



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**ARTHUR VINICIUS LAGO LOPES**

**Micro-organismos indicadores e caracterização  
de *Escherichia coli* isoladas de leite cru refrigerado**

**Recife**

**Fevereiro - 2018**

ARTHUR VINICIUS LAGO LOPES

**Micro-organismos indicadores e caracterização  
de *Escherichia coli* isoladas de leite cru  
refrigerado**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Medicina veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária

Orientador: Prof<sup>ª</sup>Dr<sup>ª</sup> Emiko Shinozaki Mendes

**Recife**

**Fevereiro - 2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

L864m Lopes, Arthur Vinicius Lago  
Micro-organismos indicadores e caracterização de *Escherichia coli* isoladas de leite cru refrigerado / Arthur Vinicius Lago Lopes. – 2018.  
40 f. : il.

Orientadora: Emiko Shinozaki Mendes.

Coorientadora: Anamélia Salles de Assis.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Recife, BR-PE, 2018.

Inclui referências.

1. Mesófilos 2. Coliformes 3. Refrigerado I. Mendes, Emiko Shinozaki, orient. II. Assis, Anamélia Salles de, coorient. III. Título

CDD 636.089

ARTHUR VINICIUS LAGO LOPES

# **Micro-organismos indicadores e caracterização de *Escherichia coli* isoladas de leite cru refrigerado**

Dissertação de mestrado apresentado a Coordenação de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Aprovado em: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

---

Profª Dra Emiko Shinozaki Mendes - UFRPE

---

Profª Dra Anamélia Sales de Assis – UFRPE/UAG

---

Prof Dr José do Egito de Paiva - UFRPE

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que contribuíram no decorrer desta jornada, em especialmente:

A Deus, a quem devo minha vida.

A minha mãe Suely que durante esses dois anos sempre esteve ao meu lado dando todo suporte emocional que eu poderia ter, a ela todas as minhas conquistas.

A minha família, em especial minha Tia Noemí que sempre me apoiou e incentivou.

Ao meu cachorro, Pildas, que esteve ao meu lado durante todo tempo e sempre esperava meu retorno para casa com carinho e alegria.

Aos meus amigos que a vide me deu, todo meu carinho e sem eles eu não teria força de chegar até aqui

A minha Coorientadora Prof Dra Anamélia Sales de Assis que prontamente aceitou o convite de participar desse projeto e pela ajuda incrível no município de Granhuns.

Aos integrantes do CENELAG (UFRPE/UAG) que auxiliaram bastante nesse trabalho, em especial a Monnykhe Lorena.

Aos integrantes do LASAq – UFRPE, em especial a Prof Dra Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva pelo importante auxílio na fase final do projeto.

A Juliana Nunes Carvalho, Rejane de Oliveira Nunes e Carolina Notaro de Barros pelo apoio durante o início dessa jornada microbiológica.

E a minha orientadora, Prof Dra Emiko Shinozaki Mendes que me ofereceu essa oportunidade de hoje me tornar Mestre! A ela todo meu agradecimento.

**MUITO OBRIGADO!!**

## RESUMO

O armazenamento de alimentos a baixas temperaturas é a forma de conservação mais utilizada na produção e distribuição de alimentos frescos. A prática de estocagem do leite cru refrigerado na fonte de produção foi instituída pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA em 2002, visando reduzir as perdas por ação acidificante de mesófilos. A pesquisa de micro-organismos contaminantes permite a identificação das falhas que levam a proliferação desses grupos bacterianos com consequente perda da qualidade do produto, e possibilita a adoção de medidas de controle de forma a atender os padrões estabelecidos pela legislação. Objetivou-se determinar a qualidade microbiológica do leite cru de 12 propriedades localizadas no agreste pernambucano, por meio de quantificação de mesófilos e coliformes, que são os micro-organismos indicadores de eleição para o controle da qualidade do leite cru refrigerado, cujo as quantidades máximas permitidas são estabelecidas na legislação vigente. Após a quantificação e o estabelecimento do efeito da refrigeração, 80 isolados desses micro-organismos foram estocados e passaram por testes moleculares para identificação genotípica da espécie *Escherichia coli* cepa O157:H7. A refrigeração por 24 horas não interferiu na proliferação microbiana ( $P \geq 0,05$ ) e a *E. coli* O157:H7 não foi identificada. Conclui-se que o leite produzido nas propriedades de três municípios que compõem a bacia leiteira do estado de Pernambuco apresenta baixa qualidade microbiológica, o que pode resultar em prejuízo aos produtores.

**Palavras-chave:** Inspeção, Laticínios, Enterobacteriaceae

## SUMÁRIO

Introdução.....	5
Revisão de literatura .....	7
Referências bibliográficas.....	22
Artigo.....	30

## INTRODUÇÃO

A indústria leiteira é uma atividade que movimenta setores da economia de forma espacialmente descentralizada. No entanto, observa-se uma grande heterogeneidade no processo produtivo em relação à adoção de processos e tecnologias. Este fato é claramente refletido na ampla variação da qualidade da matéria prima que chega às indústrias de laticínios.

O leite, por ser constituído por uma mistura complexa, nutritiva, com alta atividade de água e pH próximo a neutralidade torna-se altamente perecível, pois constitui um substrato favorável ao crescimento microbiano. Dependendo da manipulação submetida, tem suas características físicas, químicas e biológicas facilmente alteradas pela ação de micro-organismos (ARCURI et al., 2006). Devido as suas características, o leite requer uma atenção especial em sua produção, beneficiamento, comercialização e consumo por estar sempre sujeito a uma série de alterações. Vários fatores, como o estado sanitário do rebanho, a limpeza dos equipamentos e utensílios destinados à sua obtenção, as condições sanitárias do local de ordenha e a qualidade da água utilizada na propriedade podem influenciar na qualidade microbiológica do leite (AMARAL et al., 2003).

Dentre os alimentos de origem animal, o leite, pela sua riqueza já previamente anunciada, constitui um importante meio de cultura para o desenvolvimento de um grande número de micro-organismos (BERSOT et al., 2010). Com isso o principal parâmetro utilizado para se verificar a qualidade desse produto é o seu perfil microbiológico, determinado principalmente pela forma de obtenção, armazenamento e transporte. Alguns grupos específicos de micro-organismos são frequentemente pesquisados como os aeróbios mesófilos e coliformes (BECKER, et al. 2010).

Os mesófilos incluem um grupo de microrganismos capazes de se multiplicarem numa faixa de temperatura entre 20 e 45 °C, tendo uma temperatura ótima de crescimento a 32 °C e, portanto, encontrando nas temperaturas ambientes de países de clima tropical, condições ótimas para o seu metabolismo (FRANCO e LANDGRAF, 1996). Esse grupo é muito importante, por incluir a maioria dos contaminantes do leite, tanto deterioradores como patógenos. É considerado um bom indicador de qualidade microbiológica, sendo a contagem

microbiana em placa realizada para se avaliar as condições higiênicas na qual o produto foi processado (TEIXEIRA et al., 2000).

Os coliformes são indicadores de contaminação fecal e do risco da presença de micro-organismos patogênicos, que podem causar toxinfecções no consumidor. Os estafilococos são de grande importância por serem produtores de enterotoxinas termoestáveis, que podem chegar ao consumidor mesmo através de leite submetido a pasteurização (MURPHY e BOOR, 2000).

A *Escherichia coli* O157:H7 é uma bactéria patogênica, pertencente ao grupo da *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), e é responsável por diversos surtos envolvendo o consumo de produtos de origem animal e de água contaminados. Dentre estes produtos, destacam-se o leite e seus derivados. É uma bactéria que não apresenta resistência ao processo de pasteurização, porém resiste ao resfriamento e ao congelamento.

A detecção da *E. coli* O157:H7 em alimentos pode ser feita utilizando as técnicas tradicionais de cultivo bacteriológico ou as técnicas moleculares. Com o passar do tempo e com a necessidade da realização da detecção em um curto espaço de tempo utilizando uma técnica menos trabalhosa, as técnicas moleculares ganharam uma grande importância no controle bacteriológico dos alimentos. Dentre estas técnicas, destaca-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A PCR é uma técnica promissora para ser utilizada na detecção de microrganismos na indústria alimentícia por conferir o resultado em um pequeno espaço de tempo e por ter a capacidade de detectar as células viáveis e não-viáveis em um alimento.

Os objetivos do presente experimento foi realizar comparação das contagens de mesófilos e de coliformes totais e termotolerantes no início e ao final das 24 horas de estocagem de leite sob refrigeração na propriedade, com isolamento de colônias para posterior identificação. Comparar a carga microbiana do leite antes e após o armazenamento em refrigeração e caracterizar *Escherichia coli* isolados e identificados.

## **REVISÃO DE LITERATURA**

### **1. Leite**

#### **1.1 Definição**

O leite tem como definição o produto oriundo da secreção mamária de mamíferos, sendo constituído por proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas, sais minerais e água. Sob o ponto de vista físico-químico, o leite é uma emulsão natural perfeita, em que os glóbulos de gordura estão mantidos em suspensão, em um líquido salino açucarado, devido à presença de substâncias proteicas e minerais em estado coloidal. Na ótica higiênica, é o produto íntegro da ordenha total e sem interrupção de uma fêmea leiteira em bom estado de saúde, bem alimentada e sem sofrer cansaço, isento de colostro, recolhido e manipulado em condições higiênicas (MORAES,2005).

De acordo com a Instrução Normativa (IN) nº 62, entende-se por leite o produto obtido da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas leiteiras sãs, bem alimentadas e em repouso. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie da qual proceda. A IN/62 preconiza que leite cru refrigerado é o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas, refrigerado e mantido na temperatura máxima de 7°C, na propriedade rural/tanque comunitário, e à temperatura de 10°C no estabelecimento processador (BRASIL, 2011).

#### **1.2 Qualidade do leite**

A qualidade do leite é um termo vasto que abrange a segurança sanitária e o valor nutricional, sendo determinada pelo sabor, integridade, inocuidade e valor nutritivo (FAGAN et al., 2008). O leite é considerado íntegro quanto não sofre a adição de substâncias nem a remoção de componentes, deterioração física, química ou microbiológica e quando está livre de patógenos (LOPES JÚNIOR, 2010; FAGAN, 2006; BECKER et al., 2010). Já a composição está ligada ao valor nutricional e industrial do leite (FAGAN, 2006).

Por suas características físicas, químicas e biológicas, o leite é um produto sensível e altamente perecível, sendo facilmente alterado pela ação de micro-organismos. Durante a ordenha e após deixar o úbere, o leite entra em contato com inúmeros micro-organismos

contaminantes presentes no ambiente, esta contaminação possui uma variação tanto qualitativa quanto quantitativamente, dependendo das condições climáticas da região, da higiene do ordenhador, do ambiente, dos utensílios e equipamentos utilizados na propriedade. Com isso, o leite e seus produtos derivados podem levar a surtos de toxinfecções alimentares, causados por uma infinidade de micro-organismos que encontraram no leite um substrato ideal de crescimento (WINCK et al., 2010).

A produção de leite limpo e sadio é denominado de higiene leiteira que tem como objetivo oferecer um produto com valor nutricional que não comprometa a saúde humana. De início, o leite contamina-se na fazenda durante ou após a ordenha, devido à falha de higienização de utensílios e do ordenhador, além de doenças do rebanho. Não se deve esquecer que as dificuldades de transporte, falhas no processo de beneficiamento e a estocagem podem interferir diretamente sobre a qualidade do leite (GARCIA et al., 2000).

