, antecipando-se às recomendações do *Codex* que serão implementadas. Este fato se deve às evidências científicas de que a CCS do tanque é uma medida de qualidade do leite produzido. Nova Zelândia e Austrália adotaram como limite máximo 400.000 células/mL (5,6 \log_{10} células/mL); Suécia, 250.000 células/mL (5,39 \log_{10} células/mL) (KELTON e GODKIN, 2000). No Brasil, estabeleceu-se o limite máximo de 1.000.000 de células/mL a partir de 2002, e a partir de julho de 2008 este limite passou a 750.000 células/mL (5,87 \log_{10} células/mL). Em Quebec (Canadá), atualmente, 72,3% das amostras estão abaixo de 300.000 células/mL (5,47 \log_{10} células/mL) (FPLQ, 2008). O sistema de pagamento aos produtores com incentivo financeiro por CCS baixa e penalização para altas CCS, adotado em diversos países da Europa e América do Norte e em importantes indústrias brasileiras, já demonstrou ser um importante estímulo para a redução de CCS (CASSOLI et al., 2008). Há flutuações importantes de CCS do leite em tanques refrigeradores de um mês para outro. Aproximadamente 25% destas flutuações se devem a causas fisiológicas. Para se estabelecer um retrato fiel da porcentagem de quartos mamários infectados no rebanho, os laboratórios devem calcular uma média ponderada sobre os 6 últimos meses. O diagnóstico epidemiológico de mastite no rebanho nos permite compreender a dinâmica das infecções mamárias. Ocorrendo contagens elevadas, podemos afirmar inicialmente que existe um grande número de quartos mamários infectados, que os reservatórios microbianos mais importantes são os quartos infectados, e que a contaminação ocorre a partir do material e equipamentos de ordenha. Resta em seguida definir quais as prioridades no combate às CCS elevadas. O número de ordenhas por dia, o uso de extratores de copos coletores automáticos, o local onde as vacas pernoitam, o sistema de limpeza das ordenhadeiras, o controle preventivo da mastite, as práticas higiênicas de ordenha, e o exame sistemático dos pulsadores são os fatores que mais contribuem para a redução da CCS (JAYARAO et al., 2004). O diagnóstico precoce das vacas infectadas, o tratamento correto pautado em identificação laboratorial dos agentes

infeciosos, antibiograma e o tratamento correto de vacas secas, constituem em um grande diferencial nas propriedades com baixas CCS.

A concentração média de matéria gorda foi de 3,72 g/100 g. Este valor foi superior ao descrito por Lorenzetti (2006), na região de Curitiba (3,53 g/100 g) e semelhante à média do mesmo estudo, na região de Alto Vale (SC) (3,76 g/100 g). Foi semelhante também à média descrita por Gonzalez et al. (2006), de 3,70 g/100 g. Estudando 34.040 amostras de leite da região de Castrolanda, Andrade (2002) relatou a média de 3,39 g/100 g. A matéria gorda do leite pode ser influenciada principalmente pelas estações do ano, dieta alimentar dos rebanhos, composição racial, volume de produção, ordem de lactação e período de lactação. A porcentagem de gordura e o volume de produção de leite têm correlação negativa, assim, vacas de alta performance podem apresentar valores mínimos abaixo de 3,0 g/100 g, sem que isso se constitua em fraude. As indústrias remuneram os produtores pelo volume de leite produzido, e com adicional por concentração de matéria gorda acima de 3,1 g/100 g, ou penalização para concentrações iguais ou inferiores a 2,9 g/100 g. Das amostras estudadas, apenas 80 (9,8%) apresentaram concentração de matéria gorda inferior ao padrão estabelecido pela legislação. Na Alemanha, com 102.200 rebanhos leiteiros analisados no ano 2007, a porcentagem média de gordura foi de 4,13 g/100 g (ARBEITGEMEINSCHAFT DEUTSCHER RINDERZÜCHTER, 2008). Na França, em 57.204 rebanhos, a porcentagem média de gordura em 2007 foi de 3,99 g/100 g (FRANCE CONTROLE LAITIER, 2008). No estado da Califórnia, nos Estados Unidos, a porcentagem média de gordura no leite, das amostras de 854 rebanhos analisados em 2007, foi de 3,68 g/100g (DHIA, 2007). Os maiores valores encontrados nesses países demonstram haver uma grande preocupação na seleção genética dos animais para produção de gordura, concomitantemente à dieta alimentar, o que se reflete em aumento da porcentagem de sólidos totais. No Brasil, a preocupação com a produção de sólidos por parte das indústrias é recente (HARTMANN et al., 2002).

A média da concentração de proteína encontrada foi de 3,16 g/100 g. Este valor foi o mesmo descrito por Gonzalez et al. (2006) em rebanhos de Pelotas (RS), e semelhante ao descrito por Andrade (2002) estudando rebanhos de Castrolanda (3,10 g/100 g). No entanto, 62 amostras (7,5%) estavam com concentração abaixo

de 2,9 g/100 g (BRASIL, 2002). No estado da Califórnia, nos Estados Unidos, a porcentagem média de proteína no leite, das amostras de 852 rebanhos analisados em 2007, foi de 3,15 g/100 g (DHIA, 2007). Na Alemanha, em 102.200 rebanhos leiteiros, a concentração média de proteína no leite no ano 2007 foi de 3,43 g/100 g (ARBEITGEMEINSCHAFT DEUTSCHER RINDERZÜCHTER, 2008). Na França, em 57.204 rebanhos analisados, a porcentagem média de proteína em 2007 foi de 3,22 g/100 g (FRANCE CONTROLE LAITIER, 2008). Apesar da concentração de proteína no leite apresentar pouca variabilidade, apresenta alta correlação com a concentração de gordura, e representa importante fator de rendimento para indústrias de queijos e leite em pó (HARTMANN et al., 2002).

O extrato seco desengordurado (ESD) apresentou média de 8,43 g/100 g. Este valor é inferior aos descritos por Gonzalez et al. (2006), de 8,51 g/100 g em rebanhos de Pelotas (RS) e por Hartmann et al. (2002), de 8,62 g/100 g em 257.540 amostras de leite de tanques de Santa Catarina, Paraná e São Paulo. De todos os parâmetros estudados, para a avaliação da qualidade do leite cru refrigerado, este foi o que apresentou maior número de não conformidades (355 amostras, ou 43,5%). Este fato se constitui em grande preocupação das indústrias de laticínios, principalmente para fabricação de queijos e leite em pó. No estado da Califórnia, nos Estados Unidos, a porcentagem média de sólidos não gordurosos no leite, das amostras de 854 rebanhos analisados em 2007 foi de 8,84% (DHIA, 2007). O pagamento do leite por sólidos é realizado em outros países, e no Brasil há grande expectativa pela sua implantação, em complemento ao pagamento por volume.

4.2 ESTUDO DOS EFEITOS DE MEIO SOBRE A QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE CRU

Os resultados desta pesquisa mostraram que a higiene ambiental nas propriedades, a temperatura do leite armazenado no tanque de refrigeração ou sistema similar por ocasião da coleta realizada pelo caminhão transportador, as práticas de higiene na ordenha, a limpeza dos copos coletores, e a qualidade da água utilizada para limpeza dos equipamentos de ordenha e utensílios influenciaram significativamente as contagens de microrganismos mesófilos e psicrófilos, e em

conseqüência, a contagem bacteriana total. As diferentes práticas de higiene, associadas às diferentes condições de infraestrutura das propriedades promoveram significativas diferenças na qualidade microbiológica do leite cru.

