

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E
DO AMBIENTE

**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**

Cristiane da Rosa Moraes
Médica Veterinária - UFRGS

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Março, 2005

AGRADECIMENTOS

Em especial à Professora Marisa da Costa, por ter orientado com paciência e dedicação e por ter ensinado disciplina e organização.

À Professora Gertrudes Corção pela co-orientação deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Professores Eduardo César Tondo, Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso e Verônica Schmidt.

À Médica Veterinária Márcia Conte e ao Sr. Carlos Fernando Casagrande da Rocha pelo apoio e gentileza dedicados.

Ao Sr. Denílson José Barbosa, pelas horas de companhia durante as coletas.

À colega de profissão e de mestrado, Cristina Bergman Zaffari, por toda sua ajuda, carinho, força e amizade.

À bióloga Bianca Bittencourt pela amizade, auxílio e empenho na fase inicial deste trabalho.

Aos estagiários José Pedro Abatti Vianna da Rocha, Suelen Ribeiro Rabello, Ligia Vecchi de Oliveira, Lavicie Arais Rodrigues por terem ajudado na realização deste trabalho e pela amizade.

Com todo meu amor, ao meu colega Alexandre Meneghello Fuentesfria, por ser meu exemplo de força, caráter e dedicação e pelo carinho que sempre dedica a mim.

À minha mãe por estar sempre comigo.

À CAPES pelo suporte financeiro destinado a realização deste trabalho.

A Deus por tornar tudo possível.

**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**

Autor: Cristiane da Rosa Moraes
Orientador: Dra. Marisa da Costa

¹RESUMO

O leite é uma fonte excelente de nutrientes tornando-se um meio de cultura ideal para o crescimento de microrganismos potencialmente patogênicos. Estes microrganismos podem comprometer a qualidade e segurança do leite e seus derivados e podem contaminar o homem através da ingestão do leite *in natura* ou beneficiado contaminados. Para estimar a qualidade microbiológica do leite *in natura*, foram coletadas 116 amostras em 42 propriedades leiteiras nos municípios de Esteio, Glorinha, Gravataí, Sapucaia do Sul e Viamão, no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. A presença de coliformes fecais e *E. coli* foi confirmada em 24 isolados, referentes a oito propriedades. Neste trabalho não foi possível detectar a presença de *Salmonella* sp. As amostras testadas estavam dentro dos padrões exigidos pela legislação para microrganismos mesófilos e psicrotróficos, porém alguns autores citam que contagens acima de $3 \log. ufc. ml^{-1}$ podem ser prejudiciais ao processamento do produto. Para detecção de anticorpos específicos de *Brucella* sp. foi utilizado o Teste de Anel de Leite, em 181 amostras (116 amostras coletadas acrescidas de 65 fornecidas pela indústria de beneficiamento), sendo encontradas dez amostras positivas em três propriedades. A qualidade higiênico-sanitária nas propriedades analisadas demonstrou ser adequada, porém foi evidenciada a presença microrganismos patogênicos em algumas amostras representando um risco à saúde pública.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil (78p.). Março, 2005.

BACTERIOLOGICAL QUALITY OF BOVINE BULK MILK, *IN NATURA* AND BENEFITED, AND SEROLOGICAL DETECTION OF BRUCELLOSIS IN METROPOLITAN REGION OF PORTO ALEGRE - RS

Author: Cristiane da Rosa Moraes
Advisor: Dra. Marisa da Costa

²ABSTRACT

Milk is an excellent source of nutrients becoming an ideal medium of culture for the growth of potentially pathogenic microorganisms. These microorganisms can compromise the quality and safety of milk and milk products, being possible to contaminate the man through the ingestion *in natura* or benefited milk. To verify the microbiological quality of raw milk, 116 samples of 42 dairy farms were collected in the municipal districts of Esteio, Glorinha, Gravataí, Sapucaia do Sul and Viamão, in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. The presence of fecal coliforms and *E. coli* was confirmed in 7% of isolates, collected from eight properties. *Salmonella* sp. was not detected in this work. The tested samples were in accordance with official standards demanded by the legislation for mesophiles and psychrotrophics microorganisms, however some authors cite that counts above of 3 log.ufc.ml⁻¹ can be harmful to the processing of the product. For detection specific *Brucella* sp., antibodies were used in the Milk Ring Test, in 181 samples (116 samples collected, added of 65 supplied by the industry), being found ten positive samples from three properties. The hygienic-sanitary quality in the analyzed properties demonstrated to be satisfactory, however the presence of pathogenic microorganisms in some samples was evidenced, representing a risk to the public health.