Segundo dados da Pesquisa Pecuária Municipal divulgada pelo IBGE (2014), a produção leiteira no Brasil foi de 35,17 bilhões de litros representando um aumento de 2,7% em relação a registrada no ano anterior e gerando um valor de produção de R\$ 33,78 bilhões de reais. A região nordeste correspondeu a 11,1% da produção nacional com um preço médio de R\$ 1,11. De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), O Brasil ocupou a quinta posição no ranking mundial de produção de leite em 2014, ficando atrás da União Europeia, Índia, USA e China.

O Brasil perde em competitividade no mercado mundial por apresentar problemas de eficiência produtiva e de qualidade da matéria-prima, já que o leite *in natura* apresenta altas contagens de mesófilos aeróbios e coliformes (VALLIN et al., 2009).

A indústria leiteira mundial atravessa um período de intensas transformações em sua estrutura, podendo-se identificar como principais tendências a diferenciação do pagamento ao produtor, o aumento nas exigências de qualidade por parte dos centros industriais, assim como uma maior preocupação dos consumidores com relação à segurança dos alimentos (GUERREIRO et al., 2005; ALMEIDA, 2006).

As atitudes que envolvem a melhoria da qualidade do leite ao nível de produção são complexas e requerem o esforço conjunto de todos os setores relacionados (BECKER et al., 2010). O principal objetivo dos programas de qualidade do leite é assegurar a preservação da qualidade nutricional, do sabor e da aparência originais do produto, e, a ausência de micro-

organismos nocivos e de adulterantes. O mercado exige cada vez mais que os alimentos, incluindo produtos lácteos, sejam seguros e nutritivos para o consumo, isto porque a quantidade de micro-organismos influencia na vida de prateleira e no tipo de produto para o qual o leite pode ser utilizado (GUIMARRÃES, 2008).

Programas de qualidade, como Boas Práticas de Fabricação e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) determinam verificação da contaminação microbiana e procedimentos higiênicos em etapas chave da produção sendo fundamentais para minimizar possíveis contaminações e garantir qualidade e segurança final (YAMAZI et al., 2010). As principais vantagens para os produtores que implantam esses programas são o aumento da competitividade, o oferecimento de produtos diferenciados e a maior garantia de permanência nos mercados. Para os consumidores, a principal vantagem é a garantia de alimentos seguros e de alta qualidade (SANTOS, 2007).

Essas práticas são constituídas na exclusão, remoção, eliminação, inibição da multiplicação de micro-organismos indesejáveis e/ou corpos estranhos e devem ser implantadas em toda a cadeia produtiva. Além disso, as Boas Práticas devem assegurar que o leite seja produzido a partir de animais saudáveis, livres de resíduos e dentro de condições sócio ambientais adequadas (SANTOS, 2007).

A IN 62 recomenda alguns cuidados antes e após a ordenha, como a lavagem dos tetos dos animais seguindo-se pela secagem com toalhas descartáveis e início imediato da ordenha com descarte dos jatos iniciais em caneca de fundo escuro. A legislação ainda recomenda que se adote o sistema de desinfecção dos tetos antes da ordenha com produtos desinfetantes e a secagem criteriosa, em casos de mastite. O leite obtido deve ser coado em recipiente apropriado de aço inoxidável, náilon, alumínio ou plástico atóxico (BRASIL, 2011).

## **2. Perfil microbiológico do leite**

O perfil microbiológico é o principal parâmetro utilizado para se verificar a qualidade do leite, determinado principalmente pela forma de obtenção, armazenamento e transporte. Os grupos específicos de micro-organismos pesquisados para esse fim são os aeróbios mesófilos, coliformes e psicrotróficos (CHAMBERS, 2002). A avaliação microbiológica é um parâmetro importante para a determinação da qualidade do leite cru, pois indica as condições de higiene em que o leite foi obtido e armazenado, desde o processo de ordenha até o consumo. Um leite de baixa qualidade microbiológica não mantém a conservação por longos

períodos mesmo sob refrigeração, principalmente pela sua contaminação por bactérias psicrotróficas formadoras ou não de esporos, que apesar de seu crescimento lento, produzem grandes quantidades de enzimas lipolíticas e proteolíticas que rapidamente alteram o produto (BISHOP e WHITE, 1998; CRAVEN e MACAULEY, 1993).

A carga microbiana inicial está correlacionada com a limpeza dos utensílios utilizados para retirada e transporte do leite. Deste modo, a higienização dos equipamentos e utensílios de ordenha são os principais fatores responsáveis pela produção de leite de alta qualidade. Avalia-se que 95% dos problemas com altas contagens bacterianas estejam relacionadas a deficiências na limpeza de utensílios e do sistema de ordenha e deficiências na higiene da ordenha (FONSECA e SANTOS, 2000).

Altas contagens bacterianas comprometem o processamento do leite e seus derivados em função de desequilíbrios como acidificação e coagulação, produção de gás, coagulação sem acidificação, aumento da viscosidade, alteração de cor e pela produção de sabores e odores indesejáveis (LANGE e BRITO, 2000).

### **2.1 Micro-organismos indicadores**

O termo micro-organismo indicador foi proposto por Ingran, em 1977, referindo-se a um organismo marcador, cuja presença possa detectar a possível presença de outro micro-organismo patogênico, com características ecologicamente similares. São considerados como micro-organismos indicadores de condições higiênico-sanitárias: coliformes totais, coliformes termotolerantes, enterococos e enterobactérias totais; indicadores de contaminação de origem fecal (humanos e animais de sangue quente): *Escherichia coli*; e indicadores da condição de deterioração do alimento e das condições ambientais: micro-organismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos, termófilos, bolores e leveduras.

A quantificação e tipificação dos micro-organismos fornecem informações sobre as condições de higiene durante várias etapas da produção de leite na propriedade, assim uma série de métodos microbiológicos são empregados para monitorar a qualidade higiênica de leite cru, dentre elas incluem a contagem total de mesófilos aeróbios, a contagem de micro-organismos psicrotróficos, e a contagem de coliformes (JAYARAO et al., 2004).

A contagem total de mesófilos aeróbios é o método mais comum para a verificação da qualidade bacteriana do leite, fornecendo uma visão geral das condições de higiene na obtenção, estocagem e transporte do leite, contudo, é um diagnóstico limitado para

identificação da fonte de contaminação bacteriana. Já a contagem de micro-organismos psicrotróficos é um método seletivo para estimar as bactérias que se desenvolvem sob condições de refrigeração. Estes micro-organismos podem resultar em odores indesejáveis e *off-flavor* no leite e seus derivados. Muitas bactérias psicrotróficas podem produzir enzimas termoestáveis que sobrevivem à pasteurização e causando degradação e redução da vida útil de leite pasteurizado e produtos lácteos (HAYES e BOOR, 2001).

Os coliformes são um grupo de micro-organismos que se originam principalmente do ambiente em que a fêmea está inserida, seja no estábulo ou nos currais de ordenha. Quando se verifica contagens elevadas de coliformes, indicam falta de higiene na ordenha e no ambiente (REINEMANN et al., 2003). A *Escherichia coli* juntamente com *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella* spp. são os principais micro-organismos pertencentes ao grupo coliforme, pertencem à família das Enterobacteriaceas, indicando condições higiênico-sanitárias insatisfatórias e existem cepas que são patogênicas ao homem (VANETTI, 2003).

#### **2.1.1. Mesófilos aeróbios**

Os mesófilos aeróbios incluem um grupo de micro-organismos capazes de se multiplicarem em uma faixa de temperatura que varia entre 20 e 45°C, tendo uma temperatura ótima de crescimento a 32°C. Esse grupo inclui a maioria dos contaminantes do leite, tanto deteriorantes como patogênicos. É considerado um bom indicador de qualidade microbiológica (COSTA, 2006). A contagem e a determinação de mesófilos aeróbios são de grande importância, sendo sua detecção e enumeração empregadas tanto para o controle de qualidade do leite como para avaliação da eficiência das práticas de sanitização dos equipamentos e utensílios durante a produção e beneficiamento do produto (VALLIN et al., 2009; FAGAN et al., 2008). A contagem padrão em placas (CPP), que determina o número de micro-organismos mesófilos aeróbios no leite, é um método de referência empregado em muitos países para avaliar a contaminação bacteriana no leite (GUIMARRÃES, 2008). O limite definido pela IN 62 para a quantificação de mesófilos é de 100.000 UFC/mL. No entanto, muitos países exigem padrões mais rigorosos do que os níveis máximos permitidos pela lei. Apesar da CPP fornecer um dado sobre a quantidade total de bactérias presentes no leite, possui pouco valor para diagnosticar e determinar a fonte de contaminação bacteriana (REINEMANN et al., 2003).

#### **2.1.2. Coliformes**

Coliformes são bacilos Gram negativos não esporulados, aeróbios ou anaeróbios facultativos, oxidase negativos, capazes de crescer na presença de sais biliares e fermentar a lactose à temperatura de 35-37°C, com produção de aldeído, ácido e gás, em um período de 48 horas. O grupo é formado por cerca de vinte espécies originados tanto do trato gastrointestinal de humanos e animais e também por bactérias não entéricas como *Serratia* sp. e *Aeromonas* sp. Dentro deste grupo estão inclusos os coliformes termotolerantes, que possuem a capacidade de fermentar a lactose à temperatura de 44,5°C ou 45,5°C, com produção de aldeídos, ácido e gás. Três gêneros formam o grupo dos coliformes termotolerantes como *Escherichia*, *Enterobacter*, e *Klebsiella*, sendo os dois últimos, de origem não estritamente fecal. A presença deste grupo de micro-organismos no leite evidencia o risco da presença de organismos patogênicos de origem fecal (COSTA, 2006).

Na legislação brasileira não existem limites estabelecidos para enumerar coliformes totais e termotolerantes para o leite cru, porém estes grupos microbianos não fazem parte da microbiota natural do leite, sendo sua presença um indício de contaminação (CORREA; RIBAS; MADRONA, 2009). Os coliformes são micro-organismos difundidos e podem ser detectados em vários tipos de alimentos, mas não indicam, necessariamente, uma contaminação de origem fecal, no sentido de envolver contato direto ou indireto com fezes (MORENO et al., 1999).

Testes para organismos coliformes em leite têm a finalidade de avaliar as condições sanitárias de produção, determinar a presença de infecções do úbere causada por certas espécies deste grupo e também avaliar a eficiência da pasteurização, já que o grupo de micro-organismos coliformes totais e fecais é considerado indicador das condições higiênicas da produção e beneficiamento do leite pasteurizado. A utilização do grupo coliforme como indicador das condições higiênico sanitárias em alimentos, é prática estabelecida há muitos anos. Dos agentes bacterianos, os coliformes são internacionalmente considerados micro-organismos indicadores da segurança microbiológica de alimentos (FRAZIER e WESTHOFF, 1993).

### **3. *ESCHERICHIA COLI***

#### **3.1.1 Características gerais**

Diversas espécies formam o gênero *Escherichia*, porém somente a *E. coli* é considerado patógeno com importância para humanos e para animais. São micro-organismos

Gram-negativos, bastonetes, não-esporulados, anaeróbios facultativos, catalase-positivos e oxidase-negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae (HIRSH; ZEE, 2003).

A *E. coli* participa do grupo dos coliformes termotolerantes com capacidade de fermentar a lactose à 44,5-45,5°C em 24 horas ocorrendo produção de gás. Possui como hábitat natural o trato intestinal de animais de sangue quente, sendo por isso considerada indicadora de contaminação fecal de alimentos (SILVA et al., 2007; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A espécie em questão apresenta antígenos somáticos O, termoestáveis, relacionados com polissacarídeos da membrana externa, antígenos flagelares H, termolábeis, relacionados com proteínas de flagelos, e ainda, antígenos K, termoestáveis, relacionados com polissacarídeos capsulares. Entretanto, nem todas as amostras apresentam os três tipos ao mesmo tempo. O antígeno O identifica o sorogrupo da cepa e a combinação do antígeno O e H identifica o sorotipo (MENG et al., 2001; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Possui a capacidade de exercer um efeito benéfico sobre o organismo, suprimindo a multiplicação de bactérias prejudiciais e sintetizando uma considerável quantidade de vitaminas. Dentre as cepas de *E. coli*, entretanto, há um grupo capaz de provocar doenças em indivíduos humanos, coletivamente chamadas de *E. coli* enteropatogênicas (FDA, 2009).