Na Tabela 12 pode-se observar que nos primeiros níveis dos efeitos – higiene ambiental adequada, temperatura de armazenamento do leite entre 0,1 a 3,0 °C, higiene adequada na ordenha, contagem microbiológica de superfície dos copos coletores menor que 10^1 UFC/mL, e água de limpeza com ausência de coliformes – encontram-se as menores médias de contagem de mesófilos, psicrotróficos e contagem bacteriana total. Nos maiores níveis, onde se observa higiene ambiental e higiene na ordenha inadequadas, altas temperaturas de armazenamento do leite, limpeza deficiente dos copos coletores da ordenhadeira e contaminação da água de limpeza por coliformes, encontram-se os maiores valores de contagens.

TABELA 12: INFLUÊNCIA DOS FATORES DE VARIAÇÃO SOBRE A CONTAGEM DE MESÓFILOS, PSICOTRÓFICOS E CONTAGEM BACTERIANA TOTAL

DESCRIÇÃO		N	MESÓFILOS (log UFC/mL)	PSICOTRÓFICOS (log UFC/mL)	CBT (log UFC/mL)
Média			6,051785*	5,718510*	5,182247*
Higiene ambiental	adequada	288	-0,115836	-0,329798*	-0,140146*
	parcialmente adequada	240	0,023562	0,027398	0,0220930
	inadequada	288	0,094018	0,227206*	0,118805*
Temperatura de armazenamento (°C)	0,1 a 3,0	98	-0,297166*	0,055332	-0,121626*
	3,1 a 6,0	334	-0,247621*	-0,495264*	-0,100454
	6,1 a 9,0	236	0,030831	0,164679	-0,091842
	9,1 a 12,0	50	0,063286	-0,056052	-0,000263
	> 12,0	98	0,362994	-0,000826	0,122372
Higiene na ordenha	adequada	98	-0,347281*	-0,146498	-0,326093*
	parcialmente adequada	572	0,027481	0,039914	0,036214
	inadequada	146	0,152710	0,014487	0,147189*
Limpeza dos equipamentos (contaminação de superfície em UFC/mL)	< 10 ¹	48	-0,425928*	-0,356500*	-0,699292*
	10 ²	196	-0,289620	-0,171212	-0,037538
	10 ³	74	0,008864	-0,079777	0,046726
	> 10 ⁴	498	0,139756	0,140523	0,394003*
Qualidade da água de limpeza (UFC coliformes termotolerantes/mL)	ausentes	480	-0,535626*	-0,517139*	-0,306877*
	< 10 ³	48	-0,114584	-0,212047*	0,000032
	10 ³ a 10 ⁴	260	0,164191	0,167809	0,065000
	> 10 ⁴	24	0,213373*	0,220842	0,082022

CBT: contagem bacteriana total

* na mesma coluna: valores significativos a $p < 0,05$ pelo teste de médias

A higiene ambiental demonstrou ser um fator de variação significativo na redução de psicotróficos e na contagem bacteriana total. Observa-se também que a contagem de mesófilos foi significativamente influenciada pela temperatura de armazenamento do leite nas propriedades rurais, havendo redução destes quando a temperatura permanece abaixo de 6°C. No entanto temperaturas de armazenamento do leite nas propriedades abaixo de 3°C não são recomendadas devido à possibilidade de formação de gelo, que resulta em rompimento dos glóbulos de gordura e alterações na prova de crioscopia. A exceção está na contagem de

psicrotróficos relacionada à temperatura de armazenamento do leite, e pode ser explicada pela característica específica destes, de se reproduzir a baixas temperaturas, resultando em efeitos deterioradores no leite, principalmente quando armazenado nas propriedades rurais por mais de um dia (FONSECA e SANTOS, 2000). Este fato caracteriza a importância dos sistemas de resfriamento utilizados nas propriedades. Os mesófilos, psicrotróficos e a contagem bacteriana total também apresentaram significativa redução nas propriedades com adequadas práticas de higiene durante a ordenha. Muitos produtores não dão a devida atenção a esses procedimentos. A correta limpeza dos equipamentos demonstrou ser importante para a redução das contagens. Copos coletores das ordenhadeiras que apresentaram contagem de coliformes termotolerantes inferior a 10^1 UFC/mL resultaram em redução significativa de mesófilos, psicrotróficos e contagem bacteriana total no leite. Este fator isoladamente foi responsável pela redução de 15,5% na contagem bacteriana total, o maior índice entre todos observados. A qualidade da água utilizada para a limpeza dos equipamentos de ordenha constituiu um fator de variação significativo para a redução da contagem de mesófilos, psicrotróficos e a contagem bacteriana total, em propriedades com ausência de coliformes nas amostras. Por outro lado, nas propriedades com contagens maiores que 10^4 UFC/mL, houve significativo aumento da contagem de mesófilos, principalmente.

4.2.1 Higiene ambiental

A higiene ambiental nas propriedades estudadas demonstrou ser um fator de variação significativo. No presente estudo, as propriedades onde se observava higiene ambiental adequada apresentaram as menores contagens de mesófilos ($6,10 \log_{10}$ UFC/mL) e psicrotróficos (5,54 UFC/mL). Nas propriedades onde havia falhas de higiene, caracterizadas por áreas de formação de barro, e nas propriedades com higiene ambiental inadequada, com áreas de acúmulo de dejetos, observou-se maiores contagens de mesófilos (6,30 e 6,39 \log_{10} UFC/mL, respectivamente) (Tabela 13). Estes resultados estão de acordo com Müller (2002). Fontes de patógenos ambientais incluem estrume, cama, alimentos, poeira, lama e

água, principalmente (HOGAN e SMITH, 1997). Por isso, recomenda-se que os estábulos, salas de espera e salas de ordenha devem ter paredes, forrações e piso limpos, sendo considerados problemas de saúde pública (FDA, 2005a).

Em algumas propriedades que possuíam estábulos ao invés de salas de ordenha, foi possível constatar a presença de diversos animais soltos, como aves, cães e gatos domésticos. Este fato causa preocupação, uma vez que Tikofsky e Zadoks (2005) descreveram a transmissão de patógenos causadores de mastite para vacas através de gatos domésticos. No presente estudo, nas propriedades com higiene ambiental inadequada, observou-se animais de diversas espécies soltos, no ambiente coabitado pelas vacas em produção.

TABELA 13: CONTAGEM DE MESÓFILOS, PSICOTRÓFICOS, E CONTAGEM BACTERIANA TOTAL NAS AMOSTRAS DE LEITE CRU SEGUNDO O EFEITO DE HIGIENE AMBIENTAL (N= 816)

HIGIENE AMBIENTAL	MESÓFILOS (log ₁₀ UFC/mL)		PSICOTRÓFICOS (log ₁₀ UFC/mL)		CBT* (log ₁₀ UFC/mL)	
	média	Erro	média	Erro	média	Erro
	padrão		padrão		padrão	
adequada	6,10 ^a	0,108	5,54 ^a	0,120	5,13 ^a	0,061
parcialmente adequada	6,30 ^a	0,101	6,10 ^b	0,112	5,28 ^b	0,057
inadequada	6,39 ^b	0,120	6,22 ^c	0,132	5,36 ^b	0,068

* contagem bacteriana total, realizada por método eletrônico

**letras diferentes na mesma característica e na mesma coluna caracterizam resultados diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey (p< 0,05)

4.2.2 Temperatura de armazenamento do leite cru

A temperatura do leite armazenado sob refrigeração influenciou significativamente as médias das contagens de mesófilos, sendo que as propriedades que possuem refrigeradores de expansão e de imersão com temperaturas de armazenamento entre 3,1 e 6,0°C apresentaram contagens médias de mesófilos de 5,96 log₁₀ UFC/mL. As propriedades que não possuíam sistema apropriado de refrigeração, e que portanto utilizavam geladeiras e congeladores residenciais, apresentaram médias de 6,60-6,80 log₁₀ UFC/mL e 5,90 log₁₀ UFC/mL, respectivamente (Tabela 14). Apesar da menor contagem bacteriana, os

congeladores não são recomendados, por permitirem a formação de gelo, alterações nos resultados de crioscopia, e conseqüentemente lipólise.