¹ Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. **(78p.). March, 2005.**

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Definição de leite.....	5
2.2 Composição do leite.....	5
2.3 Qualidade físico-química do leite	6
2.4 Classificação dos tipos de leite	7
2.5 Tratamento térmico para controle de populações microbianas no leite ..	8
2.5.1 Pasteurização	9
2.5.1.1 Pasteurização lenta.....	9
2.5.1.2 Pasteurização rápida.....	10
2.5.2 Esterilização	10
2.5.2.1 Leite esterilizado embalado assepticamente.....	11
2.5.2.2 Autoclavagem	11
2.6 Legislação brasileira e o leite	12
2.7 Fontes de contaminação do leite	12
2.8 Microrganismos de interesse no leite	13
2.9 Temperatura e os microrganismos.....	15
2.9.1 Atividade enzimática no leite	18
2.10 Microrganismos indicadores.....	20
2.10.1 Coliformes totais.....	20
2.10.2 Coliformes fecais e <i>Escherichia coli</i>	21
2.11 Métodos convencionais para detecção de coliformes totais, fecais e <i>Escherichia coli</i>	23
2.12 Bactérias relacionadas a doenças transmitidas por alimentos.....	25
2.12.1 <i>Salmonella</i> sp.....	25
2.12.1.1 Detecção de <i>Salmonella</i> sp.....	27
2.13.2 <i>Brucella</i> sp.	28
2.13.2.1 Detecção de <i>Brucella</i> sp.	32
2.13.2.1.1 Isolamento bacteriano	32
2.13.2.1.2 Detecção sorológica.....	33
3. MATERIAS E MÉTODOS	38
3.1 Amostragem.....	38
3.2 Diluição inicial das amostras	40
3.3. Contagem de coliformes totais.....	40
3.3.1 Presença de coliformes fecais	41
3.3.2 Confirmação de <i>Escherichia coli</i>	41
3.4 Isolamento de <i>Salmonella</i> sp.	42
3.4.1 Pré-enriquecimento em meio não seletivo	42
3.4.2 Enriquecimento seletivo em meio líquido	42
3.4.3 Isolamento em meio sólido seletivo	42
3.4.4 Identificação das colônias	43
3.4.5 Testes de triagem bioquímica	43
3.4.6 Provas bioquímicas	44

3.5 Contagem de microrganismos mesófilos	44
3.6 Contagem de microrganismos psicrotróficos	44
3.7 Detecção sorológica de <i>Brucella</i> sp.	45
3.10 Análise estatística	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Contagem de coliformes totais e presença de <i>Escherichia coli</i>	47
4.2 Detecção de <i>Salmonella</i> sp.....	53
4.3 Contagem de bactérias mesófilas e psicrotróficas	54
4.5 Detecção de rebanhos com brucelose	58
Propriedades.....	59
5. CONCLUSÕES.....	61
7. APÊNDICE.....	75
7.1 Caldo ONPG	75
8. VITA	77
8.1 Dados Pessoais	77
8.2 Formação Acadêmica / Titulação	77
8.3 Áreas de Atuação.....	77
8.4 Produção Científica	78
8.5 Resumos em anais de eventos	78
8.6 Prêmios e Títulos	78

