

UFRRJ

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

DISSERTAÇÃO

**Detecção rápida de Psicrotróficos em Leite e
Monitoramento de *Listeria* spp. no Ambiente de
Processamento de Laticínios**

Cláudia Guerreiro da Silva

2006



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**DETECÇÃO RÁPIDA DE PSICOTRÓFICOS EM LEITE E
MONITORAMENTO DE *LISTERIA* spp. NO AMBIENTE DE
PROCESSAMENTO DE LATICÍNIOS**

CLÁUDIA GUERREIRO DA SILVA

Sob a Orientação da Professora

Rosa Helena Luchese

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção
do grau de **Magister
Scientiae** em Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Seropédica, RJ
Setembro de 2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

CLÁUDIA GUERREIRO DA SILVA

Dissertação submetida ao Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Ciência, como requisito parcial para obtenção do grau de *Magister Scientiae*, em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Dissertação defendida em 29/09/2006

Rosa Helena Luchese (Dra.) - DTA/IT/UFRRJ
(Orientador)

Ernesto Hofer (Dr.) - Dep. Bacteriologia/FIOCRUZ

Miliane Moreira Soares de Souza (Dra.) - DMIV/IV/UFRRJ

José Francisco Pereira Martins (Dr.) - DTA/IT/UFRRJ

Dedico esta dissertação à minha mãe e
melhor amiga Waldemice (em memória),
minha saudade eterna. Com ela aprendi a
vencer os desafios.

AGRADECIMENTOS

- A Deus que me deu muita força e coragem para alcançar meus objetivos;
- Ao meu amor Adriano pelo apoio incondicional em todos os momentos;
- Aos meus irmãos Alexandre e Denise pelo apoio e carinho;
- Ao Diretor Pedro Paulo Oliveira pelo incentivo e confiança no meu trabalho;
- À Professora Arlene Gaspar pela amizade e motivação de sempre;
- À Professora Rosa Helena Luchese pela confiança, oportunidade, respeito, incentivo, aprendizado e pela tranquilidade transmitida, necessária nos momentos mais difíceis;
- À técnica Ediná Rodrigues, exemplo de profissionalismo e caráter, pelo total apoio e ajuda nas atividades laboratoriais;
- À aluna Miriam Gomes Abreu pela participação e dedicação ao trabalho;
- Ao Fiscal Agropecuário Ralf Augusto do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que nos possibilitou as coletas de amostras nas indústrias;
- Aos proprietários, responsáveis e técnicos das indústrias pela atenção, receptividade e compreensão da importância deste trabalho;
- Ao Instituto Vital Brazil e Laboratório de Bacteriologia – Pesagro - RJ pelo fornecimento de suplemento necessário a uma etapa da pesquisa;
- À FIOCRUZ por ceder as culturas ATCC, especialmente ao Dr. Ernesto Hofer pelo fornecimento de isolados de sua coleção e realização de algumas análises;
- À CAPES pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Escala de intensidade de cor. (+) fraco; (++) moderado; (+++) forte	12
Figura 02: Fluxograma de Análise de <i>Listeria</i> spp	15
Figura 03: Crescimento das psicrotróficos <i>P. fluorescens</i> e <i>L. innocua</i> e do mesófilo <i>E. coli</i> em leite mantido a 7°C / 72horas.	17
Figura 04: Nível inicial de contaminação dos psicrotróficos <i>P. fluorescens</i> e <i>L. innocua</i> e do mesófilo <i>E. coli</i> para detecção por redução do TTC em leite mantido a 7°C / 120 horas	18
Figura 05: Limite de detecção de psicrotróficos Gram-negativos e interferentes (<i>P. fluorescens</i>), pelo método de redução do TTC em presença de diferentes inibidores de Gram-positivos (BC - cloreto de benzalcônio; Ceftriaxona e Sal biliar)	19
Figura 06: Limite de detecção de psicrotróficos Gram-negativos e interferentes (<i>Listeria innocua</i>), pelo método de redução do TTC em presença de diferentes inibidores de Gram-positivos (BC - cloreto de benzalcônio; Ceftriaxona e Sal biliar)	19
Figura 07: Limite de detecção de psicrotróficos Gram-negativos e interferentes (<i>E. coli</i>), pelo método de redução do TTC em presença de diferentes inibidores de Gram-positivos (BC - cloreto de benzalcônio; Ceftriaxona e Sal biliar)	20
Figura 08: Crescimento de <i>E. coli</i> na presença de TTC e BC a 35°C	21
Figura 09: Limite de detecção de psicrotróficos Gram-positivos e interferentes (<i>P. fluorescens</i>), pelo método de redução do TTC em presença de diferentes inibidores de Gram negativos (azida sódica e ácido nalidíxico)	21
Figura 10: Crescimento de <i>P. fluorescens</i> na presença de TTC e ácido nalidíxico a 30°C	22
Figura 11: Limite de detecção de psicrotróficos Gram-positivos e interferentes (<i>E. coli</i>), pelo método de redução do TTC em presença de diferentes inibidores de Gram negativos (azida sódica e ácido nalidíxico)	22
Figura 12: Limite de detecção de psicrotróficos Gram-positivos e interferentes (<i>Listeria innocua</i>), pelo método de redução do TTC em presença de diferentes inibidores de Gram negativos (azida sódica e ácido nalidíxico)	23
Figura 13: Crescimento de <i>L. innocua</i> na presença de TTC e ácido nalidíxico a 30°C	23

LISTA DE TABELAS

Quadro 01: Efeitos na qualidade de produtos lácteos com crescimento de psicotróficos no leite cru antes do tratamento térmico	05
Tabela 01: Distribuição dos pontos de amostragem nos laticínios	10
Tabela 02: Crescimento das culturas <i>P. fluorescens</i> , <i>E. coli</i> e <i>L. innocua</i> em meio não seletivo (PCA), em meios seletivos (ágar F e VRBA) em cultivo axênico e como cultura mista em meio não seletivo diferencial (PCA-ANS)	16
Tabela 03: Determinação quantitativa de psicotróficos por NMP em leite com TTC e por contagem em placas de ágar para psicotróficos e ágar PCA.	24
Tabela 04: Pontos de amostragem onde houve crescimento nos meios de enriquecimento primário e secundário e presença de colônias típicas em pelo menos um dos ágares seletivos	25

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	01
2.REVISÃO DE LITERATURA	02
2.1 Ecologia Microbiana do Leite	02
2.2 Microbiota psicrotrófica do leite	03
2.3 Testes para detecção de psicrotróficos	04
2.4 O gênero <i>Pseudomonas</i> spp.: Impactos na qualidade do leite e derivados	04
2.5 O gênero <i>Listeria</i> spp	06
2.5.1 <i>Listeria monocytogenes</i> e impactos na saúde pública	06
2.5.2 Incidência de <i>Listeria</i> spp. em leite e ambiente de processamento de laticínios	07
2.5.3 Métodos convencionais – fenotípicos de isolamento de <i>Listeria</i> spp	07
3.MATERIAL E MÉTODOS	09
3.1 Materiais	09
3.1.2 Pontos de amostragem utilizados para pesquisa de <i>Listeria</i> spp	10
3.2 Métodos	11
3.2.1 Condições de cultivo dos microrganismos	11
3.2.2 Recuperação de <i>Pseudomonas</i> , <i>Listeria</i> e <i>E. coli</i> em PCA, PCA-ANS e em meios seletivos	11
3.2.3 Utilização do reagente fluorogênico 8-anilino-1 naftaleno sulfônico (ANS) em substituição ao 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)	11
3.2.4 Avaliação do crescimento de <i>P. fluorescens</i> , <i>L. innocua</i> e <i>E. coli</i> em leite UHT em temperatura de 7°C	12
3.2.4.1 Por contagem em Ágar Padrão para Contagem	12
3.2.4.2 Por visualização da redução do 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)	12
3.2.5 Desenvolvimento de método rápido para detecção de psicrotróficos gram-negativos	12
3.2.5.1 Determinação do limite de detecção e de seletividade do método	13
3.2.6 Desenvolvimento de método rápido para detecção de psicrotróficos gram-positivos	13
3.2.6.1 Determinação do limite de detecção e de seletividade do método	13
3.2.7 Verificação da eficiência do teste rápido em leite naturalmente contaminado	13
3.2.8 Pesquisa de <i>Listeria</i> spp no Ambiente de Laticínios	14
3.2.8.1 Método do Número Mais Provável (NMP)	14
3.2.8.2 Confirmação e Identificação de <i>Listeria</i> spp	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1 Capacidade de Diferenciação entre Gram-negativos e Gram-positivos em Ágar PCA-ANS	16
4.2 Utilização do Reagente Fluorogênico 8-Anilino-1 Naftaleno Sulfônico (ANS) para Testes Diretamente em Leite	16
4.3 Avaliação do Crescimento de <i>P. fluorescens</i>, <i>L. innocua</i> e <i>E. coli</i> em Leite UHT em Temperatura de 7°C	17

4.4 Método de determinação de psicrotróficos por redução do TTC	18
4.4.1 Limite de Detecção de Psicrotróficos Gram-negativos	18
4.4.2- Limite de Detecção de Psicrotróficos Gram-positivos	21
4.5 Verificação da eficiência do teste rápido em leite naturalmente contaminado	23
4.6 <i>Listeria</i> spp em superfícies	24
5 CONCLUSÕES	28
6 SUGESTÕES	29
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

RESUMO

SILVA, Cláudia Guerreiro. **Detecção Rápida de Psicotróficos em Leite e Monitoramento de *Listeria* spp no Ambiente de Processamento de Laticínios.** Seropédica: UFRRJ, 2006.p.33 (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).

Recentes mudanças no armazenamento e transporte têm afetado a qualidade do leite de maneira diferente. Embora desfavoreça os microrganismos mesófilos e, portanto, a acidificação precoce do leite cru, o resfriamento logo após a ordenha, e seu transporte em caminhões tanque isotérmicos favorece o desenvolvimento de microrganismos psicotróficos como os do gênero *Pseudomonas* e *Listeria*. Os psicotróficos Gram negativos são considerados apenas deteriorantes sendo produtores de enzimas degradativas extracelulares, os psicotróficos Gram positivos do gênero *Listeria* podem ser patógenos potenciais. *Listeria. monocytogenes* é um microrganismo patogênico e pode causar listeriose no homem, com um risco maior para gestantes, recém nascidos, idosos e indivíduos imunodeprimidos. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de testes rápidos para detecção de psicotróficos Gram negativos e Gram positivos em leite e a pesquisa de *Listeria* spp no ambiente de laticínios. A metodologia utilizada no desenvolvimento dos testes rápidos foi baseada na capacidade dos microrganismos de reduzir o cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) à formazanas de coloração rósea. Foram testados como inibidores de Gram negativos, azida sódica e ácido nalidíxico e, como inibidores de Gram positivos, cetrimida, cloreto de benzalcônio e sais biliares. Dentre os compostos de amônio quaternário a cetrimida na concentração empregada, não foi efetiva na inibição de *Listeria*, um psicotrófico Gram positivo, sendo o cloreto de benzalcônio considerado o melhor inibidor. Como inibidor de Gram negativos o ácido nalidíxico foi satisfatório não sendo detectado crescimento de *Pseudomonas* nos tubos com concentração inicial de até $ca 10^7$ UFC/mL O limite de detecção de psicotróficos gram-negativos com 24 horas de incubação foi de apenas 10^2 UFC/mL, usando *P. fluorescens* como alvo, enquanto para a detecção de psicotróficos gram-positivos foi de 10^3 UFC/mL, usando *L. innocua* como alvo. Na pesquisa de *Listeria* spp no ambiente de indústrias de laticínios, foram amostrados 48 pontos de seis indústrias localizadas no estado do Rio de Janeiro incluindo tanques de fabricação de queijos, parede, piso, prateleira da sala de salga, ralos, superfícies de câmara fria, mesa de enformagem. Em cada um destes pontos foram coletadas duas amostras de áreas adjacentes de 400 cm^2 cada, uma com swab apenas e outra com escova seguida de swab totalizando 94 amostras. Os swabs e as escovas foram transferidos para tubo de ensaio contendo 10 mL de tampão e transportado em caixas isotérmicas com gelo para o laboratório. O número de células de *Listeria* spp. aderidas às diferentes superfícies foi quantificado pelo método do número mais provável utilizando-se caldo UVM como enriquecimento primário seguido de transferências para caldo Fraser e plaqueamento seletivo, e identificação das colônias suspeitas por testes bioquímicos. Nas áreas amostradas com escova e swab foi recuperado um maior número de células que naquelas amostradas apenas com swab. Entretanto, nenhuma das 327 colônias isoladas, confirmaram-se como *Listeria* spp. nos testes fenotípicos e sorológicos

Palavras chave: *Pseudomonas*, *Listeria*, ambiente, leite, laticínio.

ABSTRACT

SILVA, Cláudia Guerreiro. **Rapid Detection of Psychrotrophs in Milk and Monitoring of *Listeria* spp in Dairy Processing Environment.** Seropédica:UFRRJ, 2006.33p. (Dissertation, Master Science in Food Science and Tecnology).