De acordo com Adams; Moss (2008) as cepas de *E. coli* podem ser classificadas em quatro tipos baseados nas características de virulência: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Mellies; Barron; Carmona (2007) e Meng et al. (2001) categorizam ainda mais dois patotipos: *E. coli* enteroagregativa e *E. coli* de aderência difusa.

### 3.1.2 *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

A EHEC pode ser chamada também de *E. coli* verotoxigênica (VTEC) ou de *E. coli* Shiga Toxigênica (STEC) devido a capacidade de produzir toxinas que são citotóxicas para as células Vero e por ser semelhante à toxina produzida pela *Shigella dysenteriae* (O'BRIEN et al., 1982). Mais de 100 sorogrupos de *E. coli* produzem essas toxinas, porém nem todas as STEC são classificadas como patogênicas. Outros fatores de virulência são importantes para que ocorra a infecção e a doença (NATARO; KAPER, 1998).

Neste universo estão incluídas as cepas de *E. coli* produtoras de verotoxinas, incluindo a *E. coli* O157:H7. Possuem a capacidade de provocar colites enterohemorrágicas que

evoluem para a Síndrome Urêmica Hemolítica (SUH). Os quadros de colites enterohemorrágicas geralmente são auto-limitantes com diarreia aguda e sanguinolenta durante 4 a 10 dias. Os sintomas começam com dores de estômago e diarreia aquosa 1 a 2 dias após a ingestão do alimento contaminado, progredindo para diarreia sanguinolenta com dor abdominal aguda (ADAMS; MOSS, 2008). A febre é baixa ou ausente. Alguns indivíduos exibem apenas diarreia aquosa (FDA, 2009).

A EHEC possui o poder de infectar uma variedade de pessoas, entretanto, crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos apresentam um alto risco de ter os sintomas clínicos da doença e complicações severas (RENTER; SARGEANT, 2002).

Considerado reservatório natural de EHEC, o bovino tem em seus produtos cárneos o principal veículo deste patógeno. Diversos surtos de colite hemorrágica ocorridos nos Estados Unidos, Canadá, Japão, Inglaterra e Alemanha foram associados ao consumo de carne bovina, em especial ao hambúrguer, razão pela qual a síndrome provocada pela EHEC tem a denominação de “doença do hambúrguer” (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

### **3.1.3 *E. coli* O157:H7**

A *E. coli* O157:H7 surgiu como um patógeno de origem alimentar com grande significância em saúde pública nos Estados Unidos (GRIFFIN; TAUXE, 1991). Foi identificado nos EUA, em 1982, como o agente responsável por surtos de colites enterohemorrágicas associado ao consumo de carnes de hambúrgueres malpassadas e contaminadas (RILEY et al., 1983).

É uma bactéria patogênica, cujas doenças transmitidas por alimentos são classificadas no grupo de risco IA de acordo com a Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 2002). A dose infectante é ainda desconhecida. Porém, por meio da compilação de dados de surtos investigados, incluindo a habilidade do microrganismo de ser transmitido de pessoa a pessoa, estima-se que a dose infectante encontre-se na faixa de 10 células por grama ou mililitro do alimento consumido (FDA, 2009).

Apresenta como temperatura ótima de crescimento 37°C, não havendo desenvolvimento em temperaturas abaixo de 8 a 10°C e acima de 44 a 45°C. Este sorogrupo sobrevive ao congelamento, havendo apenas uma diminuição na concentração (FAO/WHO, 2003).

As principais características que distinguem a *E. coli* O157:H7 das demais cepas de *E. coli*, são o crescimento pobre ou nulo à 44,5°C, temperatura normalmente empregada para pesquisa desse microrganismo em alimentos, e a incapacidade de utilizar o sorbitol e produzir a enzima B-glicuronidase (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Em função destas diferenças não são detectadas nas análises de coliformes fecais pelo método do número mais provável (NMP), nem nas análises diretas de *E. coli* utilizando substratos para a enzima B-glicuronidase (SILVA et al., 2007).

Infecções humanas vêm sendo comumente associadas com o consumo de uma variedade de alimentos contaminados, como carnes malpassadas (RILEY et al., 1983), leite cru (MARTIN et al., 1986; GRIFFIN; TAUXE, 1991; NEILL, 1994), leite pasteurizado (UPTON; COIA, 1994), água não potável e com visitas a fazendas abertas ao público (LICENCE et al., 2001).

Estudos epidemiológicos apontam que o gado leiteiro é o reservatório primário desta cepa (LAHTI et al., 2002). A contaminação fecal do leite é uma importante via de transmissão deste patógeno aos humanos (HANCOCK et al., 2001). A presença de *E. coli* O157:H7 nas fezes do gado representa um sério risco à saúde pública devido à possibilidade da transmissão direta para humanos ou da contaminação fecal de alimentos, da água e dos ambientes (ARMSTRONG; HOLLINGSWORTH; GLENN-MORRIS, 1996; ALTEKRUSE; COHEN; SWERDLOW, 1997).

Autores observaram o papel da água potável dos animais na disseminação de cepas de *E. coli* O157:H7 nos rebanhos leiteiros (FAITH et al., 1996; SHERE; BARTLETT; KASPAR, 1998).

É uma bactéria que não possui resistência ao calor, sendo destruída pela pasteurização (D'AOUST et al., 1988). Porém a contaminação por este micro-organismo pós-pasteurização é uma preocupação devido à dose infectante ser baixa e por ser ácido-tolerante. Em contrapartida, é capaz de sobreviver em produtos que são armazenados congelados como o leite cru e a carne moída, além de sobreviver também em frutas e vegetais armazenados sob condições de refrigeração à uma temperatura de 5°C (ABADIAS et al., 2012).

### **3.1.3.1 Mecanismos de patogenicidade da *E. coli* O157:H7**

A relação de patogenicidade da *E. coli* O157:H7 está interligada a três fatores de virulência: produção de enterotoxinas semelhantes à da *Shigella*, produção de hemolisina e

expressão de adesinas específicas com as quais a bactéria coloniza o epitélio intestinal (ARMSTRONG; HOLLINGSWORTH; GLENN-MORRIS, 1996).

São conhecidas as VT-I, VT-II e VT-III. Cada uma é formada por duas subunidades (FRANCO; LANDGRAF, 2008). A produção de VT-II está associada ao desenvolvimento da SUH. Estas toxinas são citotóxicas para as células do cólon e íleo (ARMSTRONG; HOLLINGSWORTH; GLENN-MORRIS, 1996).

O proposto modo de ação em células de mamíferos envolve a seguinte sequência de eventos. A subunidade B da toxina liga-se a receptores glicolipídicos na célula. Após internalização, a subunidade A é enzimaticamente reduzida para um fragmento A1, o qual liga-se então a ribossomos 60S para inibir a síntese proteica e causar a morte celular (O'BRIEN et al., 1982). A EHEC tem também um gene cromossomal denominado *eae*, responsável pelas alterações do citoesqueleto das células epiteliais da mucosa intestinal, com destruição das microvilosidades e acúmulo de actina no local da adesão. Verifica-se a ação nos vasos sanguíneos das microvilosidades com eliminação de sangue nas fezes (FRANCO; LANDGRAF, 2008). A detecção do gene *eae* junto com as VTs em amostras de leite pode ser considerada sugestiva de contaminação por cepa de *E. coli* patogênica (KARNS et al., 2007).

A *E. coli* O157:H7 coloniza difusamente o ceco, superfícies do cólon e o epitélio das criptas. As microvilosidades são destruídas e as células epiteliais são irregularmente formadas ou destacadas no local de fixação bacteriana. Alguns estudos revelam a penetração de bactérias dentro de células epiteliais. Porém, a intensiva invasão e multiplicação intracelular, como ocorre nos casos de infecção por *Shigella*, não é observada (DOYLE, 1991).

A patogenia da SUH também está associada com estas toxinas que provocam danos às células endoteliais. Deste modo iniciam um mecanismo de coagulação resultando na formação de microtrombos, os quais poderão obstruir completa ou parcialmente alguns capilares dos rins e de outros órgãos, acarretando em um acúmulo de resíduos no sangue. Estes coágulos podem também obstruir pequenos capilares no cérebro, podendo levar à óbito o paciente (BYRNES; MOAKE, 1986).

### **3.1.3.2 Surtos e infecções provocados por *E. coli* O157:H7**

O leite cru foi reconhecido como um veículo de transmissão da *E. coli* O157:H7, em 1986, quando crianças de famílias do Estado de Wisconsin nos EUA apresentaram quadros de colites enterohemorrágicas e de SUH depois de consumirem leite cru de fazendas leiteiras

(MARTIN et al., 1986). Outro surto relacionado ao consumo de leite cru contaminado por *E. coli* O157:H7 foi relatado em 1993 no Estado de Oregon – EUA. Quatorze indivíduos adoeceram em menos de 1 mês após consumirem leite cru de uma determinada fazenda (KEENE et al., 1997). Em maio de 1993, ocorreram seis casos de infecção humana por *E. coli* O157:H7 na cidade de Sheffield, Inglaterra e o leite não-pasteurizado foi identificado como a origem da infecção (MECHIE; CHAPMAN; SIDDON, 1997). Ainda na Inglaterra, o consumo de iogurte de uma marca em particular foi a causa de um surto de *E. coli* O157:H7 em 16 pessoas, tendo como provável causa, uma contaminação pós-pasteurização do leite, uma vez que não foi isolado o agente no leite cru e a pasteurização elimina completamente o agente (MORGAN et al., 1993).

Surto de DTA pelo consumo de requeijão produzido a partir de leite cru contaminado com *E. coli* O157:H7 também foi relatado no Estado de Wisconsin, EUA, em junho de 1998. Neste caso, 55 pessoas foram identificadas, laboratorialmente, como portadoras da *E. coli* O157:H7, sendo 25 hospitalizadas. Os sintomas incluíram diarreia sanguinolenta, câibra, fadiga e náusea. Além disso, a duração média da diarreia foi de cinco dias (CDC, 2000).

Na Califórnia, em 2006, seis casos de contaminação por *E. coli* O157:H7 foram identificados, cinco relacionados à ingestão de leite cru e um de colostro cru sabor chocolate, ambos da mesma marca. A idade dos pacientes envolvidos variou entre 6 e 18 anos. E dois pacientes foram hospitalizados com sintomas de SUH. A venda de leite e derivados crus é permitida na Califórnia (CDC, 2008).

Em 2006, nos Estados de Utah e do Novo México nos EUA, houve um surto provocado pela ingestão de espinafre contaminado por *E. coli* O157:H7. Duzentos e cinco pessoas adoeceram e 29% desenvolveram a SUH (GRANT et al., 2008).

Em 2010, 38 pessoas foram infectadas com a cepa de *E. coli* O157:H7 em cinco estados dos EUA a partir do consumo de Queijo Gouda (CDC, 2010).

### **3.1.4 Viabilidade da *E. coli* no leite e derivados lácteos**

A exposição de bactérias a fatores de estresses gerados por mudanças na disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura, salinidade e iluminação solar, determina a persistência do microrganismo no ambiente causada pela capacidade de suportar e se adaptar às novas condições. Dependendo do tipo de estresse e da intensidade sofrida, os microrganismos apresentam diferentes respostas adaptativas. Alguns produzem esporos e

outros podem entrar em um estado fisiológico chamado de viável não-cultivável (VNC) (FLORESTA, 2006). O estado VNC é definido como o estado fisiológico onde os microrganismos não são capazes de crescer em meios utilizados pelos métodos tradicionais disponíveis. Porém apresentam características de células vivas, como atividade respiratória, manutenção do potencial de membrana e atividade enzimática. (ROSZAK; COLWELL, 1987).