A legislação estabelece que a temperatura do leite cru armazenado em tanques nas propriedades rurais, alcance 7°C em no máximo três horas após o final da ordenha (BRASIL, 2002), temperaturas maiores prejudicam e diminuem a qualidade do leite causando prejuízos irreparáveis (FONSECA e SANTOS, 2000). Das amostras estudadas, 288 (35,2%) apresentavam temperatura acima de 4°C no momento em que o caminhão-tanque transportador efetuou a coleta. O fato de os produtores rurais utilizarem refrigerador de uso residencial para armazenar leite cru causa grande preocupação, uma vez que trabalhos de Souza et al. (2008) relatam amostras de produtos comestíveis em geladeiras domésticas apresentando contaminação por *L. monocytogenes*.

Estudos conduzidos por Hartmann et al. (2008), demonstraram redução de 70% na contagem bacteriana total de leite de tanque, com conseqüente benefício na manutenção estável do pH, através de sistema rápido e eficiente de refrigeração imediatamente após a ordenha. Nas visitas técnicas às propriedades verificou-se que os termostatos dos refrigeradores de expansão e de imersão apresentam diferenças em relação à temperatura aferida. Das 34 propriedades estudadas, 16 (47%) armazenam o leite em temperaturas superiores a 6°C, e em 21 (61,7%) o recolhimento do leite pelas indústrias é realizado a cada 48 horas.

TABELA 14: CONTAGEM DE MESÓFILOS, PSICOTRÓFICOS, E CONTAGEM BACTERIANA TOTAL NAS AMOSTRAS DE LEITE CRU SEGUNDO O EFEITO DE TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO (N= 816)

TEMPERATURA DO LEITE ARMAZENADO (°C)	MESÓFILOS (log ₁₀ UFC/mL)		PSICOTRÓFICOS (log ₁₀ UFC/mL)		CBT* (log ₁₀ UFC/mL)	
	média	Erro padrão	média	Erro padrão	média	Erro padrão
0,1 a 3,0	5,90 ^a	0,150	6,37 ^a	0,166	5,15 ^a	0,085
3,1 a 6,0	5,96 ^a	0,102	5,90 ^b	0,113	5,24 ^{ab}	0,058
6,1 a 9,0	6,04 ^a	0,130	5,75 ^b	0,144	5,27 ^b	0,074
9,1 a 12,0	6,60 ^b	0,158	5,85 ^b	0,175	5,52 ^c	0,090
> que 12,1	6,80 ^c	0,151	5,98 ^b	0,167	5,62 ^c	0,085

* contagem bacteriana total, realizada por método eletrônico

**letras diferentes na mesma característica e na mesma coluna caracterizam resultados diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey (p< 0,05)

4.2.3 Práticas higiênicas no manejo da ordenha

Os produtores que adotaram as práticas preconizadas de higiene na ordenha - que incluem organizar a entrada das vacas na sala de ordenha segundo seu *status* de saúde da glândula mamária, lavar os tetos com água clorada, secar com papel toalha descartável, desprezar os três primeiros jatos de leite, realizar o teste da caneca telada, realizar a ordenha sem deixar leite residual e sem fazer sobre-ordenha, e ao final, realizar a pós-imersão dos tetos com solução anti-séptica – apresentaram as menores médias de mesófilos e psicotróficos (5,95 e 5,66 log₁₀ UFC/mL, respectivamente) (Tabela 15); aqueles que adotaram as práticas recomendadas, porém, não totalmente, apresentaram médias intermediárias (6,37 e 5,89 log₁₀ UFC/mL, respectivamente); e os que não seguem os aconselhamentos das áreas técnicas, a seu livre arbítrio, apresentaram as maiores médias (6,71 log₁₀ UFC/mL). Observa-se que parâmetros de higiene como limpeza das vacas, frequência da limpeza da sala de ordenha e uso apropriado de toalhas descartáveis para limpeza dos úberes são as medidas mais frequentemente relacionadas com a baixa contaminação do leite cru (SCHODER et al., 2003).

Em trabalhos conduzidos por Santana et al. (2001), a prática de utilizar água aquecida a aproximadamente 100°C para higienização dos copos coletores resultou em menores contagens de mesófilos e psicotróficos. Aplicando princípios de

higienização correta dos tetos das vacas antes da ordenha, dos latões e dos refrigeradores, e eliminação da água residual, Fagan et al. (2005) obtiveram significativos resultados em diminuição da contagem de mesófilos, com redução da média de $11,9 \times 10^6$ UFC/mL para $12,4 \times 10^3$ UFC/mL e da contagem de psicotróficos, de $18,1 \times 10^6$ UFC/mL para $5,3 \times 10^3$ UFC/mL.

TABELA 15: CONTAGEM DE MESÓFILOS, PSICOTRÓFICOS, E CONTAGEM BACTERIANA TOTAL NAS AMOSTRAS DE LEITE CRU SEGUNDO O EFEITO DE HIGIENE NA ORDENHA (N= 816)

PRÁTICAS DE HIGIENE NA ORDENHA	MESÓFILOS (log ₁₀ UFC/mL)		PSICOTRÓFICOS (log ₁₀ UFC/mL)		CBT* (log ₁₀ UFC/mL)	
	média	Erro padrão	média	Erro padrão	média	Erro padrão
adequadas	5,95a	0,153	5,66a	0,169	5,09a	0,086
parcialmente adequadas	6,37 b	0,148	5,89 b	0,093	5,26 b	0,084
inadequadas	6,71 c	0,084	6,28 c	0,164	5,43 c	0,047

* contagem bacteriana total, realizada por método eletrônico

**letras diferentes na mesma característica e na mesma coluna caracterizam resultados diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey (p< 0,05)

4.2.4 Limpeza dos copos coletores

As propriedades em que a contagem de mesófilos realizada a partir de esfregação de superfície dos insufladores apresentaram resultados inferiores a 10^1 UFC/mL, apresentaram as menores contagens de mesófilos ($5,99 \log_{10}$ UFC/mL) (Tabela 16). Por outro lado, nas propriedades que apresentaram insufladores com contagens da ordem de 10^4 UFC/mL, a contagem de mesófilos nas amostras de leite foram superiores ($6,66 \log_{10}$ UFC/mL). O mesmo se verifica na contagem de psicotróficos.

Os equipamentos de ordenha e vasilhames são a principal fonte de coliformes encontrados no leite cru. As altas contagens de coliformes no tanque estão relacionadas com a utilização de água a baixas temperaturas durante a lavagem dos equipamentos e devido a permanência de resíduos nos equipamentos durante as ordenhas (VILLAR et al., 1996). Este fator isoladamente foi responsável por 15,5%

de redução na contagem bacteriana total, constituindo-se no maior índice entre todos os fatores de variação estudados.