Recent changes in milk storage and transport is affecting mild quality in a different way. Although it disfavors mesophiles microorganisms and therefore, the acidification of raw milk, the rapid cooling after milking, and its transport in isothermal trucks tank favors the development of psicrotrophics, having Gram-negative bacteria, more specifically the genera *Pseudomonas* as the predominant microbiota. The origin of these bacteria is primarily poorly cleaned surfaces of milking equipment and caw teats. On the other hand, Gram-positive bacteria of the genera *Listeria* can also be found in the environment and domestic animals, being *L. monocytogenes* pathogenic for the man. The persistence of these bacteria in the environment is related to its ability to survive in adverse conditions and growth at low temperatures. The objectives of this work was to detect the presence of *Listeria* spp in dairy environment and the development of rapid tests for early detection of Gram positive and negative psicrotrophics in milk. The methodology used in the development of rapid tests was based on the ability of microorganisms to reduce trifeniltetrazolium chloride (TTC) to formazans pink in color. As Gram positive inhibitors, cetricimida, benzalkonium chloride and bile salt were used and as inhibitors of Gram negative, sodium azida and nalidixic acid. Among quaternary ammonium compounds, cetricimide in the used concentration did not inhibit of *Listeria*, a Gram positive psychotropic. As Gram negative inhibitor nalidixic acid was satisfactory, as growth of *Pseudomonas* was not detected neither in the tubes inoculated with 10^7 UFC/mL. The limit of detection for Gram-negative psicrotrophics at 24 hours incubation was only 10^2 CFU/mL, using *P. fluorescens* as a target microorganism, whereas for Gram-positive psicrotrophics was 10^3 CFU/mL, using *L. innocua* as a target. In the evaluation of *Listeria* spp in the dairy environment, 48 points of six dairies from Rio de Janeiro were sampled, including surfaces of cheeses tanks, walls, floors, shelves, cold chamber. In each one of these points, two samples of adjacent areas of 400 cm^2 were collected, one with swab and another one with brush followed by swabbing totalizing 93 samples. Swabs and brushes had been transferred to a test tube containing 10 mL buffer and transported to the laboratory in isothermal boxes with ice. The number of *Listeria* spp. adhered to the different surfaces was quantified by the most probable number using UVM broth as primary enrichment followed by transference to Fraser broth and selective plating and identification of the presumptive colonies by biochemists tests. In the areas sampled by brushing and swabbing the number of cells recovered was bigger than in the areas sampled only by swabbing. However, neither of the 327 isolated colonies were confirmed as *Listeria* spp by phenotypic tests and serotyping.

Key-words: *Pseudomonas*, *Listeria*, environment, milk, dairies.

1 INTRODUÇÃO

O leite é considerado um alimento completo em nutrientes e por isso importante na alimentação do homem e um meio de cultura excelente para diversos grupos de microrganismos. A carga microbiana do leite cru interfere diretamente na qualidade dos produtos lácteos, portanto os cuidados preventivos para evitar a contaminação desde a obtenção do alimento até a geração do produto final são indispensáveis.

Nas novas normas propostas pelo Governo, a Instrução Normativa 51, consta a obrigatoriedade do resfriamento do leite na propriedade e transporte a granel do produto, isto é em caminhões-tanque isotérmicos. (BRASIL, 2002). Estas duas medidas vêm sendo amplamente incentivadas pelos laticínios, uma vez que há considerável aumento na qualidade do leite e derivados quando o leite é refrigerado na fazenda, em comparação com o leite não refrigerado coletado em latões, bem como se observa uma economia significativa de recursos financeiros com o transporte a granel.

As mudanças nas temperaturas de armazenamento e transporte desfavorecem os microrganismos mesófilos e, portanto, a acidificação precoce do leite cru, um dos principais problemas anteriormente relacionados à qualidade do leite. O resfriamento logo após a ordenha, a sua conservação a 7°C nas propriedades rurais, o transporte em caminhões-tanque isotérmicos nesta temperatura e a manutenção nos postos de refrigeração ou estabelecimentos industriais na temperatura máxima de 10°C favorecem o desenvolvimento dos psicrotróficos.

As bactérias psicrotróficas têm causado graves problemas para produtores e indústrias, pelas alterações causadas como rancificação e modificações de odor e sabor em leite, queijos e manteiga, além de gelificação do leite UAT (Ultra Alta Temperatura). As bactérias gram-negativas, mais especificamente as do gênero *Pseudomonas* são as mais implicadas nas alterações da qualidade do leite, pela ação de suas enzimas proteolíticas e lipolíticas.

Os testes existentes para detecção de psicrotróficos consistem na semeadura de alíquotas do produto em meio apropriado e incubação entre 4 a 7°C por até 10 dias. Este tempo tem se revelado demasiadamente longo, e fazendo-se necessário o desenvolvimento de metodologias rápidas de avaliação da qualidade do leite, para processamento de produtos de laticínios, visando verificar a eficácia da higiene na determinação da vida útil desses produtos derivados do leite.

O alimento deve estar protegido da contaminação por deteriorantes causadores de alterações indesejáveis, assim como de microrganismos patogênicos, que podem causar doenças ao consumidor. Microrganismos do gênero *Listeria* são psicrotróficos e estão amplamente distribuídos na natureza. *Listeria monocytogenes* tem sido responsabilizada por doenças de origem alimentar envolvendo produtos de laticínios, cárneos e pescados processados ou “in natura”. A relevância de *Listeria monocytogenes* na saúde pública, devido a sua patogenicidade ao homem e também a sua capacidade de sobrevivência em condições adversas é preocupante.

A origem destas bactérias é primeiramente as superfícies dos equipamentos de ordenha e também tetos das vacas mal higienizados. Os psicrotróficos Gram-positivos do gênero *Listeria* também podem ser encontrados no ambiente e animais domésticos. A persistência destas bactérias no ambiente está relacionada à sua habilidade de sobreviver em condições adversas.

Os objetivos deste trabalho foram: a) o desenvolvimento de metodologia rápida de detecção de psicrotróficos Gram-negativos e Gram-positivos em leite; b) detecção quantitativa de *Listeria* spp em equipamentos e no ambiente de laticínios.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ecologia Microbiana do Leite

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiênicas, de vacas saudas, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002).

Ao ser sintetizado e secretado para o lúmen alveolar o leite encontra-se livre de microrganismos. O interior da glândula mamária o exterior do úbere e tetos, utensílios e equipamentos de ordenha constituem as principais fontes de contaminação (OLIVEIRA et al., 1999; MURPHY e BOOR, 1998). A população microbiana total presente no leite cru varia de acordo com a contaminação inicial, tempo e temperatura de armazenamento (ROBINSON, 1987).

O leite proveniente de animais saudáveis, normalmente contém níveis baixos de microrganismos. Geralmente a contagem total não excede 10^3 células por mililitro. *Micrococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* e *Corynebacterium spp.* são as bactérias geralmente presentes. Quando a vaca é portadora de mastite e seu leite não é separado, transmite uma série de agentes de infecções para o leite ordenhado. *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* estão associados a mastites contagiosas, enquanto Coliformes, *Pseudomonas spp* e *Streptococcus spp.* estão relacionados a mastites provenientes do ambiente. O leite ao sair do úbere pode se tornar contaminado pelos microrganismos presentes na superfície do corpo do animal, no ambiente, nos equipamentos e utensílios indevidamente higienizados. A contaminação é geralmente bacteriana, bolores e leveduras ocorrem raramente ou em baixos níveis. São encontradas bactérias ácido-láticas, Coliformes, outras bactérias gram-negativas, *Bacillus* e *Clostridium spp.* Os tipos de microrganismos que prevalecem no leite cru dependem da população microbiana inicial, do alcance da lavagem e sanificação dos equipamentos e utensílios e do tempo e temperatura de estocagem (APHA, 2001).

As bactérias láticas são mesófilas e acidificam o leite, se não refrigerar de imediato. Como essa bactéria tem um tempo de geração mais curto e produzem ácido láctico que inibem o desenvolvimento de outras espécies, constituem a flora dominante no leite, mantido em temperatura ambiente, (AMIOT, 1991).

Os mesófilos constituem um grupo importante por incluir a maioria dos microrganismos acidificantes, e por se desenvolverem a temperaturas entre 20 e 45°C, com a temperatura ótima de crescimento em torno de 30 e 40°C (JAY, 1994).

Se o leite for refrigerado logo após a ordenha, o crescimento e multiplicação de psicrotóxicos como *Pseudomonas* e algumas espécies de *Bacillus* são favorecidos (HARRIGAN, 1998).

A capacidade de sobrevivência ou multiplicação dos microrganismos presentes em um alimento depende das características próprias do alimento (fatores intrínsecos) e os relacionados com o ambiente em que o alimento se encontra (fatores extrínsecos) (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

O pH 6,4 a 6,8; a atividade de água em torno de 0,98 e a riqueza de nutrientes como glicídios, proteínas, lipídios, sais minerais, e vitaminas do complexo B dão condições favoráveis ao desenvolvimento dos microrganismos (AMIOT, 1991).

As alterações mais significantes no leite agrupam-se em três tipos de ocorrências. De acordo como o substrato utilizado pelo microrganismo, teremos: os proteolíticos que agem basicamente sobre as proteínas, levando a produtos finais como

peptídeos, aminoácidos, aminas e amoníaco; os sacarolíticos que atuam sobre carboidratos (lactose ou seus monossacarídeos) produzindo ácidos, gases e álcool; e os lipolíticos que interferem na gordura do leite (triglicerídeos), liberando ácidos graxos e glicerol.

A produção de ácido é resultante da ação e bactérias lácticas pertencentes aos gêneros *Lactococcus* spp e *Lactobacillus* spp que produzem ácido láctico e ácido pirúvico, conduzindo a formação de coalhada. Quanto à fermentação da lactose, as bactérias podem dividir-se em homofermentadoras e heterofermentadoras. As primeiras degradam os açúcares, transformando-os principalmente em ácido láctico e o segundo grupo, além do ácido láctico, produzem outros ácidos como o acético, o succínico, e ainda álcoois e gases. Resultante da fermentação da lactose a produção de ácido láctico, provoca coagulação da caseína do leite, quando alcança seu ponto isoelétrico (TRONCO, 2003)

São também capazes de acidificar o leite, microrganismos dos gêneros *Micrococcus* spp, *Microbacterium* spp e grupo Coliforme. Os coliformes, além da acidificação do leite, produzem gás carbônico e hidrogênio durante a fermentação da lactose, e ainda causam outros efeitos indesejáveis

Outros gêneros envolvidos na deterioração do leite incluem microrganismos do gênero *Clostridium* e algumas leveduras. Nos leites com viscosidade aumentada detectam-se *Alcaligenes viscolatis*, *Enterobacter aerogenes* e certos micrococcos.

A coagulação do leite não ocorre apenas devido a acidificação, mas também por ação enzimática, chamada de coagulação doce. Observa-se em *Bacillus*, que degradam tardiamente a lactose, produzindo uma mistura de ácidos após haver coagulado o leite por ação de uma protease. As espécies mais comumente envolvidas no processo são: *Bacillus coagulans*, *B. stearotermophilus* var. *calidolactis* e *B. subtilis*. A lipólise e proteólise são alterações importantes provocadas pelo grupo dos psicrotróficos, representados pelos gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter* associadas a leveduras do gênero *Candida* e fungos do gênero *Penicillium*. A produção de sabores e mudanças na coloração do leite também pode ser observada. (ROBINSON, 1987; TRONCO, 2003).

Técnicas de produção higiênica do leite são aplicadas com a finalidade primeiramente de prevenir e impedir a transmissão de bactérias patogênicas veiculadas pelo leite e produtos lácteos, protegendo a saúde dos consumidores, em segundo lugar prevenir e reduzir o desenvolvimento de bactérias indesejáveis, evitando suas alterações e em terceiro lugar favorecer e direcionar o desenvolvimento das bactérias úteis em produtos lácteos como os fermentados (AMIOT, 1991).

2.2 Microbiota Psicrotrófica do Leite

Segundo COLLINS (1981), de acordo com as normas da International Dairy Federation (IDF) 1991 os psicrotróficos foram definidos como sendo os microrganismos que podem crescer a temperatura de 7°C ou menor independentemente da temperatura ótima de crescimento que é de 20°C. Esse grupo é extremamente importante em produtos que são conservados ou armazenados em condições de refrigeração por períodos relativamente longos, de uma a quatro semanas.

Psicrotróficas são bactérias que incluem bastonetes e cocos; formadores ou não de esporos; gram-negativas; gram-positivas; aeróbios, anaeróbios facultativos e estritos. São importantes em leite e derivados; carne e aves e pescado e derivados (APHA, 2001).

De acordo com SØRHAUG e STEPANIAK (1997), os microrganismos psicotróficos são capazes de crescer no leite em temperaturas próximas de 0°C e são representadas por bactérias Gram - negativas dos gêneros: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* e Gram positivas: *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Microbacterium*.

2.3 Testes para Detecção de Psicotróficos

O método rápido descrito pela International Dairy Federation (1991) e também pela American Public Health Association (2001) é um método, que pela temperatura de incubação de 21°C por 25 horas, permite a contagem de outros microrganismos além de psicotróficos, que possam crescer nesta temperatura rapidamente. Os resultados obtidos por esta metodologia se correlacionam bem com os obtidos pela IDF Standard 101 A: 1991, que determina incubação a 6,5°C por 10 dias. Este último método deve ser usado se uma enumeração mais precisa de microrganismos for necessária.