Este estado é utilizado como uma estratégia de sobrevivência por diversas bactérias como a *Campylobacter* (ROLLINS; COLWELL, 1986), o *Vibrio vulnificus* (OLIVER; NILSSON; KJELLEBERG, 1991), a *Listeria monocytogenes* (BESNARD; FEDERIGHI; CAPPELIER, 2000) e a *E. coli* O157:H7 (MAKINO et al., 2000).

Bactérias que estejam no estado VNC podem recuperar a culturabilidade sem que seja verificado o aumento do número total de células. Este fenômeno é chamado de ressuscitação. Dependendo do caso, somente a retirada do agente causador do estresse é capaz de retornar as células novamente cultiváveis o que pode ser observado na *E. coli* O157:H7 (NAKAGAWA et al., 2000).

Ainda faltam dados sobre a viabilidade da *E. coli* em leite e derivados, principalmente no Brasil. Sendo assim, Pigatto et al. (2009) avaliaram a viabilidade de diferentes cepas de STEC não-O157 em queijo minas frescal produzido com leite artificialmente contaminado. Os produtos finais foram armazenados em refrigeração à 4°C durante 10 dias. Os pesquisadores detectaram cepas viáveis do patógeno em todos os dias de armazenamento dos queijos.

Ansay e Kaspar (1997) inocularam cepas de *E. coli* O157:H7 em amostras de leite cru nas concentrações de  $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$  UFC/mL<sup>-1</sup>. Uma parte das amostras inoculadas foram armazenadas à 4°C e a outra parte à -20°C. As amostras refrigeradas e congeladas foram testadas quanto à presença da bactéria, semanalmente, durante 5 e 10 semanas, respectivamente. O microrganismo foi detectado no leite refrigerado em todas as concentrações depois de 21 dias de refrigeração. Após 28 dias de refrigeração, somente no leite inoculado com  $10^1$  UFC/mL<sup>-1</sup> foi possível fazer a detecção através da metodologia tradicional. Para o leite congelado, a pesquisa da bactéria foi positiva em todas as diluições até 63 dias de armazenamento à -20°C.

#### 4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os métodos moleculares compreendem um conjunto de técnicas e reagentes capazes de interagir quimicamente com as moléculas de DNA ou de RNA do genoma microbiano. Esta característica pode tornar os testes moleculares mais rápidos, sensíveis e específicos que os ensaios microbiológicos ou imunológicos na detecção de diversos patógenos (ROSSETI; SILVA; RODRIGUES, 2006).

Técnicas baseadas em DNA vêm sendo desenvolvidas para a detecção e identificação de microrganismos patogênicos em alimentos (GARCIA et al., 2008; SOEJIMA et al., 2008). A PCR melhorou significativamente a detecção e a identificação de bactérias patogênicas, como por exemplo, a *Listeria monocytogenes* (NOGVA et al., 2000) e a *E. coli* O157:H7 (DEISINGH; THOMPSON, 2004).

A técnica da PCR baseia-se na polimerização de DNA em cadeia realizada *in vitro*. É um método de amplificação, onde são criadas múltiplas cópias de DNA, por replicação enzimática, sem necessitar de um organismo vivo (VERSALOVICK et al., 1994).

A PCR utiliza dois oligonucleotídeos iniciadores que hibridam com cadeias opostas e iniciam a sequência de DNA a amplificar. O processo compreende uma série de ciclos que envolvem desnaturação do DNA molde, ligação dos iniciadores e extensão da cadeia pela DNA polimerase resultando na acumulação de um fragmento de DNA específico cujos terminais são definidos pelo terminal 5' dos iniciadores. Devido à extensão dos iniciadores (*primers*), os produtos sintetizados num dado ciclo serão os moldes do ciclo seguinte. Sendo assim, o número de cópias do DNA alvo quase duplica em cada ciclo (CHAPAVAL et al., 2006).

É uma técnica altamente sensível por meio da qual quantidades pequenas de sequências específicas de DNA ou RNA podem ser amplificadas enzimaticamente. Permite obter milhões de cópias de um segmento específico de DNA pela ação da enzima Taq DNA polimerase e de *primers* sobre um DNA molde. É realizada em um equipamento chamado termociclador que possibilita mudanças de temperaturas por determinados períodos de tempo permitindo a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese do DNA (KONEMAN et al., 2001).

A principal desvantagem da PCR é que esta técnica não é capaz de discriminar as células viáveis das células mortas (MALORNY et al., 2003; SOEJIMA et al., 2008) impedindo a análise do potencial de risco à saúde por parte dos microrganismos

(CAWTHORN; WITTHUHN, 2008). O DNA pode permanecer íntegro por até 3 semanas. Sendo assim, os diagnósticos que se baseiam na quantificação molecular do material genético possuem a tendência de estimar valores superiores de células vivas do que existe na amostra (JUSTÉ; THOMMA; LIEVENS, 2008).

A falta de aprovação, padronização e regulamentação pelos órgãos oficiais e a necessidade de um investimento alto em reagentes e equipamentos também são entraves na sua implantação na rotina laboratorial (MALORNY et al., 2003).

A detecção direta de bactérias patogênicas em amostras de alimentos por meio da PCR é uma tarefa prejudicada pela presença de substâncias inibidoras da PCR frequentemente associadas à matriz do alimento e à presença de elevado número de bactérias indígenas (ROSSEN et al., 1992; WILSON, 1997).

A PCR tem sido amplamente aceita como método de escolha para uma rápida e confiável detecção de microrganismos nos alimentos. Esta técnica pode ser muito útil para culturas microbianas puras. Entretanto, quando aplicado diretamente a amostras de alimentos, a sua eficiência pode ser reduzida. O ponto crucial deste problema está no método de preparação da amostra que pode introduzir substâncias inibidoras impossibilitando a PCR (LAMPEL; ORLANDI; KORNEGAY, 2000).

Além disso, a maioria dos protocolos utilizados necessitam de uma etapa de enriquecimento seletivo para recuperar o potencial de multiplicação da bactéria em amostras de alimentos. Esta etapa, que é realizada antes da extração do DNA da bactéria, possui uma duração que varia de 48 a 72 horas (ASLAM; HOGAN; SMITH, 2003).

É uma técnica que tem sido aplicada na indústria de laticínios, principalmente para fazer a detecção de contaminações microbiológicas. Existe a possibilidade de extrair o DNA do leite e de produtos lácteos processados e utilizá-lo como substrato para a amplificação por PCR do DNA da caseína (VELOSO et al., 2002). Porém, a gordura do leite e outras substâncias presentes no leite podem dificultar a obtenção de um homogeneizado consistente e a extração adequada do DNA das células-alvo bacterianas (RAMESH et al., 2002). As proteinases presentes no leite também são inibidores potenciais da PCR (POWELL et al., 1994).

A PCR vem se tornando uma técnica muito importante para a detecção de *E. coli* O157:H7. A principal razão para este fato é que esta técnica tem a capacidade de amplificar o

DNA de uma célula bacteriana única em um tempo próximo de 1 hora, sendo muito mais rápida do que as técnicas tradicionais (DEISINGH; THOMPSON, 2004). Além disso, é uma técnica que apresenta alta sensibilidade para detectar a *E. coli* O157:H7 (YAMAGUCHI et al., 2003). A PCR é aplicável para a detecção de STEC, incluindo a *E. coli* O157:H7, em amostras ambientais e de leite (FODE-VAUGHAN et al., 2003).

Dentre as inúmeras técnicas de PCR disponíveis, a PCR em tempo real é provavelmente a técnica mais promissora. É uma técnica quantitativa que monitora a reação de amplificação em tempo real (HOLLAND; ABRAMSON; GELFAND, 1991).

Essa técnica proposta pode ser convenientemente aplicada para o controle de leite e derivados uma vez que estes alimentos estão frequentemente associados com doenças transmitidas por alimentos pela contaminação por *E. coli*. É capaz de oferecer como resultado informações completas sobre o potencial de distribuição de grupos patogênicos em alimentos (BOTTERO et al., 2004).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADIAS, M.; ALEGRE, I.; OLIVEIRA, M.; ALTISENT, R.; VIÑAS, I. Growth potential of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut fruits (melon and pineapple) and vegetables (carrots and escarole) stored under different conditions. *Food Control*. v.27, p.37-44, 2012.
- ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. *Food Microbiology*. 3 ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2008. 490 p.
- ALMEIDA, A. O. de. **Controle rápido da eficiência e segurança do processo de pasteurização do leite (HTST- High Temperature Short Time)**. Jaboticabal, 2006. 113 f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- ALTEKRUSE, S.F.; COHEN, M.L.; SWERDLOW, D.L. Emerging foodborne diseases. *Emerging Infectious Diseases*. v.3, p.285-293, 1997.
- AMARAL, L. A. et al. Ocorrência de *Staphylococcus* sp. em água utilizada em propriedades leiteiras do Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.55; n.5; p. 620-623, 2003.
- ANSAY, S.E.; KASPAR, C.W. Survey of retail cheeses, dairy processing environments and raw milk for *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*. v.25, p.131-134, 1997.
- ARCURI, E.F. et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.58; n.3; p. 440-446, 2006.
- ARMSTRONG, G.L.; HOLLINGSWORTH, J.; GLENN-MORRIS, J. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiologic Reviews*. v.18, n.1, p.29-51, 1996.
- ASLAM, M.; HOGAN, J.; SMITH, K.L. Development of a PCR-based assay to detect Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in milk. *Food Microbiology*. v.20, p.345-350, 2003.
- BECKER, T. A.; NEGRELO, I. F.; RACOLTE, F.; DRUNKLER, D. L. Avaliação da qualidade sanitária de leite integral informal, pasteurizado, UHT e em pó comercializados na cidade de Medianeira e Serranópolis do Iguaçu – Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 707- 716, 2010.
- BERSOT, L. S.; GALVÃO, J. A.; RAYMUNDO, N.K. L.; BARCELLOS, V. C.; PINTO, J. P. A. N.; MAZIERO, M. T. Avaliação microbiológica e físico-química de leites UHT produzidos no Estado do Paraná – Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 645-652, 2010.

- BESNARD, V.; FEDERIGHI, M.E.; CAPPELIER, J.M. Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*. v.31, n.1, p.77-81, 2000.
- BISHOP, J. R.; WHITE, C. H. Estimation of potencial shelflife of pasteurized fluid milk utilizing bacterial numbers and metabolites. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 48, p. 663-667, Aug. 1998.
- BOTTERO, M.T.; DALMASSO, A.; SOGLIA, D.; ROSATI, S.; DECASTELLI, L.; CIVERA, T. Development of a multiplex PCR assay for the identification of pathogenic genes of *Escherichia coli* in milk and milk products. *Molecular and cellular probes*. v.18, p.283-288, 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.62 de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção Identidade e Qualidade de Leite Tipo A Tipo B, Tipo C e Cru refrigerado. **Diário Oficial da União**, Brasília, 29 dez. 2011.
- BYRNES, J.J.; MOAKE, J.L. Thrombotic thrombocytopenic purpura and the haemolytic-uraemic syndrome: evolving concepts of pathogenesis and therapy. *Clinical Haematology*. v.15, n.2, p.413-442, 1986.
- CAWTHORN, D.M.; WITTHUHN, R.C. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. *Journal of Applied Microbiology*. v.105, n.4, p.1178-1185, 2008.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. *Escherichia coli* O157:H7 Infections in Children Associated with Raw Milk and Raw Colostrum From Cows - California, 2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. v.57, n.23, p.625-628, 2008. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5723a2.htm>>. Acesso em: 23 nov. 2017.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. Investigation Update: Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Associated with Cheese. 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ecoli/2010/cheese0157/index.html>> Acesso em: 23 nov. 2017.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheeses curds – Wisconsin, June 1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. v.49, n.40, p.911-913, 2000.
- CHAMBERS, J. V. **The microbiology of raw milk**. In: ROBINSON, R. K. (Ed.). Dairy Microbiology Handbook. New York: Wiley-Interscience, 2002. p. 39-90.
- CHAPAVAL, L.; MOON, D. H.; GOMES, J. E.; DUARTE, F. R.; TSAI, S. M. Aplicação da técnica de Rep-PCR no rastreamento de *Staphylococcus aureus* em sala de ordenha para o monitoramento da qualidade do leite. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v.43, n.3, p.309-320, 2006.