TABELA 16: CONTAGEM DE MESÓFILOS, PSICROTRÓFICOS, E CONTAGEM BACTERIANA TOTAL NAS AMOSTRAS DE LEITE CRU SEGUNDO O EFEITO DE LIMPEZA DOS COPOS COLETORES (N= 816)

LIMPEZA DOS COPOS COLETORES (UFC x cm ²⁻¹)	MESÓFILOS (log ₁₀ UFC/mL)		PSICROTRÓFICOS (log ₁₀ UFC/mL)		CBT* (log ₁₀ UFC/mL)	
	média	Erro padrão	média	Erro padrão	média	Erro padrão
≤ 10 ¹	5,99 ^a	0,119	5,74 ^a	0,132	4,86 ^a	0,107
10 ²	6,09 ^a	0,189	5,76 ^a	0,146	5,30 ^b	0,068
10 ³	6,31 ^b	0,132	5,88 ^b	0,209	5,47 ^c	0,047
≥ 10 ⁴	6,66 ^c	0,084	6,43 ^c	0,093	5,62 ^d	0,074

* contagem bacteriana total, realizada por método eletrônico

**letras diferentes na mesma característica e na mesma coluna caracterizam resultados diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey (p< 0,05)

4.2.5 Qualidade da água utilizada para limpeza dos equipamentos

Na área rural da região estudada, há produtores que dispõem de água tratada, e outros utilizam água de poços. Das propriedades estudadas, 16 (47,05%) utilizam água tratada de rede pública, 5 (14,7%) utilizam água de poço artesiano e 13 (38,23%) utilizam água de poço convencional.

A qualidade da água utilizada para lavar os equipamentos de ordenha influenciou as médias de mesófilos e psicotróficos. As propriedades que possuem poço artesiano apresentaram amostras com ausência de coliformes termotolerantes. Nestas a média de mesófilos nas amostras de leite foi de 5,67 log₁₀ UFC/mL, a média de psicotróficos foi de 5,43 log₁₀ UFC/mL, e a média de CBT foi de 4,91 log₁₀ UFC/mL. Nas propriedades abastecidas por água tratada da rede pública, a contagem de mesófilos média foi de 5,82 log₁₀ UFC/mL (Tabela 17). As propriedades que possuem poço convencional foram as que apresentaram as maiores médias de mesófilos, com 6,49-6,91 log₁₀ UFC/mL. A contagem de psicotróficos foi influenciada da mesma forma por esse efeito. Estes resultados estão de acordo com relatos de Barcellos et al. (2006) estudando a qualidade da

água em propriedades rurais de Minas Gerais, onde 93% apresentavam contagens de coliformes superiores ao padrão estabelecido pela legislação. Esta dispõe que deve haver ausência de coliformes termotolerantes em 100 mL (BRASIL, 1990).

TABELA 17: CONTAGEM DE MESÓFILOS, PSICROTRÓFICOS, E CONTAGEM BACTERIANA TOTAL NAS AMOSTRAS DE LEITE CRU SEGUNDO O EFEITO DE QUALIDADE DA ÁGUA UTILIZADA PARA A LIMPEZA DOS EQUIPAMENTOS (N= 816)

QUALIDADE DA ÁGUA UTILIZADA PARA A LIMPEZA DOS EQUIPAMENTOS (UFC coliformes totais/mL)	MESÓFILOS (log ₁₀ UFC/mL)		PSICROTRÓFICOS (log ₁₀ UFC/mL)		CBT* (log ₁₀ UFC/mL)	
	média	Erro padrão	média	Erro padrão	média	Erro padrão
	ausentes	5,67 ^a	0,152	5,43 ^a	0,168	4,91 ^a
< que 10 ³	5,82 ^a	0,078	5,54 ^a	0,087	5,28 ^b	0,044
10 ³ a 10 ⁴	6,49 ^b	0,084	6,17 ^b	0,093	5,35 ^b	0,047
> que 10 ⁴	6,91 ^c	0,024	6,69 ^c	0,266	5,56 ^c	0,138

* contagem bacteriana total, realizada por método eletrônico

**letras diferentes na mesma característica e na mesma coluna caracterizam resultados diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey (p< 0,05)

4.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Listeria monocytogenes*

Das 68 amostras de leite cru submetidas à pesquisa de *L. monocytogenes* em placa de agar-ALOA, duas (2,9%) apresentaram resultado positivo (Tabela 18). Estes resultados foram confirmados pela amplificação do gene *hlyA*, com a utilização do *primer* LL (Figura 1).

Estes resultados foram inferiores aos descritos por Van Kessel et al. (2004), que estudando a prevalência de bactérias zoonóticas em tanques refrigeradores nos Estados Unidos, encontraram taxa de 6,5% para *L. monocytogenes*. E foram semelhantes aos resultados encontrados por D'Amico et al. (2008) nos Estados Unidos, que isolaram *L. monocytogenes* em 3 amostras (2,3%) de um total de 133 amostras coletadas em 11 fazendas leiteiras.

Em estudos de Almeida et al. (2008), conduzidos com amostras de leite cru no Estado do Maranhão, foram isoladas colônias de *Listeria spp.* em 10% das amostras analisadas. Brito et al. (2008) relataram o isolamento de *L. monocytogenes*

em amostras de queijo Minas frescal comercializado em Minas Gerais, com confirmação por PCR.

TABELA 18: RESULTADOS DAS AMOSTRAS DE LEITE CRU, DIRETAMENTE DOS TANQUES REFRIGERADORES DE 34 PROPRIEDADES, EM AGAR-ALOA

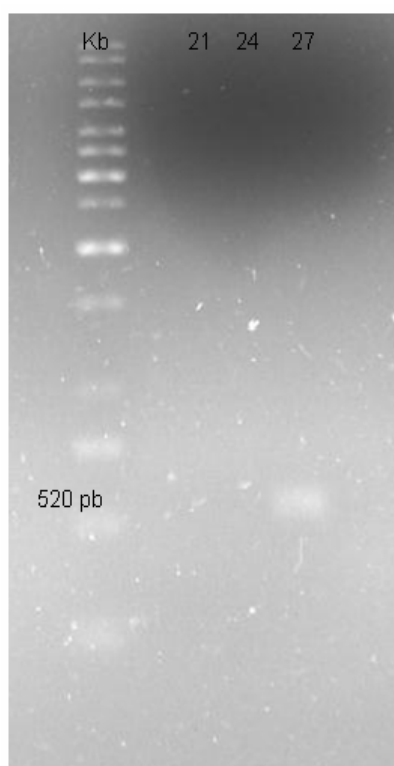
IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE	Ágar-ALOA®	
	outubro	dezembro
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	+ ^b	+ ^b
5	-	-
6	-	+ ^a
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	+ ^b	-
11	-	-
12	-	-
13	-	+ ^b
14	-	-
15	-	-
16	+ ^b	+ ^b
17	-	-
18	-	+ ^b
19	-	-
20	-	-
21	+ ^c	+ ^b
22	-	-
23	-	-
24	+ ^c	+ ^b
25	-	-
26	-	-
27	+ ^a	-
28	-	-
29	-	-
30	-	+ ^b
31	+ ^b	-
32	-	+ ^b
33	+ ^b	+ ^c
34	-	+ ^c

Nota: +, positivo; -, negativo; a, formação de halos; b, não houve formação de halos; c, halo pouco definido

A baixa incidência de *L. monocytogenes* em leite cru não impõe problema para leite pasteurizado nem produtos lácteos, mas é significativo para consumidores de leite cru (JAYARAO e HENNING, 2001). Este fato é preocupante, uma vez que no Estado do Paraná, 40% do leite produzido é consumido *in natura* (FAEP, 2004; FREITAS, 2008).