As metodologias para contagem de psicotróficos em placa variam de 7 a 10 dias a 7°C ou 16 horas a 17°C e em seguida três dias a 7°C. KAHN e FIRSTENBERG (1987) avaliaram a contagem em meio seletivo contendo cristal violeta e cloreto de trifeniltetrazólio e incubação a 30°C / 48 horas e a 22°C / 5 dias e observaram o crescimento de bactérias mesófilas a 30°C e a 22°C em 48 horas. Entretanto o cristal violeta a 2 ppm inibia o crescimento de bactérias Gram positivas.

CRAVEN *et al* (1994) testaram um método rápido baseado no princípio de um agente seletivo como inibidor de bactérias Gram positivas, o cloreto de benzalcônio. Utilizando 2, 3,5 - cloreto de trifeniltetrazólio como indicador do crescimento bacteriano, após a incubação a 30°C / 30 horas observaram mudança de cor na amostra, significando presença de psicotrófico.

2.4 O gênero *Pseudomonas* spp: Impactos na qualidade do leite e derivados

São bastonetes ligeiramente curvos, gram-negativos com 0.5-1.0 x 1.5-5.0 µm. Várias espécies acumulam poli-β hidroxibutirato e carbono como reserva. São móveis com flagelos polares e raramente imóveis, aeróbios com metabolismo respiratório e catalase positiva. O gênero *Pseudomonas* é o mais comum e prejudicial e inclui *P. fluorescens*, *Shewanella*, *P. fragi*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, principalmente *Pseudomonas* spp normalmente representa não mais que 10% da flora do leite, contudo são os mais importantes psicotróficos no processo de deterioração do leite cru ou pasteurizado. O gênero é representado por espécies com o tempo de geração mais curto em temperaturas de 0 a 7°C, e a mais baixa temperatura teórica de crescimento observada é de -10°C. As bactérias neste caso são tipicamente psicrófilas (HOLT *et al*, 1994).

Quando crescem no leite aerado a 4°C, várias cepas de *Pseudomonas* spp podem produzir proteinases que hidrolisam a caseína do leite pela atividade de enzimas intra e extracelulares. Estas alterações acarretam defeitos físicos e organolépticos no leite, principalmente gelatinização e o desenvolvimento de intenso sabor amargo que causam defeito nos derivados de leite e baixo rendimento na produção de queijos (COUSIN, 1982).

As lipases provocam lipólise que hidrolisam os triglicerídeos da gordura liberando ácidos graxos de cadeia curta (butírico, capróico, caprílico e cáprico) que são os principais responsáveis pelo aparecimento de odores desagradáveis no leite (SILVEIRA *et al*, 2005).

A coleta de leite a granel tem se tornado cada vez mais popular, pois racionaliza o processo de captação do leite junto ao produtor, simplificando-o e reduzindo os custos. Enquanto a refrigeração do leite na fonte de produção diminui consideravelmente as chances de acidificação, aumenta, por outro lado, as chances de crescimento de bactérias psicotróficas, que podem causar diversos problemas no leite e derivados.

O resfriamento do leite de má qualidade pode provocar graves conseqüências para a indústria de queijos, em particular para aquelas que produzem queijos de longa maturação. Estes microrganismos são destruídos pela pasteurização do leite, entretanto, produzem enzimas como as lipases e proteases que apresentam elevada termorresistência. No leite quando há uma elevada carga contaminante elevada de *Pseudomonas*, a produção de proteases é suficiente para degradar parcialmente as caseínas Betas e Kapa, liberando peptídeos, além de NPN na forma de amônia, levando à diminuição dos compostos nitrogenados no soro e há queda de rendimento na produção de queijos. As lipases podem hidrolisar a gordura tanto do leite quanto do queijo, liberando ácidos graxos que causam o defeito conhecido como rancidez. Se a lipólise é expressiva, os ácidos graxos livres têm efeito inibidor sobre o crescimento da cultura láctica (FURTADO, 2005).

De acordo com ZALL e CHAN (1981), estas enzimas não são destruídas pelos métodos convencionais de pasteurização. Os principais efeitos destas enzimas na qualidade dos produtos lácteos estão descritos no Quadro 01.

Quadro 01: Efeitos na qualidade de Produtos Lácteos com crescimento de psicotróficos no leite cru antes do tratamento térmico

Produto	Log UFC/mL Psicotróficos no leite cru	Efeitos na qualidade
Leite UHT	5.9 6.9-7.2	Gelatinização em torno de 20 semanas. Gelatinização não antes que 2-10 semanas, odor de estragado, sabor amargo
Leite em pó	6.3-7.0	Redução da estabilidade ao calor
Leite pasteurizado	5.5 7-8	Flavour inferior, se comparado com leite pasteurizado fresco Tempo de prateleira mais curto
Queijo massa dura	6.5-7.5 7.5-8.3	Rancidez Flavour diferente, predomínio de gosto de ranço e sabão
Queijo cottage	5-7.8	Sabor amargo
Manteiga	não determinado	Rápido desenvolvimento de rancidez na manteiga, lipases de <i>Pseudomonas</i> ativa em manteiga congelada
Iogurte	7.6 a 7.8	Sabor amargo, flavour adocicado, depende da microflora específica

Fonte: SØRHAUG e STEPANIAK (1997)

2.5 O gênero *Listeria* spp

São bastonetes curtos e regulares medindo 0,4-0,5 x 0,5-2 µm, algumas vezes cocóides, com extremidades arredondadas, em cadeias curtas e com menos frequência em longos filamentos. As células são Gram positivas, não formadoras de esporos, móveis com flagelos peritríquios a 20-25°C e anaeróbias facultativas com metabolismo fermentativo. São catalase positiva e oxidase negativa (HOLT *et al*, 1994).

O gênero *Listeria* contém seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* e *L. grayi*. *L. monocytogenes* está associada à listeriose humana. *L. ivanovii* e *L. seeligeri* são extremamente raras em humanos (BAM, 2003).

2.5.1 *Listeria monocytogenes* e impactos na saúde pública

Listeriose é uma enfermidade infecciosa causada pelas bactérias Gram-positivas, *Listeria* spp. Afeta várias espécies animais, induzindo três formas de manifestação clínica: (1) septicemia com abscessos em vísceras como fígado e baço, (2) aborto e (3) doença neurológica (meningoencefalite). Geralmente, em um surto, observa-se apenas uma dessas três formas. A forma septicêmica afeta especialmente ruminantes, suínos, coelhos e aves recém-nascidos. *Listeria monocytogenes* é causa de aborto, principalmente em ovinos e bovinos, e de doença neurológica, principalmente em ovinos, caprinos e bovinos. A listeriose humana é uma doença de distribuição cosmopolita envolvendo, principalmente, recém-natos, idosos e pacientes imunodeprimidos, embora registram-se casos em indivíduos imunocompetentes (HOFER *et al*, 1998).

A ocorrência universal de *L. monocytogenes* em alimentos e o risco de se infectar com este patógeno é preocupante (BAM, 2003).

No Brasil, existem vários registros da presença de *L. monocytogenes* em leite e derivados (DESTRO *et al*, 1991; FURLANETTO *et al*, 1996; MOURA *et al*, 1993; SILVA *et al*, 1997; VAN DENDER, 1995) citados por CATÃO e CEBALLOS (2001).

SILVA *et al.*(1998) pesquisando a contaminação em queijos produzidos no Rio de Janeiro, encontraram 19,6% das amostras positivas para *L. monocytogenes* e, ainda, as mesmas amostras foram também positivas para *L. innocua* e *L. grayi*.

A grande frequência de casos de listeriose, veiculada por queijos, evidencia a importância desse alimento e de outros derivados do leite na cadeia epidemiológica de transmissão de *Listeria* spp.(RYSER e MARTH., 1991).

A ocorrência de listeriose em mulheres gestantes e imunocomprometidas sugerem que a listeriose pode ser uma importante doença não reconhecida em mulheres gestantes com imunidade deficiente (SCHLECH, 1996).

As manifestações clínicas com cursos agudo, subagudo e crônico, apresentam extraordinário polimorfismo. Tal fato resulta da localização da *Listeria monocytogenes* em inúmeros sítios anatômicos do hospedeiro, mas, sendo a meningite e a septicemia, as formas comumente relatadas em todos os grupos etários. No caso do comprometimento ao nível do sistema nervoso central, do ponto de vista clínico, enfatiza-se que é indistinguível das outras meningites ou meningo-encefalites bacterianas agudas. Os casos de meningite apresentaram letalidade de 43,8% (HOFER *et al*,1998) e segundo LOVETT (1989) esta alta mortalidade variou de 20 a 30%.

Em ruminantes, a forma nervosa é causada por *L. monocytogenes* e ocorre esporadicamente ou em surtos, com morbidade baixa e letalidade alta, geralmente

associada à alimentação com silagem de má qualidade (pH acima de 5,5) que favorece o crescimento da bactéria. A doença neurológica é mais comum em regiões de clima temperado, onde os casos ocorrem principalmente no inverno e início da primavera. Outras fontes de infecção incluem solo e alimentos contaminados e fezes ou leite de animais portadores. A doença encefálica em bovinos pode ser subaguda, mas em ovinos e cabras é geralmente aguda e fatal (LIPPMAN, 1969).

Lesões macroscópicas não são comuns, mas podem ser observadas hiperemia das leptomeninges e turvamento do líquido cefalorraquidiano; ocasionalmente, em cortes transversais do tronco encefálico, observam-se focos de malácia castanho-amarelados (SUMMERS *et al.*, 1995).

As alterações microscópicas consistem de microabscessos, manguitos mononucleares nos espaços perivasculares de Virchow-Robin, degeneração axonal e presença de células *Gitter*. Essas lesões distribuem-se de modo assimétrico, principalmente no bulbo e na ponte, mas podem ocorrer em qualquer local do tronco encefálico, desde o tálamo até a medula espinhal cervical. Apesar de relatos de casos esporádicos da forma nervosa de listeriose em ruminantes no Brasil são escassos os relatos detalhados da enfermidade no país. (SCHLECH, 1996)

2.5.2 Incidência de *Listeria* spp em leite e ambiente de processamento de laticínios

Listeria monocytogenes está frequentemente presente no ambiente e pode ser transmitida para o homem através de alimentos contaminados. O leite e derivados são particularmente susceptíveis a contaminação (GRIFFITHS, 1989). *Listeria* spp. tem sido isolada de leite cru com uma prevalência em torno de 1 a 45% dependendo do método de isolamento (FELON e WILSON, 1989). A incidência de *Listeria* spp. varia sazonalmente com uma concentração no leite cru menor que 1 UFC/ mL. O tratamento térmico reduz significativamente os riscos de infecção por *Listeria* spp. (MACKEY e BRATCHELL, 1989). A presença da bactéria no leite cru está relacionada principalmente com a contaminação do leite com fezes e a qualidade imprópria de silagem. Raramente causa mastite nos bovinos, mas quando ocorre é uma fonte potencial de contaminação (SKOVAARD e MORGEN, 1988).

L. monocytogenes presente no leite cru, mesmo em números reduzidos pode aumentar sua concentração, através do processo de coagulação do leite e crescer durante a maturação do queijo. Desta forma pode-se encontrá-la em números mais elevados no produto final (FARBER e PETERKIN, 1991).

Espécies de *Listeria* e de *L. monocytogenes* são encontradas em amostras analisadas de queijo Minas Frescal, Ricota, Gorgonzola, Brie e Roquefort. Um importante ponto é a frequência de isolamento de *Listeria innocua* normalmente alta que pode ser considerada como indicativo de contaminação de *Listeria monocytogenes* (SILVA *et al.*, 1998)

2.5.3 Métodos convencionais - fenotípicos de isolamento de *Listeria* spp.

As metodologias para o isolamento de *Listeria* spp. ainda estão em fase de aperfeiçoamento segundo HITCHINS e TRAN (1990), tendo em vista os esforços de vários pesquisadores em aumentar as chances de recuperação e detecção da bactéria nos diversos alimentos e os resultados variados obtidos nos diferentes trabalhos realizados.

As metodologias utilizadas são de suma importância devido à população do patógeno ser geralmente encontrada em baixos níveis quando comparada à microbiota natural. Assim, a metodologia aplicada deve possibilitar a detecção baixa de células

viáveis em produtos prontos para o consumo, devido ao potencial de multiplicação do patógeno durante longos períodos de estocagem em temperatura de refrigeração, esses produtos eventualmente serem consumidos sem o reaquecimento (KNABEL, 2002).

As primeiras tentativas para isolar *Listeria* spp. em alimentos apresentaram relativo insucesso, uma vez que foi utilizada a metodologia de plaqueamento direto em ágar sangue. As metodologias utilizadas para o isolamento de *Listeria monocytogenes* dos alimentos pelo plaqueamento direto não têm tido sucesso, particularmente no que se refere aos alimentos com altas contagens microbianas. Porém, foi considerado que o plaqueamento direto possa ser utilizado para recuperar células injuriadas ou não de *Listeria monocytogenes*, a partir de alimentos que contenham baixas populações da microbiota do alimento. De qualquer forma, os meios de isolamento que têm sido desenvolvidos para a recuperação do patógeno, envolvem a combinação com um prévio procedimento de enriquecimento (BAYLEY *et al.* 1990)

No plaqueamento direto, o alimento testado é homogeneizado com solução tampão, e diluições desta mistura são plaqueadas em meios seletivos. As placas são incubadas por 24-48 horas a 30° C. Após a incubação, colônias suspeitas de *Listeria* são contadas e confirmadas usando testes bioquímicos apropriados. Vários estudos têm sido realizados com o intuito de avaliar os meios sólidos, quanto à recuperação e contagem de *Listeria monocytogenes* em alimentos, utilizando-se o método de plaqueamento direto (LOESSNER *et al.*, 1988).