CORREA, C. P.A.; RIBAS M. M. F.; MADRONA G. S. Avaliação das condições higiênicas sanitárias do leite cru em pequenas propriedades do município de Bom Sucesso- PR. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. v. 03, n 02, p. 21-28, 2009.

COSTA, F. F. da. **Interferência das práticas de manejo na qualidade microbiológica do leite produzido em propriedades rurais familiares**. Jaboticabal, 2006. 80 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

CRAVEN, H. M.; MACAULEY, B. J. **Microorganisms in pasteurized milk after refrigerated storage. III. Effects of milk processor**. Journal of Dairy Technology. Australian, v. 47, n. 1, p. 50-55, Jan. 1993.

D'AOUST, J.Y.; PARK, C.E.; SZABO, R.A.; TODD, E.C.D.; EMMONS, D.B.; MCKELLAR, R.C. Thermal inactivation of *Campylobacter* species, *Yersinia enterocolitica* and hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in fluid milk. *Journal of Dairy Science*. v.71, p.3230-3236, 1988.

DEISINGH, A.K.; THOMPSON, M. Strategies for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *Journal of Applied Microbiology*. v.96, p.419-429, 2004.

DEISINGH, A.K.; THOMPSON, M. Strategies for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *Journal of Applied Microbiology*. v.96, p.419-429, 2004.

FAGAN, E. P. et al. Avaliação de padrões físico- químicos e microbiológicos do leite em diferentes fases de lactação nas estações do no em granjas leiteiras no Estado do Paraná. **Ciências Agrárias**. v. 29; n.3; p. 651-660, 2008.

FAGAN, E. P. **Fatores Ambientais e de manejo sobre a composição química, microbiológica e toxicológica do leite produzido em duas granjas produtoras de leite tipo “A” no Estado do Paraná**. Maringá, 2006. 117 f. Tese (Doutorado em Zootecnia)- Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá.

FAITH, N.G.; SHERE, R.; BROSCHE, K.W.; ARNOLD, S.E.; ANSAY, J.B.; KASPAR, W. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*. v.62, p.1519-1525, 1996.

FAO /WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION. Risk profile for enterohaemorrhagic *Escherichia coli* including the identification of the commodities of concern, including sprouts, ground beef and porks. In: *JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME /CODEX COMMITTEE ON FOOD HYGIENE*, 35, 2003, Orlando. *Circular...* Orlando: Codex Alimentarius commission, 2003. Disponível em: <[www.codexalimentarius.net/download/report/117/A10313ae.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/report/117/A10313ae.pdf)>. Acesso em: 19 nov. 2017.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Escherichia coli* O157:H7. In: \_\_\_\_\_. *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook*. 2009. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm071284.htm>>. Acesso em: 13 nov. 2017.

FLORESTA, F.A. *Condições para indução do estado viável não cultivável (VNC) em Salmonella e Escherichia coli*. Viçosa, 2006. 55p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2006.

FODE-VAUGHAN, K.A.; MAKI, J.S.; BENSON, J.A.; COLLINS, M.L.P. Direct PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*. v.37, p.239-243, 2003.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo, 2000. 175p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo:Atheneu, 2008. 182p.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. **Microbiologia de los alimentos**. 4.ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 677p.

GARCIA, C.A.; SILVA, N.R.; LUQUETTI, B.C.; MARTINS, I.P.; SILVA, R.T.; VIEIRA, R.C. Influência do ozônio sobre a microbiota do leite “in natura”. **Higiene Alimentar**, v.11, n.70, p.36-50, 2000.

GARCIA, P.M.; ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; LANGE, C.C.; BRITO, J.R.F.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Detecção de *Escherichia coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru por método convencional e PCR multiplex. *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia*. v.60, n.5, p.1241-1249, 2008.

GRANT, JULIANA; WENDELBOE, A.M.; WENDEL, A.; JEPSON, B.; TORRES, P.; SMELSER, C.; ROLFS, R.T. Spinach-associated *Escherichia coli* O157:H7 outbreak, Utah and New Mexico, 2006. *Emerging Infectious Diseases*. v.14, n.10, p.1633-1637, 2008.

GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiology Review*. v.13, p.60-98, 1991.

GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiology Review*. v.13, p.60-98, 1991.

GUERREIRO, P. K. et al. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciências agrotécnicas**. v.29, n.1, p. 216-222, 2005.

HANCOCK, D.; BESSER, T.; LEJEUNE, J.; DAVIS, M.; RICE, D. The control of VTEC in the animal reservoir. *International Journal of Food Microbiology*. v.66, n.1-2, p.71-78, 2001.

HAYES, M.C.; BOOR, K. **Raw milk and fluid milk products**. In: MARTH, E. H.; STEELE, J.L. Eds.. Applied dairy microbiology, 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2001. p.59-76.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. *Microbiologia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 446p.

HOLLAND, P.M.R.D.; ABRAMSON, R.W.; GELFAND, D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 59339 exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 88, p.7276–7280, 1991.

ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in foods. Microbiological Testing in food safety management. Kluwer Academic, New York. 2002.

JAYARAO, B.M.; PILLAI, S.R.; SAWANT, A.A. **Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts**. Journal of Dairy Science, v.87, n.10, 2004.

JUSTÉ, A.; THOMMA, B.P.H.J.; LIEVENS, B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology*. v.25, n.6 ,p.745-761, 2008.

KARNS, J.S.; VAN KESSEL, J.S.; MCCLUSKY, B.J.; PERDUE, M.L. Incidence of *Escherichia coli* O157:H7 and *E. coli* virulence factors in US bulk tank milk as determined by polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science*. v.90, n.7, p.3212-3219, 2007.

KEENE, W.E.; HEDBERG, K.; HERRIOTT, D.E.; HANCOCK, D.D.; MCKAY, R.W.; BARRETT, T.J.; FLEMING, D.W. A prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections caused by distributed raw milk. *The Journal of Infectious Diseases*. v.176, p.815-818, 1997.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C. *Diagnóstico Microbiológico*. Medsi Editora Médica e Científica Ltda., 2001. 1466p.

LAHTI, E.; EKLUND, M.; RUUTU, P.; SIITONEN, A.; RANTALA, L.; NUORTI, P.; HONKANEN-BUZALSKI. Use of phenotyping and genotyping to verify transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy farms. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. v.21, p.189-195, 2002.

LAMPEL, A.K.; ORLANDI, P.A.; KORNEGAY, L. Improved template preparation for PCR-based assays for detection of food-borne bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. v.66, n.10, p.4539-4542, 2000.

LANGE, C.C.; BRITO, J.R.F. **Influência da qualidade do leite na manufatura e vida de prateleira dos produtos lácteos: papel das altas contagens microbianas**. In: BRITO,

J.R.F.; PORTUGAL, J.A.B. (Ed.). Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos. Juiz de Fora: EMBRAPACNPGL, 2000. p.119-137.

LICENCE, K.; OATES, K.R.; SYNGE, B.A.; REID, T.M.S. An outbreak of *E. coli* O157:H7 infection with evidence of spread from animals to man through contamination of a private water supply. *Epidemiology Infection*. v.126, p.135-138, 2001.

LOPES JÚNIOR, J. F. F. **Características de propriedades leiteiras no Noroeste do Estado do Paraná influenciando nos indicadores de qualidade do leite**. Maringá, 2010. 79 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá.

MAKINO, S.; KII, T.; ASAKURA, H.; SHIRAHATA, T.; IKEDA, T.; TAKESHI, K.; ITOH, K. Does enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 enter the viable but nonculturable state in salted salmon roe? *Applied and Environmental Microbiology*. v.66, n.12, p.5536-5539, 2000.

MALORNY, B; PANAYOTIS, T.T.; RADSTRÖM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. v.83, n.1, p.39-48, 2003.

MARTIN, M.L.; SHIPMAN, L.D.; WELLS, J.G.; POTTER, M.E.; HEDBERG, K.; WACHSMUTH, K.; TAUXE, R.V.; DAVIS, J.P.; ARNOLDI, J.; TILLELI, J. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy cattle associated with two cases of haemolytic uremic syndrome. *Lancet*. v.2, p.1043, 1986.

MECHIE, S.C.; CHAPMAN, P.A.; SIDDONS, C. A. A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. *Epidemiology and Infection*. v.188, p.17-25, 1997.

MELLIES, J.L.; BARRON, A.M.S.; CARMONA, A.M. **Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation**. *Infection and Immunity*. v.75, n.9 p.4199-4210, 2007.

MENG, J.; DOYLE, M.P.; ZHAO, T.; ZHAO, S. **Enterohemorrhagic *Escherichia coli***. In: *Food microbiology: fundamental and frontiers*. 2. ed. Washington: ASM, 2001, p.141-77.

MORAES, C. da. R. **Qualidade bacteriológica de leite bovino de mistura, in natura e beneficiado, e detecção sorológica de brucelose em rebanhos da região metropolitana de Porto Alegre- RS**. Porto Alegre, 2005. 86f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MORENO, I., VIALTA, A., LERAYER, A.L.S., SALVA, T.J.G., VAN DENDER, A.G. F., WOLF, B., MACHADO, R.C. **Qualidade Microbiológica de Leites Pasteurizados produzidos no Estado de São Paulo**. Indústria de Laticínios, n. 20, p. 56-61, 1999.

MORGAN, D; NEWMAN, C.P.; HUTCHINSON, D.N.; WALTER, A.M.; ROWE, B.; MAJID, F. Vertoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated to consumption of yogurt. *Epidemiology and Infection*. v.11, p.181-187, 1993.