As características do método PCR, de alta especificidade, sensibilidade e acurácia, aliadas à rapidez do diagnóstico, são importantes para que as indústrias possam implantar programas de detecção, controle e prevenção contra a listeriose (CHURCHILL et al., 2006; LIU, 2008).

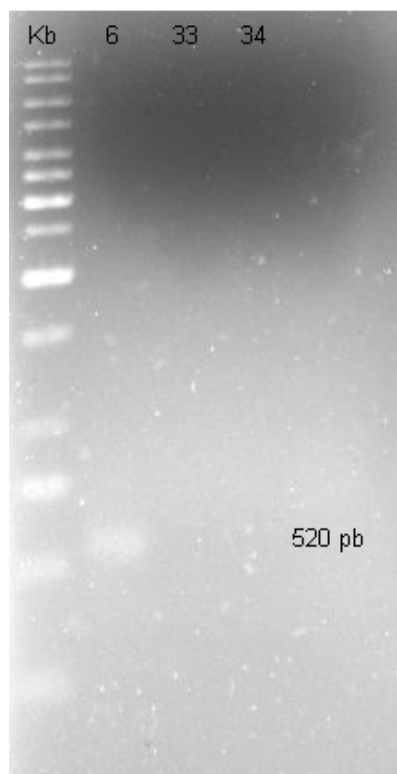
Nas coletas de amostras realizadas no mês de outubro, 5 amostras (nº 4, 10, 16, 31 e 33) apresentaram formação de colônias azuis em meio agar-ALOA, porém sem formação de halos, caracterizando não se tratar de *Listeria* patogênica. Estas foram submetidas à técnica PCR com *primer* 16S para identificar *Listeria spp.*, sendo que todas apresentaram resultado negativo. Outras 3 amostras (nº 21, 24 e 27) positivas para colônias azuis, uma com formação de halo (nº 27), e 2 com halo pouco definido (nº 21 e 24), foram submetidas a PCR com o *primer* LL. Destas, uma foi positiva, na propriedade 27 (Figura 1).



Kb : kilo-bases
pb: pares de bases

FIGURA 1: RESULTADO DO TESTE DE PCR DA AMOSTRAGEM REALIZADA NO MÊS DE OUTUBRO/2006 COM PRIMER LL.

Das coletas realizadas em dezembro, 8 amostras formaram colônias azuis em agar-ALOA sem desenvolver halos (nº 4, 13, 16, 18, 21, 24, 30 e 32). Foram negativas em PCR com *primer* 16S. Uma amostra que formou colônias azuis com halos (nº 6) e duas amostras que formaram colônias azuis com halos pouco definidos (nº 33 e 34), foram submetidas a PCR com *primer* LL. Destas, a primeira apresentou resultado positivo (Figura 2).



Kb: kilo-bases
pb: pares de bases

FIGURA 2: RESULTADO DO TESTE DE PCR DA AMOSTRAGEM REALIZADA NO MÊS DE DEZEMBRO/2006 COM PRIMER LL.

As amostras analisadas, em que houve formação de colônias azuis em agar-ALOA, com formação de halos, foram positivas para *L. monocytogenes*, sugerindo ser uma técnica eficiente se bem conduzida.

A propriedade nº 27 apresentou resultado positivo para *L. monocytogenes* em agar-ALOA e na técnica de PCR. Nesta propriedade foi observado que a higiene ambiental é inadequada, com grandes áreas de formação de barro, onde as vacas deitam. Na saída da sala de ordenha, as vacas passam por uma área sempre encharcada, onde há acúmulo de barro e fezes. O produtor não possui sistema de

resfriamento adequado, e o leite permanece em um vasilhame na geladeira de uso familiar. O recolhimento do leite é a cada dois dias, e a produção diária é de 15 litros. A ordenha é manual, e há falhas nas práticas de higiene, com ausência de sanitizantes na lavagem dos tetos. A análise microbiológica de superfície dos insufladores apresentou 10^4 UFC/mL, revelando considerável falha na higienização dos equipamentos de ordenha.

Na propriedade rural nº 6, cuja amostra do mês de dezembro apresentou resultado positivo para *L. monocytogenes* em agar-ALOA e na técnica de PCR, o trabalho efetuado por ocasião das visitas técnicas demonstrou que a higiene ambiental é inadequada (lixo, entulhos, dejetos, vazamentos de bebedouros), os procedimentos de ordenha são parcialmente adequados (não há ordem estabelecida para a entrada das vacas na sala de ordenha), os insufladores apresentaram 10^4 UFC/mL (há falhas na higienização dos equipamentos de ordenha). Esta propriedade possui resfriador de expansão, mas este não consegue manter a temperatura do leite abaixo de 6°C.

O fato de *L. monocytogenes* ter sido isolada em leite cru refrigerado, tendo em vista sua classificação como microrganismo emergente de baixa prevalência mas de alta letalidade, e considerando-se também o alto índice de consumo de leite não pasteurizado, causa grande preocupação para o segmento de lácteos.

Os resultados apresentados mostram que persistem os problemas relacionados ao leite cru refrigerado na região oeste do Paraná. Em muitas propriedades observa-se haver falta de recursos para investimento em estrutura, que viesse a resultar em melhores condições de produção. A remuneração do leite aos produtores não é suficiente para auferir estes recursos necessários.

5. CONCLUSÕES

As propriedades pesquisadas constituem-se em 5,8% como excelentes, 17,6% como boas, 47,0% como regulares e 29,4% como precárias de acordo com a classificação higiênico-sanitária proposta.

Nas propriedades em que o leite permanece sob refrigeração sob temperaturas acima de 6,1°C, encontrou-se as maiores contagens médias de mesófilos, acima de 6,04 log UFC/mL.

Do total de amostras, 25,18% estavam fora dos limites de 1.000.000 UFC/mL para contagem bacteriana total e 29,33% acima de 750.000 UFC/mL. E quanto à contagem de células somáticas, 13,93% estavam acima do limite de 1.000.000 células/mL e 29,21% estavam acima de 750.000 células/mL.

A análise microbiológica de superfície dos copos coletores das ordenhadeiras apresentou média de $9,2 \times 10^2$ UFC/mL.

Em 68,75% das amostras de água utilizada para limpeza dos equipamentos de ordenha, provenientes de poços, foram isoladas colônias de coliformes termotolerantes, e apresentaram contagem média de 17 UFC/mL.

Em duas propriedades, com os padrões higiênico-sanitários classificados como precários, foi identificada a presença de *Listeria monocytogenes*. Os resultados permitem afirmar que *L. monocytogenes* deve ser pesquisada em amostras de leite cru, e que esta constitui um importante indicador de segurança alimentar.

O presente estudo demonstrou que propriedades onde há falhas de conduta em termos de limpeza ambiental e higiene da ordenha há maior probabilidade de se verificar a presença de *L. monocytogenes* no leite cru.

Os resultados apresentados demonstram a necessidade de uma padronização nos sistemas de resfriamento utilizados nas propriedades, com dimensionamento correto dos equipamentos.

RECOMENDAÇÃO

Tendo em vista as conseqüências graves a que as pessoas estão sujeitas, as indústrias de laticínios deveriam estabelecer monitoramento sobre a prevalência deste patógeno nos rebanhos, com acompanhamento das suas áreas técnicas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, V.M.; ALVES, L.M.C.; COSTA, F.N. Condições higiênico-sanitárias do leite in natura e pasteurizado tipo C provenientes da bacia leiteira do médio Mearim-MA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA QUALIDADE DO LEITE, 3. **Anais**. Recife, 2008.