Foi observado que a eficiência dos meios de cultura depende do tipo de alimento analisado, da população de *Listeria monocytogenes* e da microbiota acompanhante

Pesquisa realizada por SMITH e ARCHER (1988) indicou que muitos meios usados no plaqueamento direto não são satisfatórios para recuperar células de *Listeria monocytogenes* que sofreram danos pelo aquecimento, devido à presença de agentes seletivos. Resultado semelhante foi obtido por GOLDEN *et al.*, (1988) que compararam seis meios sólidos destinados à recuperação de células de *Listeria monocytogenes* danificadas pelo aquecimento e congelamento.

Mais recentemente, a incorporação de agentes seletivos e diferenciais a base de lítio aos meios de enriquecimento, os quais devem inibir o crescimento de outros microrganismos que não a *Listeria*, mostrou-se vantajosa em relação ao enriquecimento a temperaturas baixas. Outros procedimentos de enriquecimento têm sido usados como, o caldo de enriquecimento para *Listeria* da Merck (MERCK, 1982), o caldo de enriquecimento para *Listeria* spp. (LEB), contendo ácido nalidíxico e acriflavina como agentes seletivos, o caldo triptose adicionado de 2 % de citrato de sódio, utilizado por YOUSEF *et al.*(1988).

Segundo BAILEY *et al* (1990) as metodologias mais adequadas para detectar *Listeria monocytogenes*, dependendo do grau de contaminação do alimento, são aquelas que empregam um ou dois estágios de enriquecimento anterior ao plaqueamento.

Os métodos convencionais para identificação das colônias isoladas e a diferenciação das espécies de *Listeria* são realizados através do exame de morfologia colonial e celular. A identificação dos isolados é realizada através de: características morfológicas de acordo com o meio de isolamento; e coloração de Gram da colônia; provas bioquímicas: produção de indol; H₂S; ácidos a partir de glicose, lactose e sacarose; motilidade; urease; catalase; redução do nitrato; fermentação de xilose, ramnose e manitol e produção de hemolisina em ágar sangue e Camp teste, sendo que os resultados obtidos são comparados às características clássicas do microrganismo (SEELIGER e JONES, 1986).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

3.1 Materiais

As culturas de *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525), *Escherichia coli* DTA 15/06, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Rhodococcus equi* (ATCC6939) foram obtidas em ampolas liofilizadas provenientes do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Pública (INCQS / FIOCRUZ).

Os isolados de *Listeria innocua* e de *Listeria monocytogenes* fornecidos em tubos contendo meio semi-sólido (caldo Triptose + 0,4% de Ágar), vedados com rolha de borracha foram fornecidos pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Para avaliação do crescimento e limite de detecção de *P. fluorescens*, *L. innocua* e *E. coli* foi utilizado leite UHT. O Leite Longa Vida é o leite tratado por um processo denominado Ultrapasteurização, UAT (Ultra Alta Temperatura) ou UHT (do inglês Ultra High Temperature). O processo de ultrapasteurização é o aquecimento do leite à temperatura de aproximadamente 150°C por um tempo muito curto, de cerca de quatro segundos, seguido por um rápido resfriamento então é embalado assepticamente. Por este motivo foi utilizado como matriz, evitando com isso o risco da presença de flora contaminante que poderia interferir no resultado das análises.

Para verificação da eficiência dos testes rápidos foi utilizado leite pasteurizado adquirido em supermercados.

3.1.2 Pontos de amostragem utilizados para pesquisa de *Listeria spp*

As amostras foram coletadas de 47 pontos distribuídos em seis laticínios, sendo um deles apenas produtor de sorvetes (Tabela 01).

Tabela 01: Distribuição dos pontos de amostragem nos laticínios

LATICÍNIO	PONTOS DE AMOSTRAGEM
A	<ul style="list-style-type: none"> • Piso em frente ao tanque de preparo das misturas de sorvete • Pasteurizador 01 • Pasteurizador 02 • Sorveteira-anteparo • Sorveteira -cilindro-diâmetro 16cm x profundidade 16cm • Saída da Envasadora de Calda- diâmetro 3,5cm x profundidade 12cm. • Sorveteira - funil - diâmetro 4,5cm x altura 17,5cm • Câmara fria de Secagem-superfície superior do óculo • Sala de Fabricação- parede • Misturador de calda- parede interna • Mesa de Envase de Sorvete
B	<ul style="list-style-type: none"> • Mesa Queijo da Sala de Envase • Sala de Fabricação de Ricota, Requeijão e Muzzarela próximo a cuba – piso abaixo da cuba de fabricação de ricota e requeijão. • Sala de Salga (Secagem de queijo menos requeijão)- prateleira • Sala de Processamento (Fabricação de Queijo) - ralo • Sala de Processamento (Fabricação de Queijo)- mesa de enformagem • Sala de Processamento (Fabricação de Queijo)- piso
C	<ul style="list-style-type: none"> • Câmara de Salga de Queijo Minas Frescal - teto com gotejamento na salmoura • Câmara de dessora da ricota – teto • Sala de Fabricação de Ricota e Requeijão- canaleta próxima ao ralo • Sala de Processamento Queijo Minas Frescal – parede próximo ao gotejamento • Sala de Envase de Queijo- mesa de aço inox • Sala de Processamento de Queijo Minas- cuba
D	<ul style="list-style-type: none"> • Sala de Fabricação de Queijo Minas Frescal e Ricota – parede da cuba de queijo • Sala de Fabricação de Queijo Minas Frescal e Ricota- fundo da cuba de ricota • Sala de Processamento de queijos - ralo • Câmara de Salga/Secagem- superfície da prateleira de queijo Minas • Câmara de Salga/Secagem- teto com gotejamento em cima da prateleira de queijo • Câmara de Salga/Secagem-parede • Câmara de Salga/Secagem – superfície da unidade de frio • Sala de Embalagem de Queijos- parede próxima a mesa de embalagem • Saída da Câmara de Salga e Secagem • Forma de dessora de queijo Minas Frescal- diâmetro da forma-11cm e altura-12 cm
E	<ul style="list-style-type: none"> • Sala de Processamento de Queijo Minas Frescal- parede perto da cuba • Sala de Processamento de Queijo Minas Frescal-cuba • Câmara fria de Salga- teto da cuba de salga • Câmara fria de Salga - saída da Câmara de Salga, na porta de aço inox • Câmara de Salga - superfície inferior da unidade de frio • Câmara de Salga -escada • Câmara fria de Secagem – prateleira da maturação de queijo Muzzarela e prato • Câmara fria de Secagem-superfície superior do óculo • Forma de dessora de queijo Minas Frescal - diâmetro da forma-11cm e altura 12 cm
F	<ul style="list-style-type: none"> • Sala de Fabricação- cone da envasadora • Sala de Envase- próximo ao ralo • Sala de Fabricação-batedeira da manteiga - pá • Sala de Fabricação-batedeira da manteiga – parede interna • Câmara fria de matéria - prima

Os pontos foram definidos após a inspeção do local e variavam desde superfícies que entravam em contato direto com alimento a pontos que poderiam vir a contaminar o alimento através de aerossóis ou gotejamento e tinham proximidade às superfícies de processamento.

Em cada ponto foram coletadas duas amostras de áreas adjacentes de 400 cm² cada uma, sendo uma com swab e outra com uso de escova e em seguida do swab totalizando 94 amostras.

Os swabs e escovas foram transferidos para tubo de ensaio com tampa de rosca contendo 10 mL de solução de Ringer 1/4 com neutralizantes de sanitizantes e 1% de hexametáfosfato de sódio. Como neutralizantes foram empregados o tiosulfato de sódio a 0,05%, lecitina de sódio a 0,07% e polisorbato a 0,5% (APHA, 2001).

O transporte ao laboratório era realizado em caixas isotérmicas com gelo. As amostras eram analisadas preferencialmente em até 6 a 8 horas (HARRIGAN, 1998).

3.2 Métodos

3.2.1 Condições de cultivo dos microrganismos

As culturas na forma liofilizada foram hidratadas com caldo Casoy (caldo triptona de soja). Após incubação a 30°C para *Pseudomonas fluorescens* e 35 ± 2°C para *Escherichia coli* por 24 horas, foram mantidas sob congelamento a - 20°C em leite desnatado a 10% (p/v) e caldo triptona de soja adicionados de 15% de glicerol, para evitar a perda por repicagens sucessivas. Paralelamente, as culturas foram armazenadas em ágar estoque semi-sólido a 4° C, sofrendo transferências a cada quatro meses (BRASIL, 2003).

As culturas de trabalho foram obtidas por ativação através de três repiques sucessivos em caldo Casoy (Merck) com incubação nas respectivas temperaturas ótimas de crescimento por 24 horas.

Para a avaliação do crescimento de *P. fluorescens*, *L. innocua* e *E. coli* após recuperação foi utilizado leite UHT por ser isento de contaminação.

3.2.2 Recuperação de *Pseudomonas*, *Listeria* e *E. coli* em PCA, PCA-ANS e em meios seletivos

Foram feitas sementeiras de alíquotas de diluições crescentes de suspensões em leite de células de *P. fluorescens*, *L. innocua* e *E. coli* nos meios Ágar Padrão para Contagem (PCA- Merck), Ágar F seletivo para *Pseudomonas* (Merck) e Ágar VRBA seletivo para Coliformes (Merck). Os meios foram incubados a 30°C para *P. fluorescens* e *L. innocua* e a 35 ± 2°C para *E.coli* por 24 horas. Foram selecionadas as placas que apresentavam entre 25 e 250 colônias. Concomitantemente estas mesmas diluições eram semeadas na superfície de PCA-ANS e as placas incubadas a 30°C por 24 horas. A leitura foi realizada sob luz ultravioleta (UV) de 366 nm com óculos de proteção para UV.

3.2.3 Utilização do reagente fluorogênico 8-anilino-1 naftaleno sulfônico (ANS) em substituição ao 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)

Os inóculos de *P.fluorescens*, *E.coli* e *L.innocua* foram preparados na concentração de 10¹ a 10⁷ em solução salina peptonada a 0,1% e distribuídos 1mL nos

meios contendo 10mL de leite e 1 mL de solução aquosa de ANS a 0,05%. A solução foi esterilizada por filtração e conservada protegida da luz em refrigeração. Os meios foram incubados a 30°C para *P. fluorescens* e *L. innocua* e a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ para *E.coli* por 24 horas. A leitura foi realizada sob luz ultravioleta (UV) de 366 nm com óculos de proteção para UV.

3.2.4 Avaliação do crescimento de *P. fluorescens*, *L. innocua* e *E. coli* em leite UHT em temperatura de 7°C

3.2.4.1 Por contagem em Ágar Padrão para Contagem

Para esta etapa foram feitas as curvas de crescimento de *P. fluorescens*, *L. innocua* e *E. coli* no leite UHT a 7°C nos tempos 0, 12, 24, 36, 48 e 72 horas.

3.2.4.2 Por visualização da redução do 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)

A análise se foi realizada distribuindo 10 mL de leite UAT, em tubos de vidro com tampa de rosca ou algodão, em triplicata, acrescido de 1 mL do inóculo de cada microrganismo, que variavam de $1,0$ a 10^8 ufc / mL , adicionado de 0,1 mL de solução de TTC a 5%, incubados a 7°C e foram feitas leituras em intervalos de 6, 18, 24, 48, 72, 96 e 120 h. A positividade era considerada pela mudança de cor branca para rosa ou presença de botão rosa no fundo do tubo. A intensidade de cor foi classificada como rosa fraco (+), rosa moderado (++) e rosa forte (+++) de acordo com a Figura 01.



Figura 01: Escala de intensidade de cor. (+) fraco; (++) moderado; (+++) forte

3.2.5 Desenvolvimento de método rápido para detecção de psicrotróficos gram-negativos

Este teste baseia-se na capacidade dos psicrotróficos Gram-negativos presentes no leite reduzirem TTC formando compostos insolúveis denominados formazanas que conferem coloração rosa ao meio. Utilizou-se *Pseudomonas fluorescens* como microrganismos alvo (controle positivo).

A prova rápida foi realizada distribuindo 10 mL de leite UAT, em tubos, em triplicata, inoculados com 1 mL de uma suspensão contendo diferentes concentrações das culturas teste (*P. fluorescens* e / ou *E. coli*), e de 0,1 mL de solução de cloreto de

benzalcônio a 5% (p/v) ou de solução de cetrimida a 0,3% ou de 1mL de solução de sal biliar a 5% como inibidores de bactérias gram-positivas. Por último, por ser sensível à luz, era adicionado 0,1 mL de solução de TTC.

As soluções de TTC e de inibidores foram esterilizadas por filtração e mantidas sob temperatura de refrigeração.

Os tubos foram incubados a 30°C e as leituras realizadas com 2, 4, 6,18 e 24 horas. Foram considerados positivos os tubos nos quais houve mudança da cor branca para rosa ou presença de botão rosa no fundo do tubo.