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1:	Requisitos físico-químicos segundo ao anexo IV da Normativa 51 de 18 de setembro de 2002, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para leite cru refrigerado.....	7
Tabela 2:	Padrões microbiológicos máximos estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Normativa 51 de 18/09/2002) para leite <i>in natura</i> e pasteurizado Tipo C.....	13
Tabela 3:	Padrões microbiológicos máximos estabelecidos para leite pasteurizado, leite UAT e derivados, na Resolução-RDC Nº. 12, de 2 de janeiro de 2001, ANVISA, Ministério da Saúde....	13
Tabela 4:	Tipos de microrganismos pesquisados, número de amostras e número de propriedades.....	40
Tabela 5:	Contagem de coliformes totais ($\log.\text{ufc.mL}^{-1}$) na coleta manual, média das contagens e armazenamento das amostras de leite de mistura.....	49
Tabela 6:	Contagem de coliformes totais ($\log.\text{ufc.mL}^{-1}$) na coleta mecânica, média das contagens e armazenamento das amostras de leite de mistura.....	50
Tabela 7:	Temperaturas mínimas e máximas previstas para cidade de Porto Alegre, contagem média de coliformes totais e número de <i>E. coli</i> confirmadas nos dias das coletas.....	52
Tabela 8:	Média de contagens ($\log.\text{ufc.mL}^{-1}$) das bactérias mesófilas e psicrófilas isoladas de leite <i>in natura</i> e pasteurizado em cinco municípios da Grande Porto Alegre.....	57
Tabela 9:	Resultados de sorologia pelo Teste do Anel em Leite nos diferentes tempos de amostragens (TAL).....	59
Tabela 10:	Análise de Variância para tipo de armazenamento do leite utilizado nas propriedades coletadas em cinco municípios do Rio Grande do Sul.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

Ago: Agosto

ATCC: *American Type Culture Collection*

ADN: Ácido Desoxirribonucléico

°C: Graus Celsius

g: Grama

ICBS: Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Jan: Janeiro

Jul: Julho

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Mar: Março

µL: Microlitro

mL: Mililitro

Nov: Novembro

pH: Logaritmo decimal do inverso da atividade de íons hidrogênio numa solução

PNCEBT: Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose

TECPAR: Instituto de Tecnologia do Paraná

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

1. INTRODUÇÃO

O leite é um dos alimentos mais utilizados na dieta de humanos de todas as faixas etárias e classes sociais devido ao seu grande valor nutricional. Possui alta digestibilidade, além de ser uma fonte excelente de nutrientes como proteínas, carboidratos e sais minerais. Contudo, devido a sua riqueza de nutrientes, torna-se susceptível à colonização por um grande número de microrganismos potencialmente patogênicos ao homem, sendo assim, considerado um meio de cultura bastante favorável ao desenvolvimento de microrganismos.

O consumo de leite *in natura* e seus derivados é favorecido por fatores culturais, nutricionais, sensoriais e econômicos. Embora, o controle microbiológico do leite, através de testes microbiológicos de alguns microrganismos, não garanta a segurança do consumo de leite *in natura*, desempenha uma importante função no sentido de alertar a população dos riscos inerentes ao seu consumo. O controle microbiológico do leite inicia-se com cuidados com a sanidade animal, condições adequadas de higiene durante a ordenha, bem como em todas as etapas de seu processamento.

Estes cuidados visam reduzir a contaminação microbiológica do produto final, tentando minimizar o risco de desenvolvimento de doenças relacionadas ao consumo de leite.

Existem muitas doenças relacionadas ao consumo de alimentos contaminados com microrganismos potencialmente patogênicos causadores de toxinfecções alimentares, que colocam em risco a saúde dos consumidores. Entre estes microrganismos podem-se citar: coliformes fecais, *Salmonella* sp. e *Brucella* sp. A pesquisa de coliformes fecais, especialmente *Escherichia coli* (*E. coli*) nos alimentos fornece, com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e a indicação da eventual presença de enteropatógenos. *E. coli* é responsável por inúmeros surtos de gastroenterites em humanos após ingestão de alimentos contaminados com este microrganismo, incluindo leite e seus derivados.

Salmonella sp. é considerada o microrganismo de maior importância relacionado a surtos de toxinfecções alimentares no Rio Grande do Sul. Possui a habilidade de produzir doenças que variam de gastroenterite à septicemia. Embora a sua incidência em leite pareça ser baixa, sua presença continua sendo um risco à saúde dos consumidores.