ANDRADE, U.V.C. Fatores ambientais sobre a produção total de leite, gordura e proteína em vacas da raça Holandesa na bacia leiteira de Castrolanda, Estado do Paraná. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná. 51 p., 2002.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 275, de 21 de outubro de 2002. Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. 2002.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Produtos de Origem Animal. PAMvet. Relatório 2002/2003. Monitoramento de resíduos em leite exposto ao consumo. Brasília: ANVISA, 2005.

ARBEITGEMEINSCHAFT DEUTSCHER RINDERZÜCHTER. Durchschnittsleistungen 2008. Disponível em: <http://www.adr-web.de>. Acesso em 22.01.2009.

AURORA, R.; PRAKASH, A.; PRAKASH, S.; RAWOOL, D.B.; BARBUDDHE, S.B. Comparison of PI-PLC based assays and PCR along with *in vivo* pathogenicity tests for rapid detection of pathogenic *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 19, cap. 7, 2008, P. 641-647.

BARCELLOS, C.M.; RODRIGUES, L.S. Avaliação da qualidade da água e percepção higiênico-sanitária na área rural de Lavras, MG. **Caderno de Saúde Pública**, v. 22, n. 9, p. 1967-1978, 2006.

BENTLEY INSTRUMENTS INC. *Somacount 300 Operator's Manual*. Chaska: Bentley Instruments Inc., 1997. 116 p.

BENTLEY INSTRUMENTS INC. *Bentley 2000 Operator's Manual*. Chaska: Bentley Instruments Inc., 1998. 79 p.

BENTLEY INSTRUMENTS INC. *Bactocount 150 Operator's Manual*. Chaska: Bentley Instruments Inc., 2002. 49 p.

BLAIS, B.W.; PHILLIPPE, L.M. Identification of presumptive positive *Listeria monocytogenes* from foods and environmental samples by the polymerase chain reaction. **Health Canada's**. Laboratory Procedure. 2003.

BRAGA, G.G.; BRIETZKE, A.L.; ARAÚJO, J.S.; GARCIA, R.C.; PEIXOTO, E.C.T.M. Contagem de células somáticas em leite formal de produtores de Marechal Cândido Rondon-PR. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 3, p. 80-85, ISSN: 1517-784X. 2006.

BRASIL. Portaria n. 36 do Ministério da Saúde, de 19 de janeiro de 1990. Diário Oficial da União. 1990.

BRASIL. **Normas de Lácteos**. Editora Milkbizz, São Paulo, 2001.

BRASIL. Instrução normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade, coleta e transporte de leite. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Secretaria de Inspeção de Produto Animal, 2002, 39 p.

BRESSAN, M.; MARTINS, M.C. Segurança alimentar na cadeia produtiva do leite e alguns de seus desafios. **Revista de Política Agrícola**. Ano XIII - Nº 3 - Jul./Ago./Set. 2004.

BRITO, J.R.F.; LANGE, C.C.; BRITO, M.A.V.P.; ARCURI, E.F.; SOUZA, G.N.; SILVEIRA, D.M.C.; ABREU, A.N.I.; SANT'ANA, A.P. Prevalência de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* em queijo Minas frescal na região de Juiz de Fora-MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA QUALIDADE DO LEITE, 3. **Anais**. Recife, 2008.

BRUM, J.V.F. **Análise de perigos e pontos críticos de controle em indústria de laticínios de Curitiba-PR**. (Dissertação de Mestrado). PPGTA-UFPR. Universidade Federal do Paraná, 2004. 129 p.

BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.; NICOLAU, E.S.; OLIVEIRA, A.N.; NEVES, R.B.S.; MANSUR, J.R.G.; OLIVEIRA, J.P. Contagem celular somática, contagem bacteriana total e composição centesimal do leite cru, refrigerado em tanques de expansão de uso individual, no estado de Goiás. Congresso Nacional de Laticínios, 22. **Anais**...Juiz de Fora, 2004. p. 417-420.

BULL, M.K.; HAYMAN, M.M.; STEWART, C.M.; SZABO, E.A.; KNABEL, S.J. Effect of prior growth temperature, type of enrichment medium, and temperature and time of storage on recovery of *Listeria monocytogenes* following high pressure processing milk. **International Journal of Food Microbiology**, n. 101, p.53, 2005.

BUSSE, M. **Qualitätssicherung in der Milchwirtschaft**. Nachweis von Listerien. Institut für Mikrobiologie. Technische Universität München, Weihenstephan. Verlag Th. Mann KG, Gelsenkirchen. 2000.

CASSOLI, L.D.; MACHADO, P.F.; SILVA, A.C.L.; ARAÚJO, V.M.; ZAMPAR, A. Impacto de programas de valorização da qualidade sobre a CBT e CCS do leite. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA QUALIDADE DO LEITE, 3. **Anais**. Recife, 2008.

CARTER, G.R.; CHENGAPPA, M. M.; ROBERTS, A.W. **Essentials of Veterinary Microbiology** – 5a. ed. Williams & Wilkins, 1995, 393 p. E. U. A.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Outbreak of *Listeria monocytogenes* infections associated with pasteurized milk from a local dairy – Massachussets, 2007. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. v. 57 (40) p. 1097-1100, 2008.

CHAN, Y.C.; BOOR, K.J.; WIEDMANN, M. Sigma β -dependent and sigma β -independent mechanisms contribute to transcription of *Listeria monocytogenes* cold stress genes during cold shock and cold growth. **Applied and Environmental Microbiology**, 73(19), p. 6019–6029, 2007.

CHEN, H; HOOVER, D.G. Modeling the combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v. 4, p. 25-34, 2003.

CHAPAVAL, L.; PIEKARSKI, P.R.B. **Leite de Qualidade**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2000. 195 p.

CHURCHILL, R.L.T.; LEE, H.; HALL, J.C. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. **Journal of Microbiological Methods**. v. 64, p. 141-170, 2006.

CLESCERI, L.S.; GREENBERG, A.E.; EATON, A.D. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 20a. ed., American Public Health Association: Washington D.C., 1998.

COELHO, P.S.; SILVA, N.; BRESCIA, M.V. Avaliação da qualidade microbiológica do leite UAT integral comercializado em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol.53, no.2, p.1-7. ISSN 0102-0935. Belo Horizonte, 2001.

CZAJKA, J.; BSAT, N.; PIANI, M.; RUSS, W.; SULTANA, K.; WIEDMANN, M.; WHITAKER, R.; BATT, C. A. Differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by 16S rRNA genes and intraspecies discrimination of *Listeria monocytogenes* strains by random amplified polymorphic DNA polymorphisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 304-308, 1993.

D'AMICO, D.J.; GROVES, E.; DONNELLY, C.W. Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw Milk utilized for farmstead cheese production. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 8, p. 1580-1589. 2008.

DHIA - DAIRY HERD IMPROVEMENT ANALYSIS. **Annual summaries**. Califórnia 2007. Disponível em < http://www.cdhia.org/Annual_Summaries/index.html > Acesso em 16.01.2009.

DIMAIO, H. Listeria infection in women. **Primary Care Update for Obstetricians and Gynecologists**-Elsevier. v. 7, n. 1, 2000.

FAEP. Federação da Agricultura do Paraná. Bases para a consolidação e diversificação do segmento agroindustrial do leite no Paraná. 2004.