- NAKAGAWA, H.; HARA-KODO, Y.; KOJIMA, T.; IKEDO, M.; KODAKA, H.; KONUMA, H.; KUMAGAI, S. Detection of freeze-injured *Escherichia coli* O157:H7 cells from foods by resuscitation prior to selective enrichment. *Internacional Journal of Food Microbiology*. v.60, p.107-110, 2000.
- NATARO, J.P.; KAPER, J.B. **Diarrheogenic *Escherichia coli***. *Clinical Microbiology Reviews*. v.11, p.142-201, 1998
- NEILL, M.A. *E. coli* O157:H7 time capsule: what do we know and when did we know? *Dairy, Food and Environmental Sanitation*. v.14, p.374-377, 1994.
- NOGVA, H.K.; RUDI, K.; NATERSTAD, K.; HOLCK, A.; LILLEHAUG, D. Application of 5'-Nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk and unpasteurized whole milk. *Applied and Environmental Microbiology*. v.66, n.10, p.4266-4271, 2000.
- O'BRIEN, A.D.; LAVECK, G.D.; THOMPSON, M.R.; FORMAL, S.B. **Producing of *Shigella dysenteriae* type-1 like cytotoxin by *Escherichia coli***. *Journal of Infectious Diseases*. v.146, p.763-769, 1982.
- OLIVER, J.D.; NILSSON, L.; KJELLEBERG, S. Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. *Applied and Environmental Microbiology*. v.57, n.9, p.2640-2644, 1991.
- PIGATTO, C.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; FADEL-PICHETCH, C.M.T.; CHIODA, T.M.; VITTORI, J.; MARIN, J.M. Viabilidade de *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC) não-O157 em queijo tipo minas frescal. *Ciência Animal Brasileira*. v.10, n.2, p.663-668, 2009.
- RAMESH, A.; PADMAPRIYA, B.P.; CHANDRASHEKAR, A.; VARADARAJ, M.C. Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. *Molecular and Cellular Probes*. v.16, N.4, p.307-314, 2002.
- REINEMANN, D.J.; WOLTERS, G.M.V.H.; BILLON, P.; LIND, O.; RASMUSSEN, M.D. **Review of practices for cleaning and sanitation of milking machines**. *Bulletin of the International Dairy Federation*. No.381, p.4-18; 2003.
- RENTER, D.G.; SARGEANT, J.M. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: epidemiology and ecology in bovine production environments. *Animal Health Research Reviews*. v.3, n.2, p.83-94, 2002.
- RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGERSON, S.D.; MCGEE, H.B.; WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; HEBERT, R.J.; OKOTT, E.S.; JOHNSON, L.M.; HARGRETT, N.T.; BLAKE, P.A.; COHEN, M.L. Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare *Escherichia coli* Serotype. *The New England Journal of Medicine*. v.308, p.681-685, 1983.

- ROLLINS, M.D.; COLWELL, R.R. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Applied and Environmental Microbiology*. v.52, n.3, p.531-538, 1986.
- ROSSEN, L.; NORSKOV, P.; HOLMSTROM, K.; RASMUSSEN, O.F. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*. v.17, n.1, p.37-45, 1992.
- ROSSETI, M.L.; SILVA, C.M.D.; RODRIGUES, J.J.S. Doenças infecciosas: Diagnóstico Molecular. 1.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2006.
- ROSZAK, D.B.; COLWELL, R.R. Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Applied and Environmental Microbiology*, v.53, n.12 p. 2889-2983, 1987.
- SANTOS, M. V. Boas Práticas de Produção associadas à higiene de ordenha e qualidade do leite. In: **O Brasil e a nova era do mercado do leite- Compreender para competir**. Piracicaba- SP: Agripoint Ltda, 2007, 1ª edição; v.1; p.135-154.
- SHERE, J.A.; BARTLETT, K.J.; KASPAR, C.W. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wincosin. *Applied and Environmental Microbiology*. v.64, p.1390-1399, 1998.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Varela, 2007. 533p.
- SOEJIMA, T.; IIDA, K.; QIN, T.; TANIAI, H.; SEKI, M.; YOSHIDA, S. Method to detect only live bacteria during PCR amplification. *Journal of Clinical Microbiology*. v.46, n.7, p.2305-2313, 2008.
- UPTON, P.; COIA, J. Outbreak of *Escherichia coli* 0157 infection associated with pasteurised milk supply. *Lancet*. v.344, p.1015, 1994.
- VALLIN, M. V. et al. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios de região central do Paraná. **Ciências Agrárias**. v. 30; n. 1; p. 181-188, 2009.
- VELOSO, A.C.A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; FERREIRA, M.A. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. *Química nova*. v.25, n.4, p.609-615, 2002.
- WILSON, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. v.63, n.10, p.3741-3751, 1997.
- WINCK, C. A. et al. Padrões de qualidade do leite cru no Brasil: Inserção mercadológica internacional ou exclusão social. In: VIII CONGRESSO LATINOAMERICANO DE SOCIOLOGIA RURAL, 2010, Porto de Galinhas, **Anais**. Porto de Galinhas: p. 1-18.

YAMAGUCHI, N.; SASADA, M.; YAMANAKA, M.; NASU, M. Rapid detection of respiring *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice, milk, and ground beef by flow cytometry. *Cytometri*. v.54, n.1, p.27-35, 2003.

YAMAZI, A. K. et al. Práticas de produção aplicadas no controle de contaminação microbiana na produção de leite cru. **Biosciência**. v. 26; n. 4; p. 610- 618, 2010.

## Micro-organismos indicadores e pesquisa de *Escherichia coli* O157:H7 em leite cru estocado sob refrigeração

[Indicator microorganisms and search for *Escherichia coli* O157: H7 in raw milk stored under refrigeration]

A.V.L.Lopes<sup>1</sup>, J.C.Nunes<sup>3</sup>, A. S. Assis<sup>2</sup>, E. S. Mendes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mestrando – PPGMV/UFRPE - Recife

<sup>2</sup>Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE/UAG

<sup>3</sup>Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE CEP 52171-900 Recife, PE

### RESUMO

O armazenamento de alimentos a baixas temperaturas é a forma de conservação mais utilizada na produção e distribuição de alimentos frescos. A prática de estocagem do leite cru refrigerado na fonte de produção foi instituída pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA em 2002, visando reduzir as perdas por ação acidificante de mesófilos. Com a enumeração de micro-organismos contaminantes é possível identificar falhas que possibilitem a proliferação de bactérias com consequente perda da qualidade do produto, podendo ser adotadas ações corretivas de forma a atender os padrões estabelecidos na legislação. Objetivou-se averiguar a qualidade microbiológica do leite cru refrigerado de 12 propriedades localizadas no agreste pernambucano, por meio de contagem bacteriana total (CBT) e quantificação de coliformes totais e termotolerantes, além da pesquisa de cepas de *E. coli* O157:H7 dentre os isolados por biologia molecular. 58,33% das propriedades apresentaram valores de CBT superiores ao estabelecido na legislação, tendo amostras apontando valores máximos de  $1,2 \times 10^8$  UFC/mL. Em relação a contagem de coliformes, os leites de 66,67% das propriedades apresentaram valores acima do que autores recomendam. Não foi confirmada a existência de *E. coli* O157:H7 nos 80 isolados derivados das amostras. Os resultados obtidos são sugestivos de que existem falhas na obtenção e manipulação do leite, podendo ser reduzidos por meio de orientações técnicas levando a melhoria da qualidade microbiológica do leite produzido, tanto qualitativamente como quantitativamente.

Palavras-chave: Coliformes, contaminante, contagem bactérias, higiene.

### ABSTRACT

The storage of food at low temperatures is the most widely used form of preservation in the production and distribution of fresh food. The Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA) instituted the practice of storing raw milk refrigerated at the source of production in 2002, aiming to reduce the losses due to the acidifying action of mesophiles. With the enumeration of contaminating microorganisms, it is possible to identify failures that allow the proliferation of bacteria with consequent loss of product quality, and corrective actions can be adopted in order to meet the standards established in the legislation. The objective of this study was to investigate the microbiological quality of refrigerated raw milk from 12 farms located in the state of Pernambuco by means of total bacterial count (CBT) and quantification of total and thermotolerant coliforms, as well as the search for *E. coli* O157: H7 strains among the isolated by molecular biology. 58.33% of the properties presented higher CBT values than those established in the legislation, with samples showing maximum values of  $1.2 \times 10^8$  CFU / mL. regarding the coliform count, the 66.67% of the properties presented values above the authors' recommendation. The existence of *E. coli* O157: H7 was not confirmed in the 80 isolates derived from the samples. The results obtained suggest that there are failures to obtain and manipulate milk and can be reduced by means of technical guidelines leading to the improvement of the microbiological quality of the milk produced, both qualitatively and quantitatively.

Key words: Coliforms, Contaminant, Counting Bacteria, Hygiene.

## INTRODUÇÃO

O leite e seus derivados estão entre os produtos mais importantes da agropecuária brasileira desempenhando um papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população. Entretanto, um dos principais entraves para a elevação do crescimento no setor leiteiro brasileiro é a precariedade higiênica e sanitária de sua produção com consequente baixa qualidade microbiológica do leite cru que se traduz na limitação para o processamento, rendimento e aceitabilidade dos derivados lácteos (Barros *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2012).

Vários pesquisadores citaram que a produção de leite no país, de maneira ampla, ainda apresenta graves problemas como alta contagem de micro-organismos, demonstrando que há deficiências na higiene durante sua produção. Sabendo-se que a qualidade do produto final está diretamente associada à carga microbiana inicial presente no leite, ficam demonstrados por meio destes resultados a inexistência na maioria das vezes, de um tratamento térmico e falta de higiene durante o processamento ou da temperatura inadequada de estocagem, na qual o leite *in natura* é mantido (Frazier, 1993; Fagundes *et al.*, 2006; Barros *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2012).

Os principais grupos de micro-organismos patogênicos são os mesófilos, que se multiplicam rapidamente quando o leite não é armazenado sob refrigeração e os psicrotóxicos, que se multiplicam em temperaturas baixas. No grupo dos mesófilos se incluem micro-organismos capazes de se multiplicarem numa faixa de temperatura entre 20 e 45 °C, tendo uma temperatura ótima de crescimento a 32 °C e, portanto, encontrando nos ambientes de países de clima tropical, condições ótimas para o seu metabolismo. Os psicrotóxicos são aqueles que se multiplicam bem em temperaturas entre 0°C e 7°C e entre 20°C e 30°C, este grupo é importante, tanto na indústria como no comércio, principalmente para aqueles produtos que necessitam de conservação em temperatura de refrigeração e podem ser armazenados nestas condições por períodos relativamente longos. Quanto aos coliformes, são indicadores de contaminação fecal e do risco da presença de micro-organismos patogênicos, que podem causar toxinfecções no consumo do leite cru (Pinto *et al.*, 2006; Barros *et al.*, 2010; Molineri *et al.*, 2012).

Considerando o alimento seguro, vários países elaboraram e introduziram regulamentações para garantir a segurança do alimento em diferentes estágios na cadeia de produção (Valeeva *et al.*, 2005). Assim, no Brasil, em 2011, entrou em vigor a Instrução Normativa de nº 62 do Ministério da Agricultura e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2011) na qual, dentre vários

fatores a serem adotados para a obtenção de leite de boa qualidade e seguro, implementou-se a coleta do leite a granel e seu resfriamento a 4°C em tanques de resfriamento por expansão, até que esse possa chegar às indústrias. Objetiva-se com essas regulamentações limitar o desenvolvimento da microbiota mesofílica em que se encontra a grande maioria dos micro-organismos patogênicos e deterioradores, sendo essa microbiota usada por muitos pesquisadores para diagnosticar múltiplos problemas, correntes ou em potencial, que possam existir nos rebanhos leiteiros (Sandes, 2016).

Um dos micro-organismos que possui ação direta no aparecimento das doenças transmitidas por alimentos (DTA) é a *E. coli* O157:H7. O bovino leiteiro é o principal reservatório dessa bactéria e o meio de transmissão mais comum é o consumo de alimentos contaminados, como carnes cruas ou mal cozidas e leite cru, práticas comuns em regiões rurais (Barros *et al.*, 2013). A *E. coli* faz parte da microbiota entérica de mamíferos e aves, sendo uma bactéria Gram-negativa pertencente à família Enterobacteriaceae (Brenner, 1984). É isolada com frequência em produtos lácteos, incluindo os armazenados sob refrigeração (Nataro & Kaper, 1998; FDA, 2002).

A análise laboratorial mais utilizada para monitorar a qualidade microbiológica do leite cru é a contagem padrão em placas de micro-organismos mesófilos aeróbios, quantificando-se o número de células viáveis de micro-organismos presentes no leite cru, que o acessam quando há falhas nos processos de produção, ordenha e armazenamento (Nero *et al.*, 2009).