A intensidade de cor foi classificada como rosa fraco (+), rosa moderado (++) e rosa forte (+++).

Os controles negativos eram constituídos de leite não inoculado, contendo apenas TTC e apenas inibidor, ou ambos.

3.2.5.1 Determinação do limite de detecção e de seletividade do método

Tubos contendo leite UAT preparados conforme descrito em 3.2.5 foram inoculados com diluições crescentes das culturas em fase estacionária em caldo Casoy, de modo a conter uma concentração final em cada tubo variando de 1 a 10⁷ UFC/mL de *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria* e *E. coli*.

3.2.6 Desenvolvimento de método rápido para detecção de psicrotróficos gram-positivos

Estes testes foram desenvolvidos com base no mesmo princípio descrito para gram-negativos, utilizando-se como microrganismo alvo (controle positivo), *Listeria innocua* e como inibidores de gram-negativos empregou-se 0,1 mL de solução azida sódica 0,02% ou 0,1 mL de solução de ácido nalidíxico a 1% para volumes de 10 mL de leite.

As soluções de TTC e inibidores foram esterilizadas por filtração e mantidas sob temperatura de refrigeração. Os controles negativos eram constituídos de: leite, leite com TTC; leite com TTC e inibidor e leite com o inibidor.

Os tubos foram incubados a 30°C e realizadas leituras com 2, 4, 6,18 e 24 horas. A positividade era considerada pela mudança de cor de branco para rosa ou presença de botão rosa no fundo do tubo. A intensidade de cor foi classificada como rosa fraco (+), rosa moderado (++) e rosa forte (+++).

3.2.6.1 Determinação do limite de detecção e de seletividade do método

Tubos contendo leite UAT preparados conforme descrito em 3.2.5 foram inoculados com diluições crescentes da cultura de *L. innocua* em fase estacionária em caldo Casoy, de modo a conter uma concentração final em cada tubo variando de 1 a 10⁷ UFC/mL de *Listeria*, *E.coli* e *Pseudomonas fluorescens*.

3.2.7 Verificação da eficiência do teste rápido em leite naturalmente contaminado

As amostras de leite pasteurizado foram identificadas como A e B.

As análises de contagem de psicrotróficos foram realizadas através do plaqueamento nos ágar PCA e ágar leite para psicrotróficos.

O método do número mais provável (NMP) testado foi baseado na redução do TTC em leite não adicionado de inibidor porque o objetivo foi comparar a recuperação

quantitativa de psicotróficos totais por diferentes metodologias. As metodologias convencionais não discriminam psicotróficos gram-positivos de gram-negativos. Em adição foram feitas determinações do número mais provável de coliformes a 35°C e a 45°C.

As amostras A e B foram analisadas para psicotróficos pelo NMP a 30°C / 24h; em ágar leite para psicotróficos a 21°C por 24 horas (IDF,1991); e em ágar PCA a 7°C / 7 dias (BRASIL,1991).

Para as análises de Coliformes a 35°C foram usados caldo lauril sulfato e caldo verde brilhante bile por 24 a 48 horas e para as análises de Coliformes a 45°C foi utilizado o caldo *Escherichia coli* (EC) por 24 a 48 horas (BRASIL,1991).

3.2.8 Pesquisa de *Listeria* spp no Ambiente de Laticínios

3.2.8.1 Método do Número Mais Provável (NMP)

O número de células de *Listeria* spp. aderidas às superfícies foi quantificado pelo Método do Número mais Provável (USDA, 2006).

Os tubos contendo os swab e os swab e escova foram tratados em banho de Ultra-som (Thornton) por 5 minutos para deslocamento das células aderidas nos swabs e escovas.

Os swabs e as escovas foram retirados de dentro dos tubos e o conteúdo transferido para frasco contendo 90 mL de caldo UVM (Difco) de enriquecimento primário. O conteúdo foi homogeneizado e distribuído em quantidades de 10 mL para tubos estéreis de modo a permitir quantificação pelo NMP em caso de positividade.

Os tubos foram incubados a 30°C por 24-48 horas e naqueles onde foi observada turvação, volumes de 0,1mL dos tubos UVM positivos foram transferidos para 10 mL de caldo Fraser (Difco) de enriquecimento secundário contendo citrato férrico amoniacal. Seguiu-se incubação a 30°C por 24 a 48 horas. A positividade era evidenciada pelo enegrecimento do meio devido à hidrólise da esculina. A seguir efetuou-se o plaqueamento seletivo em Ágar Triptose com Ácido Nalidíxico (ATN-Difco), Ágar Oxford (AO-Oxoid) adicionado dos suplementos ciclohexamida (200 mg/0,5L), sulfato de polimixina E (10mg/0,5L), cloreto de acriflavina (2,5 mg/0,5L), cefotetan (1,0mg/0,5L) e fosfomicina (5,0mg/0,5L) e Ágar Palcam (AP) adicionado de polimixina B(5 mg/0,5L), cloreto de acriflavina (2,5mg/0,5L) e Ceftazidima (10mg/0,5L). As placas foram incubadas a 30°C por 48hs.

A seleção das colônias presuntivas de *Listeria* spp em ágar ATN foi realizada com auxílio de estereoscópio com iluminação angular de 45°. Foram selecionadas três colônias suspeitas de *Listeria* spp de cada placa (de cor azulada ou azul-acinzentada em ágar ATN; negras rodeadas por halo escuro devido à hidrólise da esculina em ágar Oxford e verde grisáceas com halo escuro em ágar Palcam) e transferidas para Ágar Triptona de Soja - Extrato de Levedura (TSA-YE) inclinado com incubação a 30°C por 24 horas para posterior confirmação e identificação das espécies através de teste morfotintorial (Coloração de Gram) e provas bioquímicas (USDA,2006).

3.2.8.2 Confirmação e Identificação de *Listeria* spp

A confirmação das colônias isoladas foi realizada através de testes: morfotintoriais (coloração de Gram), motilidade, catalase, redução do nitrato a nitrito e teste de Voges Proskauer e vermelho de metila (VM-VP). As cepas que apresentaram formato de bastonete curto ou na forma cocobacilo, Gram-positivo, catalase positivas,

crescimento móvel característico em forma de guarda - chuva, não redutoras de nitrato e VM e VP positivas, foram consideradas *Listeria* spp. (USDA,2006).

As cepas consideradas positivas para o gênero *Listeria* foram testadas para diferenciação entre *Listeria monocytogenes* e outras espécies por meio dos testes de produção de β -hemolisina em ágar sangue desfibrinado de carneiro (formação de zona clara, descolorada ao redor do crescimento) e fermentação de carboidratos (glicose, ramnose, xilose e manitol) e Ágar Ferro Três Açúcares (TSI).

As cepas positivas para β -hemólise foram submetidas ao teste de CAMP com *Staphylococcus aureus* e *Rhodococcus equi* (USDA,2006). Concomitantemente os isolados presuntivos de *Listeria* spp foram testadas pelo sistema API *Listeria* (Bio Mérieux), a fim de comparar os resultados das duas metodologias além de terem sido enviados ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

O fluxograma da análise de *Listeria* spp. está demonstrado na Figura 02.

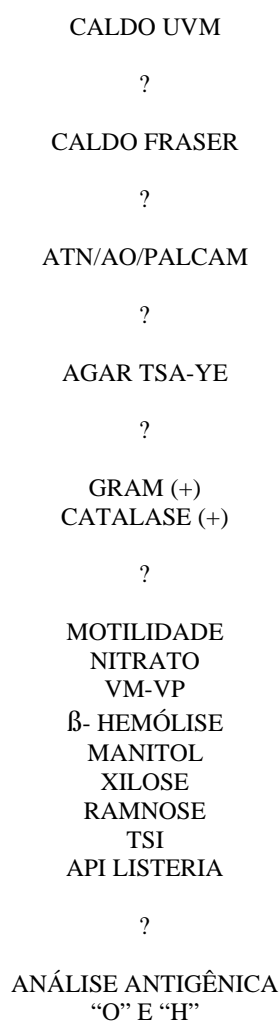


Figura 02: Fluxograma de Análise de *Listeria* spp

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Capacidade de Diferenciação entre Gram-negativos e Gram-positivos em Ágar PCA-ANS

O método rápido de determinação de psicrotróficos preconizado pela Federação Internacional de Laticínios (IDF 132A:199) baseia-se na semeadura em Ágar leite padrão para contagem com incubação a 21°C por apenas 25 horas. Em busca de um método rápido que permitisse a diferenciação de Gram-positivos e negativos, testou-se o ágar PCA-ANS (PCA contendo o reagente fluorogênico; sal do ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfônico) com incubação a 30°C por 72 horas conforme preconizado por KWEE *et al.* (1988).

Os resultados comparativos de crescimento de *P. fluorescens*, *E. coli* e *L. innocua* em diferentes meios é mostrada na tabela 2. O PCA-ANS recuperou em maior número as bactérias Gram-positivas que as Gram-negativas, enquanto que nos meios seletivos Agar F para *Pseudomonas* (Merck) e VRBA (ágar cristal violeta bile) as contagens foram 10 vezes menores que em PCA.

DOMMETT *et al.* (1993) utilizaram PCA-ANS para diferenciação de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos em leite e verificaram que entre 52 amostras de leite cru as quais continham mais de $5,0 \times 10^4$ UFC/mL, as bactérias presentes tinham origem no ambiente sendo predominantes as Gram-negativas. Nas amostras em que houve predominância de Gram-positivas, estas foram originárias tanto do ambiente como dos animais com mastite. Em leite pasteurizado, a percentagem de Gram-negativos teve uma correlação direta com a contagem total.

Apesar da diferenciação entre Gram-positivos e Gram-negativos pelo método de PCA-ANS, a contagem das colônias sob luz ultravioleta é difícil. Desta forma, esta técnica só representa uma opção viável se a contagem for feita utilizando-se um analisador de imagem com iluminação de UV como o empregado por DOMMETT *et al.* (1993).

Tabela 02: Crescimento das culturas *P. fluorescens*, *E. coli* e *L. innocua* em meio não seletivo (PCA), em meios seletivos (ágar F e VRBA) em cultivo axênico e como cultura mista em meio não seletivo diferencial (PCA-ANS)

Mo Meio	<i>P. fluorescens</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. innocua</i>	<i>P. fluorescens</i> + <i>L. innocua</i>
PCA	$3,9 \times 10^8$	$4,6 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	-
AGAR F	$4,0 \times 10^7$	-	-	-
VRBA	-	$1,9 \times 10^7$	-	-
PCA-ANS	-	-	-	GN $2,3 \times 10^7$ GP $2,5 \times 10^8$

4.2 Utilização do Reagente Fluorogênico 8-Anilino-1 Naftaleno Sulfônico (ANS) para Testes Diretamente em Leite

Devido à dificuldade da contagem de colônias sob luz ultravioleta, foi testada a viabilidade do uso do reagente fluorogênico 8-anilino-1-naftaleno sulfônico (ANS) como indicador da presença de microrganismos Gram-positivos e negativos,

diretamente no leite. Não foi observada diferença entre os três microrganismos com o uso do reagente fluorogênico no leite, e portanto, não permitiu diferenciar Gram-positivos de negativos. Também não foi observada diferença de intensidade na leitura entre as concentrações de 1 a 10^7 UFC/mL. Todos os tubos foram positivos. No controle sem adição de inóculo também houve emissão de fluorescência, inviabilizando o teste.

4.3 Avaliação do Crescimento de *P. fluorescens*, *L. innocua* e *E. coli* em Leite UHT em Temperatura de 7°C

As curvas de crescimento dos microrganismos *P. fluorescens*, *L. innocua* e *E. coli* em leite incubado a temperatura de 7°C são mostrados na Figura 03. Observa-se que com 72 horas de incubação o crescimento de *P. fluorescens* chegou a 10^7 UFC/mL e *E. coli* de 10^3 UFC/mL.

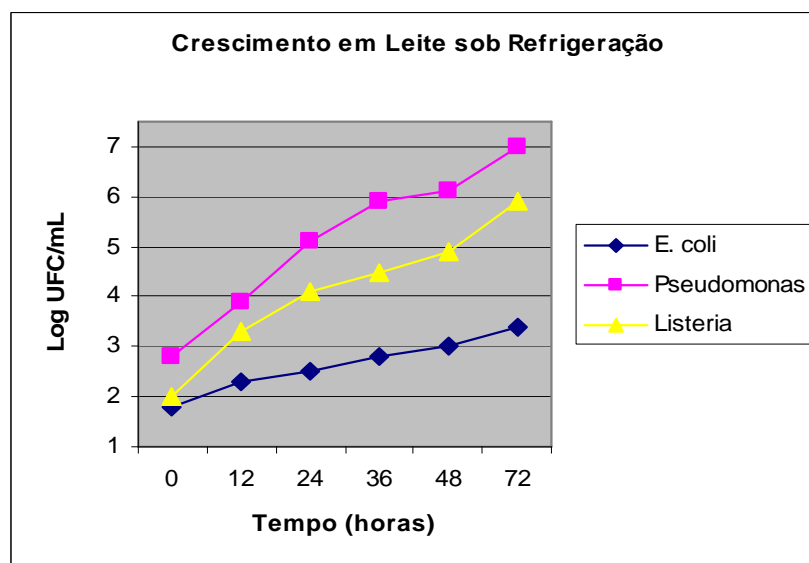


Figura 03: Crescimento das psicrotróficas *P. fluorescens* e *L. innocua* e do mesófilo *E. coli* em leite mantido a 7°C / 72horas.