FAGAN, E.P.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; MÜLLER, E.E.; NERO, L.A.; SANTANA, E.H.W.; VACARELLI, E.R.; SILVA, L.C.; PEREIRA, M.S. Avaliação e implantação de boas práticas nos principais pontos de contaminação microbiológica na produção leiteira. **Semina**. UEL. v. 26, n. 1, 2005.

FAGUNDES, C.M. **Identificação de *Pseudomonas fluorescens*, *P. fragi*, *P. aeruginosa*, *P. putida* no leite bovino em propriedades com distintos manejos higiênicos**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pelotas, 2004.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2005a. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Centers for Disease Control and Prevention. *Reducing the Risk of Listeria monocytogenes FDA/CDC 2003 Update of the Listeria Action Plan*.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2005b. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Centers for Disease Control and Prevention. *Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne Listeria monocytogenes among selected categories of ready-to-eats products*.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2006. Center for Food Safety and Applied Nutrition. *Rapid Methods for Detecting Foodborne Pathogens*.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2007. Center for Food Safety and Applied Nutrition. *Listeria monocytogenes*. Bad Bug Book.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2008. Food Agency and Inspection Service. U.S. Department of Agriculture. **Food Safety**, Healthy People 2010. p. 10/4. FONSECA, L. F. L; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000.175 p.

FPLQ - FEDERACION DES PRODUCTEURS LAITIERS DU QUEBEC, 2008. **Rapport annuel**. Disponível em < <http://www.lait.org/zone4/index3.asp> > Acesso em 17.01.2009.

FRANCE CONTROLE LAITIER ET L'INSTITUT DE L'ELEVAGE 2008. **Rapport annuel**. Disponível em < <http://www.inst-elevage.asso.fr/html1> > Acesso em 12.01.2009.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 182 p.

FREITAS, M.R. Brasileiro consome 30% de leite sem qualquer inspeção. 2008. Disponível em: <http://www.oesteinforma.com.br/news.php?news=31416>. Acesso em 26.02.09.

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P.M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 851-875. 2004.

GOLDSTEYN THOMAS, E. J.; KING, R. K.; BURCHAK, J.; GANNON, V. P. J. Sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* in milk and ground beef with the polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2576-2580, 1991.

GONZALEZ, H.L.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R; STUMPF JR.,W.; GOMES, J.F.; FAGUNDES, C.F.; SILVA, M.A. Comparação da qualidade do leite em diferentes sistemas de produção da bacia leiteira de Pelotas, RS. **Revista Brasileira de Agociência**, v. 12, n. 4, p.475-482, 2006.

GOUWS, P. A.; LIEDEMANN, I. Evaluation of Diagnostic PCR for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Food Products. **Food Technologic Biotechnology** 43 (2), 201-205, 2005.

GOUNOT, A.M. **Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms**. Nederlands Melk em Zuiveltijds, Chicago, n. 42, p. 1192-1197. 1986.

HARTMANN, W. Fomento à produção realizado no oeste do Paraná. **Revista Gado Holandês**, São Paulo, n. 407, p. 80, 1992.

HARTMANN, W.; RIBAS, N. P.; ANDRADE, U. V. C. Porcentagem de sólidos não gordurosos no leite, em amostras de tanque, suas variações e correlações. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39. **Anais...** Recife, 2002.

HARTMANN, W.; REIS, F.R.; MASSON, M. L. Plates' pre-cooling enhances preservation of raw Milk on farm level: a way to improve brazilian milk quality. **Ars Veterinaria**, v. 24, n. 2, 2008.

HARVEY, J.; KEENAN, K.P.; GILMOUR, A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. **Food Microbiology**. v. 25, p. 75-84, 2007.

HITCHINS, A. D. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. FDA. Bacteriological Analytical Manual Online. 2003.

HOGAN, J.S.; SMITH, K.L. **A practical look at environmental mastitis**. National Mastitis Council, factsheet 10, 1997.

HORST, J.A. **Impacto da refrigeração na contagem bacteriana do leite**. In: Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil. Goiânia: Talento, 2006.

INPPAZ - INSTITUTO PAN AMERICANO DE PROTEÇÃO DE ALIMENTOS. ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DA SAÚDE. **HACCP: Instrumento essencial para a inocuidade de alimentos**. Buenos Aires, Argentina: OPAS/INPAAZ, Bireme, 2001, 333 p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. 2004. International Dairy Federation/Food and Agriculture Organization. Guide for good dairy farming practice. Rome, 2004.

IPARDES-EMATER. Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. **Caracterização socioeconômica da atividade leiteira no Paraná**. 183 p. 2008.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. Cap. 25, 6ª. ed., Porto Alegre: Artmed. 2005.

JAYARAO, B. M.; HENNING, D.R. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**. v. 84, p. 2157-2161, 2001.

JAYARAO, B.M.; PILLAI, S.R.; SAWANT, A.A.; WOLFGANG, D.R.; HEGDE, N.V. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. **Journal of Dairy Science**. v. 87, p. 3561-3573, 2004.

KELTON, D.; GODKIN, A. Mastitis culture programs for dairy cows. In: Annual meeting of National Mastitis Council, 39. **Proceedings**. P. 54-62. 2000.

KOEHLER, J.C. **Diagnóstico da cadeia produtiva do leite da região oeste do Paraná**, Secretaria de Estado da Agricultura- DERAL. 2001. 40p.

KOSEKI, S.; MIZUNO, Y.; YAMAMOTO, K. Use of mild-heat treatment following high-pressure processing to prevent recovery of pressure-injured *Listeria monocytogenes* in Milk. **Food microbiology**, v. 25, p. 288-293. 2008.

LITTLE, C.L.; RHOADES, J.R.; SAGOO, S.K.; HARRIS, J.; GREENWOOD, M; MITHANI, V.; GRANT, K.; MCLAUHLIN, J. Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. **Food Microbiology**, v. 25, p. 304-312, 2008.

LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 645–659, 2006.

LIU, D. Preparation of *Listeria monocytogenes* specimens for molecular detection and identification. **International Journal of Food Microbiology**. v. 122, p. 229-242, 2008.

LORENZETTI, D.K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrófilos no leite cru de dois estados da região sul**. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Paraná. 2006. 71 p.

LUNDEN, J.; TOLVANEN, R.; KORKEALA, H. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. **Journal of Dairy Science**. v. 87 (E6-E11), 2004.

McLAUCHLIN, J.; MITCHELL, R. T.; SMERDON, W. J.; JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: A review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, 92(1), 15–33. 2004.

MÜLLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 2. **Anais...**, p. 206-217. Maringá, 2002.

NASCIMENTO, I.R.; CRUZ, V.R.; SÁ, C.O. Efeito do armazenamento e do transporte na qualidade do leite. CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 22. **Anais...**Juiz de Fora, 2004. p. 283-286.

NEIVA, A.C.G.R.; NEIVA, J.N.M. **Do campus para o campo**. Tecnologias para a produção de leite. Fortaleza: Expressão Gráfica e Editora Ltda., 2006. 320 p.

NEVES, M.V.O.; NETO, L.G.G.; SOUZA, M.R.; PENNA, C.F.A.M.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; REIS, S.R.; CORREA, J.A.N. Parâmetros físico-químicos e contagem de células somáticas de leite cru individual no estado de Minas Gerais. Congresso Nacional de Laticínios, 22. **Anais...**Juiz de Fora, 2005. p. 239-242.

OLIVEIRA, R. P. S.; GALLO, C. R. Condições microbiológicas e avaliação da pasteurização em amostras de leite comercializadas no município de Piracicaba, SP. **Revista Higiene Alimentar**, v. 22, n. 161, p. 112-115, São Paulo, 2008.