A presença e a multiplicação da microbiota deterioradora pode provocar inúmeras alterações físico-químicas no leite, podendo interferir na sua durabilidade, alterar as características sensoriais e causar perdas de rendimento na produção de seus derivados. Consequentemente, problemas econômicos significativos são gerados para a indústria de laticínios (Barbosa *et al.*, 2009).

As diferentes linhagens de *E. coli* responsáveis principalmente por distúrbios entéricos são agrupadas em seis tipos: enterotoxigênicas, enteroinvasoras, enteropatogênicas, enterohemorrágicas, enteroagregativas e de aderência difusa, subdivididas, fundamentalmente, pela capacidade de produção de determinadas toxinas, de invasão celular ou de manifestação de sintomas clínicos no humano e/ou nos animais (Gyles, 1992; Ribeiro *et al.*, 1999). A *E. coli* enterohemorrágica sorotipo O157:H7 tem emergido como causa de graves manifestações clínicas de colite hemorrágica, trombocitopenia e distúrbios renais no homem, frequentemente fatais em crianças.

Com objetivo de avaliar o efeito da refrigeração

na qualidade microbiana foi realizada contagens de mesófilos e coliformes em amostras de leite cru recém obtidos por meio de ordenhas mecânicas e manuais após 24 horas nos tanques de expansão para comparação dos seus valores e caracterizar genotipicamente *Escherichia coli* O157: H7 por meio de biologia molecular em isolados de leite cru de propriedades da bacia leiteira do agreste pernambucano.

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de leite cru foram coletadas no período de novembro de 2016 a março de 2017 (meses de verão e estiagem na região) em doze propriedades leiteiras na região agreste do estado de Pernambuco, abrangendo os municípios de Garanhuns, Bom Conselho e Águas Belas. Foram realizadas duas coletas por propriedade, uma assim que o leite chega ao tanque de expansão após a primeira ordenha ( $t_i$ ) e outra 24 horas depois ( $t_f$ ), antes do envio da matéria-prima para o beneficiamento nas indústrias. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo baterias de gelo recicláveis e enviadas para análise imediata no Centro de Laboratórios de Garanhuns (CENLAG) da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

No CENLAG, as amostras foram homogeneizadas e em seguida retirou-se uma alíquota de 1 mL de cada amostra de leite cru e preparadas diluições em série de 10 a  $10^{-6}$  em solução salina peptonada a 0,1%.

Posteriormente, foi extraído 1 mL das diluições sequenciais e transferidas para placas de Petri em duplicata, onde verteu-se 25 mL de *Plate Count Agar* (PCA), com suave homogeneização, em forma de “8”. Após a solidificação à temperatura ambiente, as placas foram invertidas e incubadas em estufa, a 35°C, por 48±3 horas segundo o método preconizado na Instrução Normativa nº 62/2003- MAPA (BRASIL, 2003).

A contagem de coliformes totais e termotolerantes foi realizada com inoculação de três diluições adequadas das amostras sob teste em Ágar Cristal Violeta Vermelho Neutro Bile (VRB), plaqueamento em profundidade, incubando as placas a 36 ± 1°C por 24 h. e posterior contagem das colônias características (BRASIL, 2003).

A confirmação de coliformes totais foi realizada por meio da inoculação das colônias características em Caldo Verde Brilhante Bile 2% Lactose e posterior incubação a 36 ± 1°C por 24 h. A presença de gás nos tubos de Durham foi a evidência da fermentação da lactose presente no meio, indicando positividade (BRASIL, 2003).

A confirmação da presença de coliformes termotolerantes foi realizada por meio da inoculação das colônias suspeitas em Caldo EC e posterior incubação em temperatura seletiva a 45±0,2°C, em banho-maria com agitação ou circulação de água. A presença de gás nos tubos de Durham foi a evidência da fermentação da lactose presente no meio, indicando positividade (BRASIL, 2003).

Após a confirmação nos caldos, alçadas foram repassadas para o meio EMB e inoculadas a 36 ± 1°C por 24 h. Colônias típicas e atípicas foram selecionadas e transferidas para meio estoque com o objetivo de futuras análises e caracterização molecular.

Para a comparação das contagens do leite cru e do leite cru refrigerado, aplicou-se o teste de Wilcoxon pareado para paragonar se as medidas de posição de duas amostras são iguais no caso em que as amostras são dependentes

As extrações do DNA bacteriano foram realizadas utilizando o kit comercial PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Calsbad CA- USA, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. O material extraído foi conservado à -20°C até o momento do seu uso. Para identificação da *E. coli* O157:H7 foram utilizados os seguintes primers Stx2Af-5'-CGAGGGCTTGATGTCTATCAG-3' e Stx2Ar-5'-TCAGTATAACGGCCACAGTCC-3' descritos por Park; Lee; Kim (2006). Para as reações da PCR, utilizam-se 2 µL (microlitro) da amostra de DNA extraído, 20 pmol (picomol) dos primers (Síntese biotecnologia), 25 µL do mix de PCR (PCR SuperMix invitrogen<sup>R</sup>) completos com água DEPC, para um volume final de 50 µL.

O processo de amplificação foi realizado em termociclador nas seguintes condições de tempo e temperatura: 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 61°C por 35 segundos e 72°C por 35 segundos e 72°C por 35 segundos, e finalizando por um ciclo de extensão final de 7 minutos a 72°C.

Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose a 1,5% e corados em brometo de etídio. A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada por transiluminação do gel em luz ultravioleta e estes foram fotodocumentados para análise.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Instrução Normativa nº 62 do MAPA (BRASIL, 2011) são estabelecidos limites para a contagem bacteriana total do leite cru refrigerado, com a finalidade de manter um padrão mínimo aceitável na produção leiteira do país.

Esses valores possuem variações de acordo com as regiões, sendo no Norte/Nordeste o limite máximo de  $3,0 \times 10^5$  UFC/mL. Quando amostras de leite da propriedade tem valores superiores ao limite é classificado como produtor de leite de má qualidade microbiológica. Das propriedades analisadas, 58,33% (n=7) apresentaram contagens superiores ao limite estabelecido pela legislação vigente como visto na Tabela 1.

**Tabela 1:** Contagem de mesófilos totais em leite pós-ordenha e leite refrigerado por 24h em amostras de doze propriedades leiteiras do agreste de Pernambuco

Propriedades	Leite cru (UFC/mL)	Leite refrigerado 24h (UFC/mL)
A	$4,4 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$
B	$1,7 \times 10^3$	$9,6 \times 10^4$
C	$1,3 \times 10^3$	$1,6 \times 10^4$
D	$<10^4$	$<10^4$
E	$1,4 \times 10^4$	$4,0 \times 10^5$
F	$2,3 \times 10^4$	$2,5 \times 10^5$
G	$1,8 \times 10^4$	$4,0 \times 10^5$
H	$2,5 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$
I	$1 \times 10^5$	$3,9 \times 10^6$
J	$9,8 \times 10^5$	$2,3 \times 10^7$
L	$6,6 \times 10^6$	$5,9 \times 10^5$
M	$2,3 \times 10^5$	$1,2 \times 10^8$

Quanto a quantificação de coliformes, não existe um limite estabelecido na legislação vigente (IN nº 62), porém autores afirmaram que contagens acima de  $10^3$  UFC/mL de bactérias do grupo coliforme indicam falhas na higiene durante e entre as ordenhas. Das doze propriedades analisadas, oito delas representando 66,67% apresentaram contagens acima do limite relatado na literatura (Tabela 2), o que aponta falhas na higienização e que o resfriamento do leite, de um modo geral não impediu a proliferação, apesar do crescimento do grupo coliformes ser prejudicado pela temperatura e competição com outros grupos bacterianos.

Nenhuma das comparações das contagens de mesófilos totais e coliformes apresentaram diferença significativa ( $P \geq 0,05$ ).

O aumento na contagem de mesófilos após o período de estocagem a frio pode ser explicado por falhas no controle e na manutenção da temperatura do tanque de expansão da fazenda, pois quando o leite é resfriado e mantido a uma temperatura de  $7^\circ\text{C}$ , a proliferação dos mesófilos diminuem devido a inexistência da temperatura ótima de crescimento e a competição com os psicrotóxicos (Bersor et al, 2009).

**Tabela 2.** Contagem total de coliformes em leite pós-ordenha e leite refrigerado por 24h em amostras de doze propriedades leiteiras do agreste de Pernambuco

Propriedades	Leite cru (UFC/mL)	Leite refrigerado 24h (UFC/mL)
A	$<10^4$	$10^1$
B	$<10^4$	$<10^4$
C	$<10^4$	$5,6 \times 10^2$
D	$<10^4$	$<10^4$
E	$2,2 \times 10^5$	$5,7 \times 10^3$
F	$6,5 \times 10^2$	$1,7 \times 10^5$
G	$1,0 \times 10^2$	$1,6 \times 10^5$
H	$6,4 \times 10^3$	$>1,5 \times 10^7$
I	$2,9 \times 10^3$	$>1,5 \times 10^7$
J	$3,8 \times 10^5$	$1,6 \times 10^3$
L	$1,4 \times 10^6$	$>1,5 \times 10^7$
M	$21,1 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$

Silva (2011) detectou uma média de contagens de mesófilos em leites advindo de resfriadores comunitários no agreste pernambucano de  $6,1 \times 10^7$  UFC/mL e após 24 horas a contagem aumentou para  $4,5 \times 10^{10}$  UFC/mL, esse resultado foi explicado por possíveis falhas no motor do refrigerador do tanque de expansão além da prática de adicionar leite recém coletado a todo momento, sendo um dos fatores que dificultam a estabilização da temperatura do leite.

Alves et al. (2009) encontraram contagens de mesófilos na faixa  $10^5$  a  $10^7$  UFC/mL no leite comercializado informalmente na cidade de São Luís-MA onde o produto não era submetido uma refrigeração contínua, e Schedler et al. (2009) relataram contagens média de  $3,9 \times 10^6$  UFC/mL em diferentes propriedades leiteiras do oeste paranaense.

Em estudo feito por Citadin (2012) com leite cru refrigerado do estado de Minas Gerais, foram obtidas grandes variações nas contagens de bactérias mesófilas em amostras coletadas em tanques de refrigeração, com resultados de  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL a  $3,0 \times 10^6$  UFC/mL. Silva et al. (2010) encontraram resultados médios de mesófilos de  $5,2 \times 10^6$  UFC/mL nas amostras dos tanques de expansão, em propriedades rurais do Sudoeste Goiano. Sandes (2016) avaliando amostras de leite *in natura* de 26 fazendas na região do Recôncavo Baiano, encontrou contagens médias que variaram de  $5,0 \times 10^4$  UFC/mL a  $2,5 \times 10^9$  UFC/mL. Ponsano (2011) afirmou que quando a CBT for superior a  $10^5$  UFC/mL indica sérias falhas de higiene na produção e no controle da temperatura de estocagem, enquanto resultados inferiores a  $10^3$  UFC/mL refletem boas práticas de higiene.

Os coliformes são sempre indesejáveis no leite, principalmente pelo fato que o habitat preferencial dessas bactérias é o solo, água e intestino de animais, por isso a presença desse grupo no leite cru em grande quantidade reafirma que as propriedades enfrentavam graves problemas no âmbito de higiene. Estas bactérias diminuem a qualidade e o tempo de prateleira do leite e derivados (Martins, 2008).

A presença de coliformes totais em elevado número indica falhas no processo de manejo e más condições de higiene e possível presença de outras bactérias do gênero coliformes incluindo espécies de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Escherichia coli* e outras. A presença de bactérias patogênicas no leite cru é uma preocupação de saúde pública, sendo um risco potencial para quem o consome diretamente ou na forma de seus derivados, e até para quem o manuseia. O leite cru contaminado pode ser, ainda, fonte de contaminação cruzada para os produtos lácteos processados, pela contaminação do ambiente na indústria (Silva et al., 2001).