Da mesma forma quando o crescimento foi avaliado pelo método da redução do TTC, verificou-se que não foi detectada a presença de *E. coli* após 120 horas de incubação a 7°C mesmo quando o nível de contaminação inicial era de *ca* 10^7 UFC/mL, conforme pode ser observado na Figura 04. Por outro lado, os psicrotróficos reduziram o TTC após 96 horas de incubação quando os níveis iniciais de contaminação eram de *ca* 10^5 e 10^6 UFC/mL, respectivamente para *P. fluorescens* e *L. innocua*.

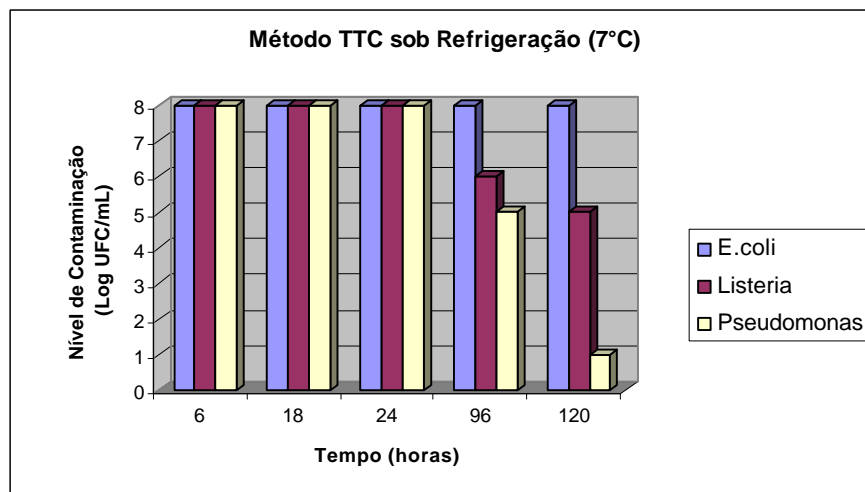


Figura 04: Nível inicial de contaminação dos psicrotróficos *P. fluorescens* e *L. innocua* e do mesófilo *E. coli* para detecção por redução do TTC em leite mantido a 7°C / 120 h.

Quando o leite for refrigerado rapidamente após ordenha é de se esperar que a contaminação inicial com coliformes não tenha significado importante na deterioração do leite. De acordo com CRAVEN et al. (1994) em pesquisa realizada na Austrália, os coliformes são a minoria dos microrganismos deteriorantes em leite pasteurizado fresco, enquanto os tipos de psicrotróficos encontrados neste produto foram na maioria Gram-negativos do gênero *Pseudomonas*. Coliformes e outras *Enterobacteriaceae* perfizeram apenas 3% do total de isolados. Da mesma forma, SOARES e PRATA (2004) correlacionaram contagem em placas de psicrotróficos e de mesófilos em 167 amostras de leite cru refrigerado e encontraram um valor de $r = 0,98$, mostrando que a imensa maioria dos psicrotróficos enumerados foi na verdade composta de microrganismos mesófilos que se adaptaram à condição oferecida pelos tanques de refrigeração.

4.4 Método de determinação de psicrotróficos por redução do TTC

4.4.1 Limite de Detecção de Psicrotróficos Gram-negativos

O limite de detecção do método de detecção de psicrotróficos Gram-negativos para a contaminação inicial com *Pseudomonas*, *E. coli* e *Listeria* são mostrados nas Figuras 05, 06 e 07.

Embora *E. coli* não seja psicrotrófica, foi testado seu comportamento por ser Gram negativa e contaminante comum do leite podendo ser um possível interferente.

Como esperado, os inibidores de Gram-positivos foram mais efetivos na inibição de *Listeria*, em comparação aos outros dois microrganismos, sendo o inibidor BC o mais efetivo deles, pois não permitiu o crescimento e, por consequência, a redução do TTC nem mesmo quando a concentração inicial era de $ca 10^7$ UFC/mL.

O sal biliar apresentou menor poder inibitório entre os três produtos testados. Em presença de sal biliar, foi detectado crescimento de *E. coli* e de *Listeria* nos tubos inicialmente inoculados com menos de 10 UFC/mL, enquanto que foi necessária uma contaminação inicial de *Pseudomonas* de 10^3 UFC/mL para positividade. Desta forma, conclui-se que o sal biliar é inapropriado como inibidor para detecção seletiva de psicrotróficos Gram-negativos (Figura 05).

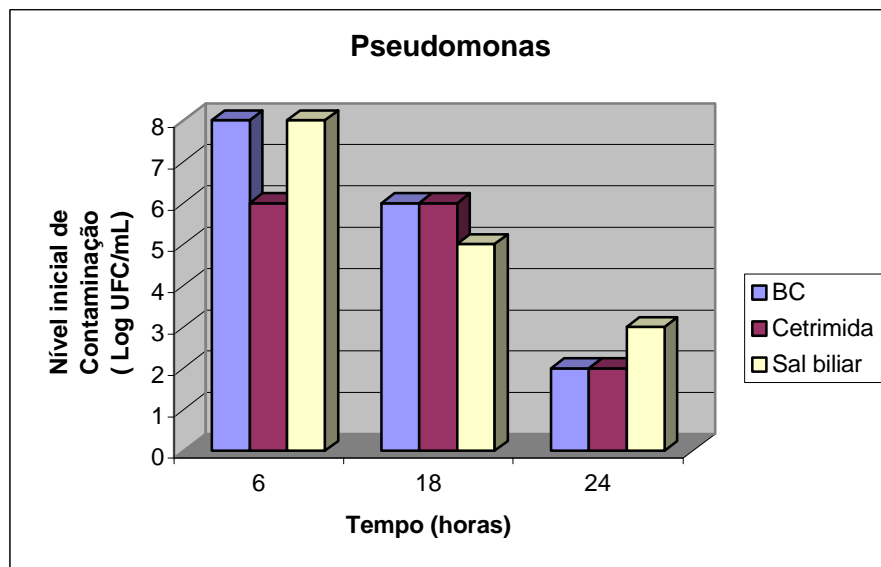


Figura 05: Limite de detecção de psicrotróficos Gram-negativos e interferentes (*P. fluorescens*), pelo método de redução do TTC em presença de diferentes inibidores de Gram-positivos (BC - cloreto de benzalcônio; Cetrimida e Sal biliar) Os resultados são médias de três repetições

Os inibidores cloreto de benzalcônio (BC) e cetrimida (CT) apresentaram desempenho semelhante, permitindo crescimento de *Pseudomonas* nos tubos inoculados inicialmente com cerca de 10^2 UFC/mL (Figura 5-A) e inibindo satisfatoriamente *Listeria* (Figura 06).

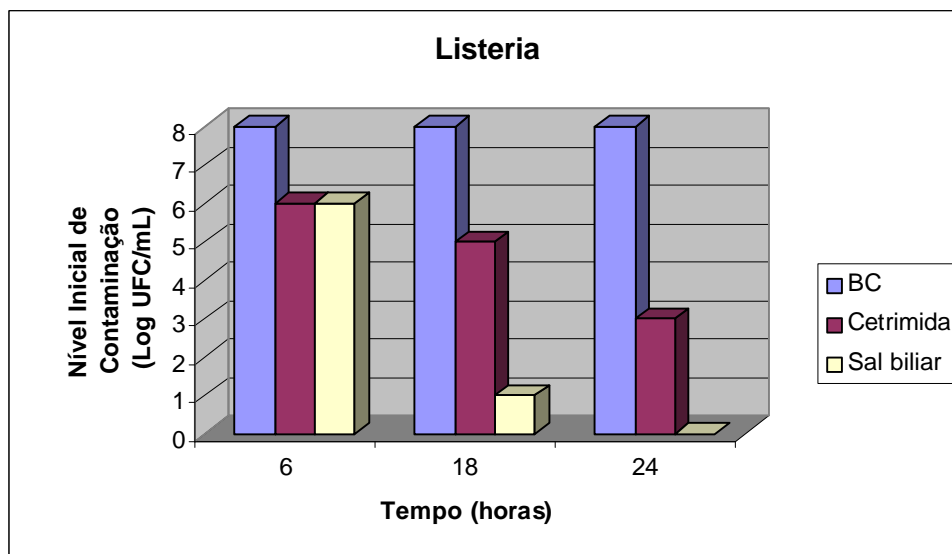


Figura 06: Limite de detecção de psicrotróficos Gram-negativos e interferentes (*Listeria innocua*), pelo método de redução do TTC em presença de diferentes inibidores de Gram-positivos (BC - cloreto de benzalcônio; Cetrimida e Sal biliar) Os resultados são médias de três repetições

O BC foi o melhor inibidor de *Listeria*, não sendo detectado crescimento com 24 horas de incubação nos tubos inicialmente inoculados com menos de 10^7 UFC/mL. Na ocorrência de um leite contaminado com psicrotróficos gram-positivos e negativos o teste permitiria detectar seletivamente psicrotróficos gram-negativos e, portanto, o BC foi o inibidor escolhido para este teste. Os resultados foram similares nas três repetições realizadas.

CRAVEN *et al* (1994) encontraram resultados semelhantes e verificaram que durante o período de incubação, as bactérias Gram-positivas eram inibidas por BC, enquanto as bactérias Gram-negativas continuavam a crescer. Com uma carga microbiana de 10^7 UFC/mL, o sal de tetrazólio era reduzido evidenciado pela mudança de cor para rosa. SOARES e PRATA (2004) utilizaram o método do TTC para estimar a qualidade microbiológica do leite cru refrigerado e concluíram que o teste rápido permitiu a identificação de 81,8% das amostras com contagens de psicrotróficos acima de 10^7 UFC/mL após 4 horas de incubação e de 94,5% das amostras com contagens de psicrotróficos acima de 10^7 UFC/mL após 6 horas de incubação

De acordo com CRAVEN *et al* (1994) em 60 amostras de leite pasteurizado analisadas de 13 laticínios os Coliformes e outras *Enterobacteriaceae* representavam apenas 3% e *Pseudomonas* 55%.

Dentre os três microrganismos, a *E. coli* foi a que apresentou maior resistência aos três inibidores. Com 24hs BC, cetrimida e sais biliares se mostraram ineficientes, pois foram positivos os tubos inicialmente inoculados com cerca de 1 UFC/mL (Figura 07 e 08). Entretanto é de se esperar que não haja predominância de *E. coli* no leite, devido a rápida refrigeração, como já foi observado por CRAVEN *et al.* (1994) e por SOARES e PRATA (2004)

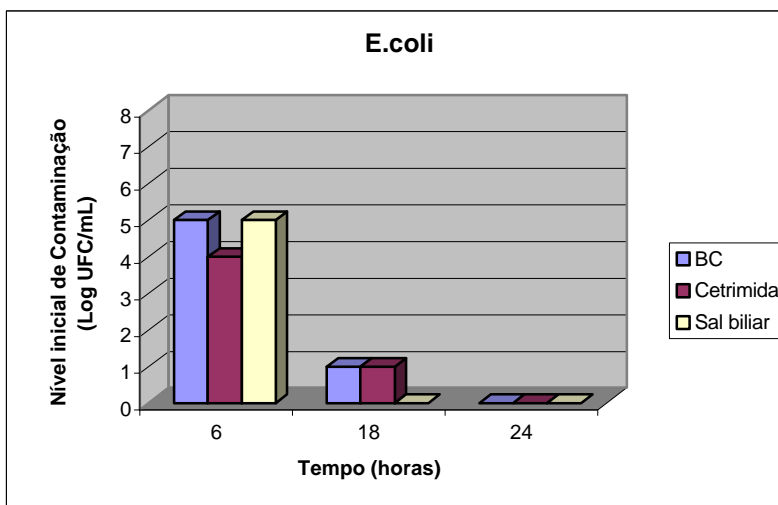


Figura 07: Limite de detecção de psicrotróficos Gram-negativos e interferentes (*E. coli*), pelo método de redução do TTC em presença de diferentes inibidores de Gram-positivos (BC - cloreto de benzalcônio; Cetrimida e Sal biliar) Os resultados são médias de três repetições



Figura 08: Crescimento de *E. coli* na presença de TTC e BC a 35°C

Segundo resultados observados este teste é preditivo da qualidade do leite, quando o principal problema for uma carga elevada de contaminação por psicotróficos devido à permanência por longo tempo em temperatura de refrigeração, tanto quanto o principal problema for uma carga elevada de contaminação por mesófilos pela exposição prolongada em temperaturas abusivas.

4.4.2- Limite de Detecção de Psicotróficos Gram-positivos

Os limites de detecção do método de determinação de psicotróficos Gram-positivos para a contaminação inicial com *Pseudomonas*, *E. coli* e *Listeria* são mostrados nas Figuras 09, 11 e 12 respectivamente e o crescimento desses microorganismos estão demonstrados nas Figuras 10 e 13, respectivamente.