Os humanos podem ser infectados com *Brucella* sp. através do consumo de leite *in natura* contaminado ou impropriamente pasteurizado. *Brucella* sp. é responsável por enormes perdas econômicas por causar nos animais infertilidade, cio tardio, perda de terneiros, aborto e diminuição de até

25% na produção de leite. Oitenta por cento dos bovinos infectados, podem abrigar este microrganismo nos linfonodos e glândulas mamárias.

A importância das indústrias de beneficiamento de leite tem aumentado cada vez mais, pois promovem um controle rigoroso do processamento do produto e padronização da qualidade. Com o beneficiamento do leite, através de processos térmicos tais como pasteurização e esterilização, conseguiu-se uma redução considerável nos surtos de toxinfecções alimentares, minimizando os riscos à saúde pública e o aumento do tempo de vida útil do produto.

Para melhorar a qualidade do leite produzido, mudanças no setor leiteiro estão sendo implantadas, dando ênfase à refrigeração do leite (entre 4 - 5°C) na propriedade e durante o transporte a granel. A refrigeração do leite tem como objetivo controlar a multiplicação de microrganismos aeróbios mesófilos. No entanto, a refrigeração abaixo de 7°C permite o crescimento de microrganismos psicrótrópicos, que podem produzir enzimas extracelulares que causam danos ao leite e derivados.

O setor leiteiro vem modernizando-se para tornar o leite produzido no Brasil um produto mais atrativo, tanto no mercado nacional quanto internacional. Para tanto, programas de incentivo aos produtores estão sendo executados visando reduzir os níveis de microrganismos patogênicos no leite aumentando, assim, a qualidade do produto. Entre estes, pode-se salientar o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose.

Os princípios gerais a serem aplicados para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos têm justificativa no que se refere aos problemas de saúde pública e na necessidade de uniformizar os padrões para o comércio entre os países.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade bacteriológica do leite bovino de mistura, *in natura* e após beneficiamento, através de testes que detectam a presença de (1) coliformes totais, (2) coliformes fecais e (3) *Escherichia coli*, (4) *Salmonella* sp., (5) bactérias mesófilas e psicotróficas, e pela (6) detecção de rebanhos positivos para *Brucella* sp. através da sorologia em leite *in natura*, provenientes de 50 propriedades leiteiras. O beneficiamento foi realizado em uma indústria de laticínios da região metropolitana de Porto Alegre, no Rio Grande do Sul.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Definição de leite

Entende-se por leite natural o produto íntegro, não adulterado e sem colostro, de ordenha completa e ininterrupta das fêmeas mamíferas, sadias e bem alimentadas (Franco *et al.*, 2000; Santana *et al.*, 2001; Brasil, 2002). Em geral, o leite é entendido exclusivamente como leite de vaca, e quando há referência ao leite de outros animais costuma-se usar o nome da espécie correspondente. Assim temos: leite de cabra, leite de ovelha, entre outros (Santana *et al.*, 2001). É rico em nutrientes, sendo considerado um excelente meio de cultura para microrganismos potencialmente patogênicos ao homem (Adesiyun, 1994; Hoffmann *et al.*, 1999).

2.2 Composição do leite

O leite é composto por proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas, sais minerais e água (Hoffmann *et al.*, 1999; Franco *et al.*, 2000). A principal proteína do leite é a caseína, representando entre 77 e 82% de suas proteínas

totais. As albuminas do leite são duas: a lactoalbumina e a soroalbumina. A parte mais variável do leite é a gordura, pois depende da raça do animal, alimentação e do período de lactação. A gordura do leite encontra-se em suspensão, formando milhares de glóbulos, com uma média de um a 20 micrômetros de diâmetro. Cada mililitro do leite tem de três a quatro milhões de glóbulos de gordura. Os ácidos graxos mais importantes são o olêico, palmítico, esteárico, mirístico, láurico e o butírico. A lactose é praticamente o único açúcar do leite. Este carboidrato possui leve sabor adocicado e pode ser fermentado por microrganismos transformando-se em ácido láctico, álcool etílico ou butírico, conforme o agente. O leite contém vitaminas lipossolúveis A, D, E e K, que ficam suspensas na gordura e as hidrossolúveis B₁, B₂ e C. Os sais minerais presentes no leite encontram-se em dissolução e os principais são o cálcio, o sódio, o potássio e o magnésio (Tronco, 1997; Sá, 2004). Existem outros constituintes, os quais podem ser encontrados no leite, como os leucócitos. A ocorrência deste tipo de célula é sempre pequena, quando proveniente de úbere sadio. Entretanto, esta quantidade pode ser aumentada no leite de úbere doente e o aumento será proporcional ao avanço da doença (Tronco, 1997).