Silva (2011) constatou uma contagem média de  $2,5 \times 10^5$  UFC/ML de coliformes totais em leites cru resfriado no agreste pernambucano, semelhantes resultados foram encontrados por Tebaldi et al. (2008) ao avaliarem leite de tanques de expansão de 16 propriedades rurais do município de Boa Esperança – MG foram de  $1,10 \times 10^5$  UFC/mL. Arcuri et al. (2006) avaliaram a qualidade microbiológica do leite obtido mecanicamente e refrigerado durante 48 horas, em 24 rebanhos de fazendas situadas nas regiões Sudeste de Minas Gerais e Norte do Rio de Janeiro e encontraram contagens médias de coliformes superiores a  $10^3$  UFC/mL em sete rebanhos leiteiros, que relatou ser devido ao manejo errôneo nos animais lactantes utilizados na propriedade, tornando o leite ordenhado com uma carga microbiana muito superior ao encontrados por outros autores.

Esses resultados se aproximam bastante aos encontrados no presente trabalho, reforçando que existe falta de higiene nos manejos pré, pós ordenha e nas etapas subsequentes de processamento do produto demonstrando a necessidade de sanitização.

Quanto a identificação molecular das cepas do grupo coliforme, realizadas em 80 isolados não foi encontrado resultado positivo para a expressão gênica da *Escherichia coli*. Esse achado é semelhante ao estudo feito por Machado et al. (2014) onde não foi encontrado *E. coli* em carcaças suínas pós abate que expressassem o gene stx2. Porém foi encontrado uma incidência de 9,19% em 272 isolados quando foi investigado

a expressão gênica eaeA responsável pela expressão de uma proteína da membrana plasmática da bactéria.

A ausência da confirmação por PCR convencional da *E. coli* O157:H7 é sugerida por Garcia et al. (2008) que ao inocularem uma quantidade conhecida do patógeno em leite cru estéril, com baixa CBT e alta CBT. O objetivo era buscar a sensibilidade do teste de PCR e foi detectado que no caso do leite cru com alta contaminação bacteriana, a sensibilidade foi menor para o método de PCR na detecção de *E. coli* O157:H7. Sugerindo que a presença de outros micro-organismos em alta quantidade no leite tenha dificultado o desenvolvimento do micro-organismo alvo devido a competição por nutrientes.

Até os dias atuais, os pesquisadores não detectaram a *E. coli* O157:H7 em amostras de alimentos no Brasil (Silveira et al., 2015). No entanto, esse patógeno já foi detectado em rebanhos nacionais (Cerqueira et al. 1999; Gonzalez et al., 2001).

Sabendo-se da baixa qualidade da grande parte do leite cru produzido no Brasil (Mesquita et al., 2006) e, com base nos resultados obtidos na presente pesquisa, pode-se questionar se a ausência desse patógeno em leite e derivados analisados no país reflete realmente a ausência ou a dificuldade de seu isolamento quando presente em baixo número em alimentos com alta carga microbiana.

A microbiota denominada como normal do leite pode mascarar espécies patogênicas, as quais normalmente estão presentes em baixo número nos alimentos. Em trabalho realizado para determinar a caracterização gênica de *E. coli* O157:H7 em soro de queijo Cheddar fabricado com leite pasteurizado e não-pasteurizado, Marek et al. (2004) verificaram que o patógeno sobreviveu no soro pasteurizado, em diferentes temperaturas de estocagem, por mais tempo ( $P < 0,01$ ) do que em não pasteurizado, sugerindo efeito inibitório das bactérias ácido-láticas presentes no soro não pasteurizado em *E. coli* O157:H7. Esse efeito da microbiota contaminante pode se tornar crítico quando *E. coli* O157:H7 estiver presente em baixo número nos alimentos. Diante dessa constatação, analisando-se a importância da qualidade do leite para a manutenção e ampliação dos mercados conquistados e a geração de renda para os produtores, torna-se necessário a realização de educação permanente direcionados aos manipuladores responsáveis pela ordenha com ênfase em higiene pessoal, PPHO e manejo adequado dos animais. Além da realização de

palestras com os produtores rurais, com vistas a prestar esclarecimentos sobre a necessidade e a importância da adequação às exigências da legislação para a melhoria da qualidade do leite produzido e do investimento financeiro com relação a aquisição de ordenhadeiras mecânicas, resfriadores e a realização de algumas modificações em instalações quando necessário com ajudas de cooperativas ou das próprias indústrias receptoras.

### CONCLUSÃO

De acordo com os limites estabelecidos na legislação vigente, a maioria das amostras apresentam baixa qualidade microbiana, o que pode acarretar prejuízos econômicos aos produtores. Conclui-se que o leite produzido nas propriedades de três municípios que compõem a bacia leiteira do estado de Pernambuco apresenta baixa qualidade microbiológica, o que pode resultar em prejuízo aos produtores.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, F. S. F. Leite de cabra e derivados: as barreiras sanitárias. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v.8, n.3, p. 292 – 299, jul – set, 2009.
- ARCURI, E.F. et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.58; n.3; p. 440-446, 2006.
- BARBOSA, J.B. et al. Avaliação de rendimento da produção dos queijos minas frescal, minas padrão e mussarela fabricados com leite inoculado com *Pseudomonas fluorescens*. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora*, v.64, n.371, p.26-33, 2009.
- BARROS, L. S. S.; DE SOUZA, F.C.; SOGLIA, S.L.O.; FERREIRA, M.J.; RODRIGUES, M.J.; MONTEIRO DE CARVALHO, C.F.M. Qualidade do leite informal comercializado no Recôncavo da Bahia. *Higiene Alimentar*, v.24, p.110-115, 2010.
- BARROS, L.S.S.; SILVA,R.M.; SILVA, I.M.; BALIZA, M.D.; VIRGÍLIO, F.F. *Escherichia coli* from cellulitis lesions in broilers. *Journal of Food Measurement and Characterization*, v. 7, p. 40-45, 2013.
- BARROS, L.S.S.; SOGLIA, S.L.O.; FERREIRA, M.J.; RODRIGUES, M.J.; BRANCO, M.P.C. Aerobic and anaerobic bacteria and *Candida* species in crude milk. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, v.3, p.206-212, 2011.
- BERSOR. LS, BARCELOS VC, FUJISAWA FM, PEREIRA JG, MAZIEIRO MT. Influência do sistema de estocagem na propriedade rural sobre a qualidade microbiológica do leite *in natura*. *Rev Inst Lat Cândido Tostes* 2009;64(367):35-9.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.62 de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção Identidade e Qualidade de Leite Tipo A Tipo B, Tipo C e Cru refrigerado. *Diário Oficial da União, Brasília*, 29 dez. 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial da União, Brasília*, 18 de set. 2003
- BRENER, D.J. Facultatively anaerobic Gram-negative rods. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Willians & Wilkins, 1984. 763p.
- CERQUEIRA, A.M.; GUTH, B.E.; JOAQUIM,R.M. et al. High occurrence of Shiga toxinproducing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. *Vet. Microbiol.*, v.70, p.111-121, 1999.
- CITADIN, Â.S.; POZZA, M.S.S.; POZZA, P.C.; NUNES, R.V.; BORSATTI, L.; MANGONI, J. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e fatores associados. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, v.10, Nº1, p.52-59, jan./mar, 2012.
- FAGUNDES, C.M.; FISCHER, V.; SILVA, W.P.; CARBONERA, N.; ARAÚJO, M.R. Presença de *Pseudomonas* spp. em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. *Ciência Rural*, v.36, n.2, p.568-572, 2006.
- FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. *Microbiologia de los alimentos*. 4.ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 677p.
- GARCIA, P.M.; ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; LANGE, C.C.; BRITO, J.R.F; CERQUEIRA, M.M.O.P. Detecção de *Escherichia coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru por método convencional e PCR multiplex. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, V.60, n.5, p.1241-1249, 2008.
- GONZALEZ, A.G.M.; COUTINHO, C.A.S.; CERQUEIRA, A.M.F. et al. Virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7 and non-O157 isolated from healthy

cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. In: ANAIS DO CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21, 2001, Foz do Iguaçu. *Anais...* Foz do Iguaçu: SBM, 2001. p.104.

MACHADO, L.A.P.; LUCCA, F.; ALVES, J.; POZZOBON, A.; BUSTAMANTE-FILHO, I.C. Prevalência e genotipagem de *Escherichia coli* patogênica em carcaças de suínos abatidos em frigoríficos comerciais na região sul do Brasil. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. V.8, n.1, p.128-145,2014.

MARTINS, M. E. P.; NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J.; NEVES, R. B. S.; ARRUDA, M. T. Qualidade de leite cru produzido e armazenado em tanques de expansão no estado de Goiás. *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, n. 4, p. 1152-1158, out./dez. 2008.

MESQUITA, A.J.; DURR, J.W.; COELHO, K.O. *Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil*. Goiânia: Talento, 2006. 352p.

MOLINERI, A.I.; SIGNORINI, M.L.; CUATRÍN, A.L.; CANAVESIO, V.R.; NEDER, V.E.; RUSSI, N.B.; BONAZZA, J.C.; CALVINHO, L.F. Association between milking practices and psychrotrophic bacterial counts in bulk tank milk. *Revista Argentina de Microbiologia*, v. 44, p. 187-194, 2012.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NERO, A; VIÇOSA, G.N.; PEREIRA, F.E.V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 29(2): 386-390, abr.-jun. 2009.

OLIVEIRA, L.P.; BARROS, L.S.S.; SILVA, V.C. Avaliação físico-química de leite cru e pasteurizado consumido no Recôncavo da Bahia. *Enciclopédia Biosfera*, v.8, p.335-343, 2012.

PARK, Y.S.; LEE, S.R.; KIM, Y.G. Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Kimchi by Multiplex Polymerase Chain Reaction (mPCR). *The Journal of Microbiology*, v.44, n.1, p.92-97, 2006.

PINTO, C.L.O; MARTINS, M.L.; VANETT, M.C.D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, v.26, n.3, p.645-651, 2006.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; DELBEM, A. C. B.; LARA, J. A. F.; et. al. Avaliação da

qualidade de amostras de leite cru comercializado no município de Araçatuba e potenciais de riscos decorrentes de seu consumo. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 15, n. 36, p. 31-38, 2011.

SANDES, A.B.; BARROS, L.S.S.; SILVA, M.H.; SANTOS, E.S.V. Contagem de microrganismos indicadores em leite cru obtidos por ordenha não mecanizada e mecanizada de propriedades do recôncavo baiano. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v.10, n.3, p. 396 – 414, jul – set, 2016.

SCHEDLER, A.C.; POZZA, M.S.S.; POZZA, P.C.; NUNES, R.V.; BORSATTI, L.; MANGONI, J. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e fatores associados. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, v.10, n.1, p.52-59, jan/mar, 2009.

SILVA, L.C.C. et al. Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.32, n.1, p.267-276, 2011.

SILVA, V. A. M.; RIVAS, P. M.; ZANELA, M. B.; PINTO, A. T.; RIBEIRO, M. E. R.; SILVA, F. F. P.; MACHADO, M. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite cru, do leite pasteurizado tipo A e de pontos de contaminação de uma Granja Leiteira no RS. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 38, n. 1, p. 51-57, 2011.

TEBALDI, V.M.R.; OLIVEIRA, T.L.C.; BOARI, C.A; PICCOLI, R.H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. *Ciência Tecnologia Alimentar*. vol.28 No.3, Campinas July/Sept. 2008.

VALEEVA, J. G. et al. Improving Food Safety Within the Dairy Chain: An Application of Conjoint Analysis. *Journal Dairy Science*, v. 88, n. 4, p. 1601-1612, 2005.