PAULA, M.C.; RIBAS, N.P.; MONARDES, H.G.; ARCE, J.E.; ANDRADE, U.V.C. Contagem de células somáticas em amostras de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 5, 2004.

PORTUGAL, E.F.; BOTELHO, M. Estudo de caso: plano de desenvolvimento da bacia leiteira 1989/1999. Sudcoop. In: CASTRO, M.C.D.; PORTUGAL, J.A.B. **Perspectivas e avanços em laticínios**. Juiz de Fora: EPAMIG – ILCT, 2000.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

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

SANTOS, M.V. Boas práticas de produção associadas à higiene de ordenha e qualidade do leite. In: O Brasil e a nova era do mercado do leite. Piracicaba-SP: Agripoint, 2007, v. 1, p. 135-154.

SANTOS, D. Influência da temperatura durante o transporte, na qualidade microbiológica do leite recebido por uma indústria de laticínios no planalto catarinense. Dissertação de Mestrado (Inspeção de Produtos de Origem Animal). 80f. Programa Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária, Porto Alegre – UFRGS. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 30, p. 67-68, 2002.

SANTOS, M.V; FONSECA, L.F.L. Importância e efeito de bactérias psicrotóxicas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 82, p. 13-19, São Paulo, 2001.

SANTOS, M.V; FONSECA, L.F.L. Granelização e qualidade do leite. **Curso on-line sobre qualidade do leite**, 2., Módulo 12. Instituto Fernando Costa – Milkpoint, 2002.

SECRETARIA DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO – ESTADO DO PARANÁ- Departamento de Economia Rural. Análise da Conjuntura Agropecuária-Leite. SEAB : Curitiba, 2008. 13 p.

SCHODER, D.; WINTER, P.; KAREEM, A.; BAUMGARTNER, W.; WAGNER, M. A case of sporadic ovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes* and its effect on contamination of raw milk and raw milk cheeses produced in the on-farm dairy. **Journal of Dairy Research**, n. 70, p. 395, 2003.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997.

SOUZA, V.M.; FRANCESCHINI, S.A.; MARTINEZ, R.C.R.; RATTI, R.P.; DE MARTINIS, E.C.P. Survey of *Listeria* spp. in matched clinical, food and refrigerator samples at home level in Brazil. **Food Control**, v. 19, p. 1011-1013, 2008.

SUTHERLAND, P.S.; MILES, D.W.; LABOYRIE, D.A. *Listeria monocytogenes*. In: HOCKING, A.D. **Foodborne Pathogens of Public Health Significance**, 6^a. ed. Food Microbiology Group, Sydney, Australia, p. 381. 2003.

TIKOFISKY, L.L.; ZADOKS, R.N. Cross-infection between cats and cows; origin and control of *Streptococcus canis* mastitis in a dairy herd. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 2707-2713, 2005.

VANEGAS, M. C.; VÁSQUEZ, E.; MARTINEZ, A. J.; RUEDA, A. M. Detection of *Listeria monocytogenes* in raw whole milk for human consumption in Colombia by real-time PCR. **Food Control** 20 (2009) 430–432.

VAN KESSEL, J.S.; KARNS, J.S.; GORSKI, L.; MCCLUSKEY, B.J.; PERDUE, M.L. Prevalence of *Salmonellae*, *L. monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 2822-2830, 2004.

VIEIRA, L.C.; VEIGA, J.B.; FREITAS, C.M.K.H. Qualidade do leite na bacia leiteira de Castanhal: resultados de pesquisas e recomendações. **Comunicado Técnico Embrapa**, v. 85, 2003.

VILAR, M.J.; YUS, E.; SANJUAN, M.L.; DIEGUEZ, F.J.; RODRIGUEZ-OTERO, J.L. Prevalence and risk factors for *Listeria* species on dairy farms. **Journal of Dairy Science**. v. 90, p. 5083-5088, 2007.

VILLAR, A.; GARCIA, J.A.; IGLESIAS, L.; GARCIA, M.L.; OTERO, A. Application of principal component analysis to the study of microbial populations in refrigerated raw Milk from farms. **International Dairy Journal**, v.6, p. 937-945, 1996.

WINDRANTZ, P.; ARIAS, M.L. Evaluation of the bacteriological quality of ice cream sold at San Jose, Costa Rica. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 50(3), p. 301-303, 2000.

WHITTEMORE, C.T. **A vaca leiteira-técnicas de lactação**. Livraria Martins Fontes, Editora Proença, Lisboa, 3^A. edição, 1981.

ZANELA, M.B.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.R.; STUMPF JR, W; ZANELA, C.; MARQUES, L.T.; MARTINS, P.R.G. Qualidade do leite em sistemas de produção na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.1, p.153-159, 2006.

ZANELA, M.B.; BORGES, K.A.; REICHERT, S. Avaliação da qualidade do leite nas propriedades da região do vale do Taquari. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA QUALIDADE DO LEITE, 3. **Anais**. Recife, 2008.

APÊNDICE 2 – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

CAMPO A- IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE

Nome do produtor:

Localização:

Município:

Área:

CAMPO B – AVALIAÇÃO

Bloco 1: Instalações

	Não conformidade	Conformidade parcial	Conformidade
ÁREA EXTERNA			
Ausência de focos de contaminação na área externa; área livre de focos de insalubridade, de objetos em desuso ou estranhos ao ambiente, de outras espécies animais, de inclusive insetos e roedores; ausência de poeira; ausência de dejetos e lixo; ausência de água estagnada.			
PISO			
Material que permite fácil e apropriada limpeza e em adequado estado de conservação (livre de defeitos, rachaduras, trincas e buracos).			
TETO			
Acabamento de fácil limpeza, em adequado estado de conservação (livre de umidade, bolor, descascamentos).			
PAREDES			
Acabamento liso, lavável, em adequado estado de conservação (livre de falhas, rachaduras, umidade).			
ILUMINAÇÃO			
Adequada à atividade desenvolvida.			
VENTILAÇÃO			
Ventilação e circulação de ar capazes de garantir o conforto térmico.			
HIGIENE DAS INSTALAÇÕES			
Freqüência de higienização das instalações adequada e suficiente.			
Produtos de higienização necessários à realização das operações.			

Produtos de higienização identificados e guardados em local adequado.			
ABASTECIMENTO DE ÁGUA			
Sistema de abastecimento de água ligada à rede pública.			
Apropriada frequência de higienização do reservatório de água.			

Bloco 2- Equipamentos de ordenha e utensílios

	Não conformidade	Conformidade parcial	Conformidade
EQUIPAMENTOS DE ORDENHA			
De superfície lisa, íntegros, laváveis, impermeáveis, resistentes à corrosão, de fácil limpeza e de material não contaminante.			
Em adequado estado de conservação e funcionamento.			
Resfriadores com adequada higiene e funcionamento.			
UTENSÍLIOS			
Material não contaminante, resistentes à corrosão, de tamanho e forma que permitam fácil limpeza e em adequado estado de conservação.			
Higienização adequada.			
Armazenados em local apropriado, de forma organizada e protegidos de contaminação.			

Bloco 3 – Observação das práticas de higiene da ordenha

	Não conformidade	Conformidade parcial	Conformidade
MANEJO DA ORDENHA			
Estabelecimento da ordem de entrada das vacas na sala de ordenha, de acordo com a saúde da glândula mamária.			
Correto preparo dos animais antes e após a ordenha.			