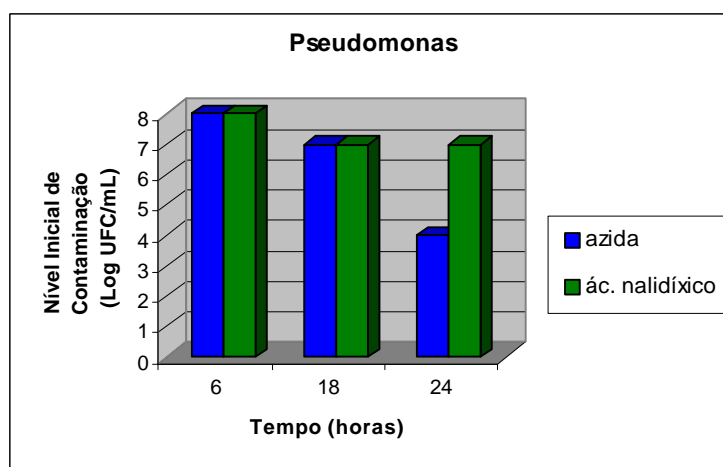


Figura 09: Limite de detecção de psicotróficos Gram-positivos e interferentes (*P. fluorescens*), pelo método de redução do TTC em presença de diferentes inibidores de Gram negativos (azida sódica e ácido nalidíxico)



Figura 10: Crescimento de *P.fluorescens* na presença de TTC e ácido nalidíxico a 30°C

O ácido nalidíxico como inibidor de bactérias Gram-negativas foi o mais efetivo, sendo necessária uma contaminação inicial no leite de $ca 10^7$ e 10^6 UFC/mL respectivamente para *Pseudomonas* (Figuras 09 e 10) e *E. coli* (Figuras 11) para redução do TTC com 24 horas de incubação. Por outro lado, o limite para a cultura desejada foi de 10^3 UFC/mL tanto para a azida quanto para o ácido nalidíxico.

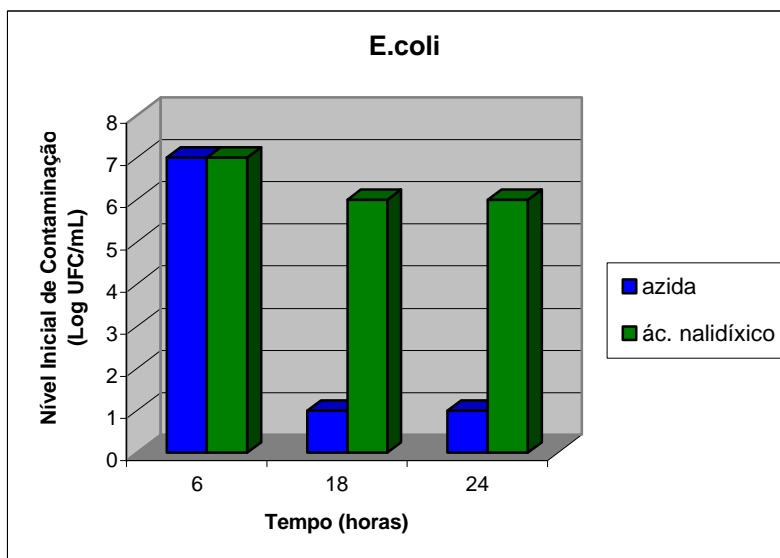


Figura 11 Limite de detecção de psicrotróficos Gram-positivos e interferentes (*E. coli*), pelo método de redução do TTC em presença de diferentes inibidores de Gram negativos (azida sódica e ácido nalidíxico)

A azida apresentou menor poder inibitório entre os dois produtos testados. Em presença de azida, foi detectado crescimento de *E. coli* nos tubos inicialmente inoculados com $ca 10$ UFC/mL. Após 18 horas de incubação, enquanto que foi necessária uma contaminação inicial tanto para *Pseudomonas* como para *Listeria* 10^4 /mL para positividade (Figura 12 e 13).

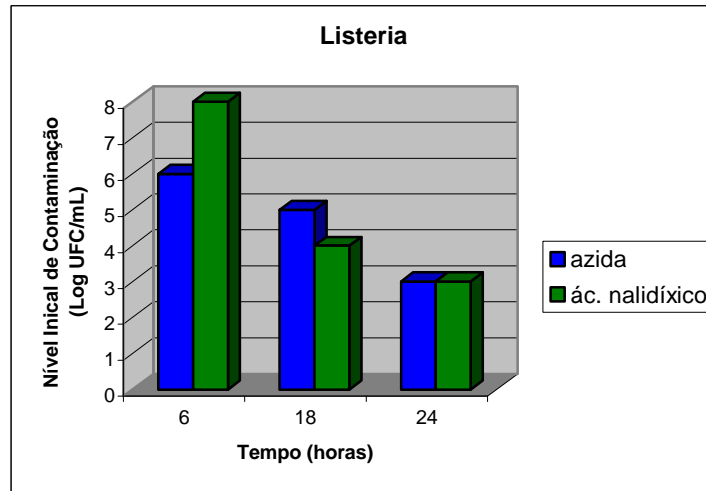


Figura 12: Limite de detecção de psicrotróficos Gram-positivos e interferentes (*Listeria innocua*), pelo método de redução do TTC em presença de diferentes inibidores de Gram negativos (azida sódica e ácido nalidíxico)



Figura 13: Crescimento de *L.innocua* na presença de TTC e ácido nalidíxico a 30°C

4.5 Verificação da eficiência do teste rápido em leite naturalmente contaminado

Os resultados de ambas as amostras foram semelhantes. Verificou-se que o método preconizado pela International Dairy Federation (IDF) utilizando ágar leite para psicrotróficos com incubação a 21°C por 24 horas recuperou um maior número de psicrotróficos que a metodologia convencional de semeadura em Ágar PCA com incubação a 7°C por sete dias.

Já a metodologia de redução do TTC recuperou número mais elevado que o obtido com semeadura em PCA, provavelmente equivalente aos níveis obtidos com o método IDF, 1991 (Tabela 03).

Portanto, mesmo que os inibidores empregados no teste de redução não sejam muito efetivos contra *E. coli*, quando o leite for mantido sob temperatura de refrigeração

os microrganismos que predominam são psicrotróficos, o que também corrobora com os resultados de crescimento sob refrigeração já mostrados na Figura 04.

Tabela 03: Determinação quantitativa de psicrotróficos por NMP em leite com TTC e por contagem em placas de ágar para psicrotróficos e ágar PCA.

Meio de cultura	Amostras	
	A	B
Leite c/TTC (NMP/mL)	$>1,1 \times 10^4$	$>1,1 \times 10^4$
Ágar leite para psicrotróficos (IDF 132A:199)	$4,5 \times 10^5$	$5,5 \times 10^5$
PCA	$6,6 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$
Caldo Lauril sulfato - Coliformes a 35°C (NMP/mL)	23	43
Caldo EC - Coliformes a 45°C (NMP/mL)	4	9

4.6 *Listeria* spp em superfícies

Dos 47 pontos analisados totalizando 94 amostras de superfícies, em 22 delas (23,4%) foi verificado crescimento nos caldos de enriquecimento primário e secundário, UVM e Fraser respectivamente, conforme mostrado na Tabela 04.

Segundo PARK et al. (2002) e KELLS e GILMOUR (2004) nas fábricas de laticínios a principal fonte de contaminação de *Listeria* é o ambiente das próprias unidades (drenos e pavimentos, especialmente os das áreas de refrigeração ou locais sujeitos a contaminação exterior. KELLS e GILMOUR (2004) monitoraram para a presença de *L. monocytogenes* durante um ano no ambiente (paredes, pisos, drenos e escadas) a superfície de equipamentos, leite cru e pasteurizado de dois laticínios da Irlanda do norte. A incidência de listeria nos equipamentos foi de 18,8% (6.3% *L. monocytogenes*), no ambiente foi de 54.7% (40.6% *L. monocytogenes*) e no leite cru 44.4% (22.2% *L. monocytogenes*). A principal fonte de *L. monocytogenes* no ambiente foram os drenos do piso e os degraus das escadas de aço inox.

Por outro lado resultados semelhantes aos obtidos nesta pesquisa foram reportados por COSENTINO e PALMAS (1997) que estudaram as condições de higiene em unidades de processamento de leite de ovelha na Itália e não detectaram a presença de *L. monocytogenes*. Resultados negativos podem decorrer do fato de tanto o leite como os produtos transformados estarem isentos da bactéria. Também é possível que em superfícies de equipamentos e ambientes estejam presentes células de *Listeria* no estado viável, mas não cultivável, portanto, os métodos de cultivo não seriam recomendados.

Tabela 04: Pontos de amostragem onde houve crescimento nos meios de enriquecimento primário e secundário e presença de colônias típicas em pelo menos um dos ágaros seletivos

Laticínio	Local amostrado	Método de amostragem	Nº de Tubos de caldo Fraser confirmados	Crescimento de Colônias típicas
A	Piso em frente ao tanque de preparo das mistura de sorvete	Escova e swab	10	ATN
	Parede interna do misturador de calda	swab	03	ATN
		Escova e swab	01	ATN
		swab	01	ATN
B	Mesa de envase de sorvete	Escova e swab	01	ATN
	Fabricação de queijo (Mesa de enformagem)	swab	00	-
		Escova e swab	00	-
		swab	01	ATN
	Piso abaixo da cuba de fabricação de ricota	Escova e swab	04	ATN
		swab	01	ATN
	Ralo - Sala de Processamento de queijo	Escova e swab	10	ATN
		swab	01	ATN
Piso da Sala de processamento queijo Minas	Escova e swab	00	-	
	swab	02	ATN	
C	Parede da Sala de processamento de Minas frescal	Escova e swab	10	ATN
		swab	02	ATN
D	Cuba de Fabricação de queijo Minas	Escova e swab	01	ATN
		swab	00	-
	Parede de Câmara de salga e secagem	Escova e swab	10	ATN
		swab	00	-
	Forma de dessora de Minas frescal	Escova e swab	04	ATN
swab		02	ATN	
E	Parede da sala de processamento de Minas frescal	Escova e swab	03	ATN
		swab	01	-
	Teto da câmara fria de salga	Escova e swab	03	ATN
	swab	00	-	
F	Piso da sala de envase de manteiga próximo ao ralo	Escova e swab	10	ATN,
		swab	00	Oxford
				-
Câmara fria de matéria - prima	Escova e swab	05	ATN	
	swab	00	-	

Nas áreas amostradas com escova e swab foi recuperado um maior número de células que naquelas amostradas apenas com swab. Em um dos laticínios, no piso em frente ao tanque de preparo de mistura de sorvete, amostrado com escova e swab, todos os dez tubos de caldo Fraser foram positivos, enquanto que na mesma área adjacente amostrada só com swab somente três tubos foram positivos.

JESSEN e LAMMERT (2003) verificaram que o tratamento mecânico é de fundamental importância na remoção de células aderidas em biofilmes e que a

escovação de superfícies remove até 81% de biofilmes, sendo apenas 19% removidos com rinsagem.

Nas amostras coletadas nos laticínios A, B, C, D e E só foi verificado crescimento de colônias presuntivas de *Listeria* em ágar ATN. Por outro lado, houve crescimento de colônias típicas em dois meios em amostra coletada no laticínio F. Entretanto, as 327 colônias isoladas não confirmaram-se como *Listeria* spp. por testes fenotípicos e sorológicos.

GIANFRANCESCHI *et al* (2003) encontraram em 505 amostras analisadas de produtos lácteos, 17,4 % das amostras positivas para *L. monocytogenes* com coleta por swab em superfícies.

Três fatores podem influenciar o desempenho de um meio de cultura: os constituintes do alimento, a microbiota acompanhante e o efeito do processamento e injúria sofrida pelos microrganismos (MOSEL, 1985). Embora agentes seletivos sejam necessários para inibir microrganismos competidores, têm sido reportados muitos efeitos adversos destes agentes em células de *Listeria* estressadas ou injuriadas. É certo que em todas as amostras utilizadas, tanto de superfície de equipamentos, como nas superfícies do ambiente, as células estavam estressadas ou até injuriadas pelo possível efeito dos produtos sanitizantes empregados pelas fábricas. É possível que estivessem presentes células de *Listeria* no estado viável mas não cultivável e, portanto, os métodos de cultivo não seriam recomendados.

Os métodos preconizados pela APHA e pelo BAM (RYSER E DONNELLY, 2001; HITCHINS, 2001) e o descrito na norma ISO 11290 abordam o problema de recuperação de células estressadas de maneira diferente.

No método do BAM os agentes seletivos são adicionados ao meio base após 4 horas de incubação, o que permitiria a recuperação das células em um ambiente mais favorável. No método ISO 11290 o enriquecimento primário é em caldo Half Fraser que contém a metade da concentração dos agentes seletivos. A capacidade tamponante destes meios também aumenta a capacidade de reparo das células (GASANOV *et al*, 2005).

Vários ágaros tem sido desenvolvido para diferenciar *L. monocytogenes* de outras espécies do gênero com base na produção de hemólise. ANONYMOUS (1996) e JOHANSSON *et al* (1998) observaram que a atividade β -hemolítica de *L. monocytogenes* pode ser inibida na presença de agentes seletivos. Desta forma, *L. monocytogenes* blood agar (LMBA) se mostrou superior aos ágaros Oxford e Palcam na recuperação *Listeria* spp. Em 54,7% das amostras de ambiente e em 18,7% de equipamentos das 64 amostras analisadas de duas plantas de processamento de leite. 6,25% de *L. monocytogenes* em equipamentos e 40,6% do ambiente.

GONÇALVES (1998) avaliou a contaminação por *Listeria* de amostras de frango congelado pelas metodologias do FDA e do USDA. De um total de 246 cepas de *Listeria* spp. isoladas, 36 foram detectadas através da metodologia do FDA (LOVETT *et al*, 1988), sendo que 6 cepas pertenciam à espécie *L. monocytogenes*. Pela metodologia do USDA (McCLAIN e LEE, 1988), 210 cepas de *Listeria* spp. foram detectadas e destas 46 pertenciam à espécie *L. monocytogenes*. Portanto 85% das cepas isoladas foram confirmadas pela metodologia do USDA contra apenas 15% pelo método do FDA.

RODRIGUES *et al*. (2003) observaram que o melhor meio para recuperação de *Listeria* em amostras de alguns alimentos e de ambiente foi o ágar hemolítico ceftazidima cloreto de lítio. Este meio permitiu o isolamento de *Listeria monocytogenes* em 100% das amostras do ambiente e 43,4% das amostras de equipamentos de uma indústria de “nuggets” de frango, enquanto a recuperação em ágar Palcam e ágar

cloreto de lítio com feniletanol e moxalactam, foi respectivamente 61,1 e 55,6% em amostras do ambiente.

KELLS e GILMOUR (2004) compararam a recuperação de *L. monocytogenes* nos meios seletivos LMBA (*L. monocytogenes* blood agar), Oxford e Palcam encontrando respectivamente 94,1%, 76,5% e 79,4%.

OLIVEIRA *et al* (2003) desenvolveram um método rápido para a detecção específica e contagem de *Listeria monocytogenes* em leite. Este método baseia-se na técnica FISH (Fluorescent In Situ Hybridization), e recorre a uma sonda fluorescente de 19 oligonucleótidos, homóloga ao 16S rRNA de *L. monocytogenes*, e adaptada de uma técnica de hibridação dot-blot (Wang et al., 1991). O protocolo foi estabelecido através da hibridação de 68 estirpes de referência, e testado em 114 isolados de *Listeria* obtidos a partir de amostras de alimentos e ambientais, incluindo *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri*. A sonda hibridou especificamente com todas as serovariedades de *L. monocytogenes*, não se tendo observado hibridações cruzadas com as outras estirpes. O protocolo foi aplicado à detecção direta de *L. monocytogenes* em amostras de leite naturais e contaminadas artificialmente, e a relação entre o método de plaqueamento tradicional e a contagem de células por FISH foi avaliada. Os resultados demonstram que esta técnica é promissora para a detecção rápida e contagem de *L. monocytogenes* em amostras de alimentos e ambientais, permitindo a sua identificação positiva em aproximadamente sete horas.

5 CONCLUSÕES

- O teste rápido baseado na redução do TTC mostrou-se vantajoso por ser simples e rápidos com resultados em 24 horas, de custo acessível e o mais importante, detectando baixos níveis de psicrotróficos.
- O teste para detecção de psicrotróficos Gram-negativos, usando-se BC como inibidor, foi eficaz, sendo capaz de detectar, com 24 horas, uma contaminação inicial com *Pseudomonas* de apenas 10^2 UFC/mL, enquanto psicrotróficos Gram-positivos como *Listeria* só foram detectados com um população de mais de 10^7 UFC/mL.
- Entre os três microrganismos, a *E. coli* foi a mais resistente aos inibidores BC, cetrimida e sais biliares nas concentrações utilizadas.
- A azida é inapropriada como inibidor para detecção seletiva de psicrotróficos Gram-positivos; enquanto o ácido nalidíxico foi o melhor inibidor de Gram-negativos tanto psicrotróficos como mesófilos.
- O ácido nalidíxico é adequado como inibidor de microrganismos Gram-negativos psicrotróficos e mesófilos.
- Com relação ao método empregado para detecção de *Listeria* spp em ambientes, verificou-se a necessidade do desenvolvimento de metodologias rápidas que permitam uma seletividade adequada sem prejuízo da detecção de células injuriadas;
- É possível que em superfícies de equipamentos e ambientes estejam presentes células de *Listeria* no estado viável, mas não cultivável, portanto, os métodos de cultivo não seriam recomendados

6 SUGESTÕES

O trabalho de melhoria da qualidade bacteriológica do leite junto aos produtores, assim como, as boas práticas de produção devem ser implantadas nas propriedades e devem ser constantes, pois a carga microbiana inicial é decisiva na qualidade do produto final.

São necessários realizar os testes de validação do kit rápido para detecção de psicrotróficos Gram-positivos e Gram-negativos no leite.

Para trabalhos futuros são recomendáveis estudos da recuperação de *Listeria* spp aderidas em superfícies como culturas puras e em combinação com outros microrganismos com características ecológicas similares.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIOT, J. **Ciência y Tecnología de La Leche**. Ed.Acribia, 1991.

APHA (American Public Health Association).**Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**.4th ed.Washington,D.C., 676p., 2001.

BAYLEY, J. S.; FLETCHER, D.L.; COX, N. A. Effect of enrichment of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.53, n.6, p.505-507, 1990 a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Instrução Normativa n 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo... **Diário oficial da União**, Brasília, 23 de setembro de 2002, p.13,21 Seção I.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico de princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 jan. 2001. Seção I.

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

COSENTINO, S.; PALMAS, E. Hygienic Conditions and Microbial Contamination in Six Ewe's Milk Processing Plants in Sardinia, Italy. **Journal of Food Protection**, v. 60, 283-287, 1997

CRAVEN, H.M.; FORSYTH, S.R; DREW, P.G.; MACALEY, B.J. A New technique for early detection of Gram-negative bacteria in Milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v 49, p.54-56, 1994.

DOMMETT, T.W.; KWEE, W.S.; VOS, A.C. Practical application of the PCA-ANS method for diagnosis of milk contamination sources. Department of Primary Industries, Australia. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.48, 82-85, 1993.

FENLON, D. R.; J. WILSON. J. 1989. The incidence of *Listeria monocytogenes* in raw milk from farm bulk tanks in North-East Scotland. **Applied Bacteriology**, v. 66, n.191, 1989.

FRANCO, B.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 1 ed. São Paulo: Ateneu, 1996, 182 p.

FURTADO, M. **Principais Problemas dos Queijos – Causas e Prevenção**, São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 1999, 176 p.

GIANFRANCESCHI, M.; GATTUSO, A.; TÁRTARO, S. Incidence of *Listeria monocytogenes* in food and environmental samples in Italy between 1990 and 1999: Serotype distribution in food, environmental and clinical samples. **European Journal of Epidemiology**, v. 8, p. 1001- 1006, 2003.

GONÇALVES, P.M. Isolamento e Identificação de *Listeria* spp. a partir de amostras de cortes de peito de frango congelados. **Dissertação de mestrado**, p.111,1998.

GOUNOT, A.M. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. **Nederland's Melk en Zuiveltijds**, Chicago, n.42, p.1192-1197, 1986.

GRIFFITHS, M. W. *Listeria monocytogenes*: importance in the dairy industry. **Journal . Science. Food Agriculture**.v.47,n.133,1989.

HARRIGAN,W.F. Laboratory Methods in Food Microbiology. **Academia Press**.3rd edition, 1998. 532p.

HITCHINS, A.D.; TRAN, T. Initial cell concentration and selective media effects on the isolation of *Listeria monocytogenes* from enrichment cultures of inoculated foods. **Journal of Food Protection, Ames**, v. 53, n. 6, p. 502- 504, 1990.

HOFER, E.; NASCIMENTO, R.S.;OLIVEIRA, M.A.Meningite por *Listeria monocytogenes* . Relato de casos no Distrito Federal.**Rev. Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 31, n.2, 1998.

HOLT, J.G.; KRIEG, N. R; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T.Regular, nonsporng gram-positive rods. Genus *Listeria*. In: HENSYL, W. R (Ed.).**Berguey's manual of sistematic bacteriology**. 9thed. Baltimore: Willians Wilkins, p.565-570, 1994.

JAY, J.M. **Microbiología moderna de los alimentos**. 3.ed. Zaragoza: Acribia, 804p, 1994.

KELLS, J.; GILMOUR, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments, and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation **International Journal of Food Microbiology**, v. 1, p. 167-174, 2004.

KNABEL, S. J. Optimized, one-step, recovery-enrichment broth for enhanced detection of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk and hot dogs. **Journal AOAC Int.**, v.85, p.501-504, 2002.

KWEE, W.S.; DOMMETT, T.W.; VOS, A.C.Fluorogenic Medium for Differential Gram-negative, Gram positive and Total Bacterial Counts in Liquid Milks. Department of Primary Industries, Australia. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.43, 50-53, 1988.

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

LOVETT , J.; FRANCIS, D.W; HUNT, J.M. *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence, and pathogenicity.**Journal of Food Protection** , v.50, n.3, p.188-192, 1988.

- MACKEY, B. M., N. BRATCHELL. 1989. The heat resistance of *Listeria monocytogenes*. **Lett Appl.Microbiol.**, v.9 n.89, 1989
- Mc CLAIN, D.; LEE, W.H. Development of USDA-FSIS Method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**,v.71, n.3, p.660-664,1988.
- MERCK. **Manual de médios de cultivo**. Dormstadt, 1982
- MOSSEL, D.A.A. Introduction and perspective. **International Journal of Food Microbiology**, v. 2, p. 1-7, 1985
- MURPHY, SC.; BOOR, K.J. Raw milk bacteria tests and elevated bacteria counts on the farm: a review. **In: Panamerican Congress on Mastitis Control and Milk Quality Proceedings**. México: (s.n.),p.232-235, 1998.
- OLIVEIRA, M.; ANDRADE, G.; GUERRA, M.; BERNARDO, F. Development of a Fluorescent In Situ Hybridization protocol for the rapid detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in milk. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias** , v. 98, n.547, p 119-124, 2003.
- OLIVEIRA, C.A.; FONSECA,L.F.L.;GERMANO,P.M.L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite.**Higiene Alimentar** ,v.13,n.62,p.11-16, 1999.
- PARK, S.L.; SPAHR, U; JEMMIT, T e SALMAN, M.D. Risk Factors for *Listeria monocytogenes* contamination of Dairy Products in Switzerland, 1990-1999. **Preventive Veterinary Medicine.**,v. 53, p.55-65, 2002.
- ROBINSON, R.K. **Microbiologia lactologica-microbiologia de la leche**. Zaragoza: Acribia.,v.1, 230p, 1987.
- RODRIGUES, D.A.; FRANCO, B.G.M.; LANDGRAF, M. e DESTRO, M.T. Avaliação da eficiência de três ágaros seletivos no isolamento de *Listeria monocytogenes*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 87-92, 2003.
- RYSER, E. T.; MARTH, E. H. *Listeria*, listeriosis and food safety. New York: **Marcel Dekker**, 632p, 1991
- SILVA, M.C., HOFER E., TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in Cheese produced in Rio de Janeiro,Brazil. **Journal of Food Protection**,v.61,n.3, p.354-356, 1998.
- SILVEIRA, I.; CARVALHO, E.P.;TEIXEIRA, D. **Revista Higiene Alimentar**. Disponível em: <http://www.bichoonline.com.br/artigos>. Acesso em : 14 de abr.2005.
- SCHLECH, W. F. Overview of listeriosis. **Food Control**, v.7, n.4/5, p.183-186, 1996.
- SKOVAARD, N.; MORGEN C. A. Detection of *Listeria* spp. in faeces from animals, in feeds and in raw foods of animal origin. **International Journal of Food Microbiology** v. 6, n.229,1988.

SMITH, A. R. B.; ARCHER, D. L. Heat- induced injury in *Listeria monocytogenes*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, n.1, p.105-110, 1988.

SOARES, P. V. PRATA, L.F. : Estimativa rápida da carga de microrganismos psicrotróficos em leite cru refrigerado. **I Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite; Milkpoint e Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite – CBQL**, Universidade de Passo Fundo/RS, 2004.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L.; Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Food Science and Technology**, v.8, 1997.

TRONCO, V.M. Manual para Inspeção da Qualidade do Leite. 2ª ed. UFSM, p.45-49, 2003. VILLAR, A.; GARCIA, J.A.; IGLESIAS, L.; GARCIA, M.L.; OTERO, A. **International Dairy Journal**, v.6, p.935-937, 1996.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg, and Environmental Samples . **Laboratory Guidebook**, p.1-20, 2006.

VAN DENDER, A. G. F. *Listeria monocytogenes*: um problema em leite e produtos lácteos. **Inf Agropec.**, v. 13, n.155, p. 19-23, 1995.

WANG, R. F., CAO, W.W.; JOHNSON, M. G. Development of a 16S rRNA-based oligomer probe specific for *Listeria monocytogenes*. **Applied Environmental Microbiology** v. 57, 3666-3670, 1991

YOUSEF, A.E.; RYSER, E. T.; MAARTH, E. H. Methods for improved recovery of *Listeria monocytogenes* from cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 54, n.11, p.2643- 2649, 1988.

ZALL, R. R.; CHAN, J. H. Heating and storing milk on dairy farms before pasteurization in milk plants. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.64, n.7, p.1540-1544, July. 1981.