2.3 Qualidade físico-química do leite

A qualidade do leite pode ser evidenciada através de determinações físico-químicas (Tabela 1), provas de higiene, reações colorimétricas e provas organolépticas. Através do exame qualitativo, é possível identificar a adição de substâncias adulterantes, a eventual presença de substâncias conservantes e

mesmo fazer o cálculo aproximado ou exato do rendimento industrial (Tronco, 1997). Para o leite ser considerado normal, ou seja, livre de adulterações deve apresentar as características físico-químicas listadas na Tabela 1 segundo a legislação brasileira (Brasil_b, 2002).

Tabela1: Requisitos físico-químicos segundo o anexo IV da Normativa Nº51 de 18 de Setembro de 2002, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para leite cru refrigerado (Brasil_b, 2002).

REQUISITOS	LIMITES
Matéria gorda (g/100g)	Mínimo de 3,0
Densidade relativa a 15°C (g/mL)	1,028 a 1,034
Acidez titulável (g ácido láctico/100 mL)	0,14 a 0,18
Extrato seco desengordurado (g/100g)	Mínimo de 8,4
Índice crioscópico máximo	- 0,512°C
Proteínas (g/100g)	Mínimo de 2,9

2.4 Classificação dos tipos de leite

Alguns autores classificam o leite de acordo com padrões microbiológicos baseados, no número de células bacterianas, em tipo A, B e C com contagens que variam de menos de 10^4 células por mililitro, até 5×10^5 células por mililitro e acima de 5×10^5 células por mililitro, respectivamente (Balbani & Butugan, 2001).

Já o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) apresenta critérios de produção, características físico-químicas e microbiológicas para a classificação dos tipos de leite (Brasil_b, 2002).

Segundo a Normativa 51 do MAPA, o Leite Pasteurizado tipo A é classificado quanto ao teor de gordura (integral, padronizado, semidesnatado ou desnatado), devendo ser produzido, beneficiado e envasado em estabelecimento denominado Granja Leiteira. O Leite Cru Refrigerado tipo B é classificado como produto integral quanto ao teor de gordura, refrigerado em propriedade rural produtora de leite e nela permanecendo pelo período máximo de 48 horas, em temperatura igual ou inferior a 4°C, que deve ser obtida no máximo três horas após o final da ordenha, devendo ser transportado para indústria de beneficiamento, para ser processado, onde deve apresentar no momento do seu recebimento, temperatura igual ou inferior a 7°C. O Leite Cru tipo C não deve ser submetido a qualquer tipo de tratamento térmico na propriedade leiteira onde foi produzido e integral quanto ao teor de gordura, devendo ser transportado em vasilhame adequado e individual de capacidade até 50 litros e entregue em estabelecimento industrial adequado até as 10 horas do dia de sua ordenha (Brasil, 2002).

2. 5 Tratamento térmico para controle de populações microbianas no leite

O leite *in natura* pode conter microrganismos potencialmente patogênicos ao homem (Gran *et al.*, 2003). É um excelente meio de cultura para microrganismos devido a sua constituição (Hoffmann *et al.*, 1999; Adesiyun, 1994). Para a destruição dos microrganismos, que podem ser disseminados pelo consumo de leite *in natura*, deve-se proceder algum tipo de tratamento térmico (Madrid *et al.*, 1986).

2.5.1 Pasteurização

O processo de pasteurização consiste no aquecimento do leite em temperaturas elevadas por tempo determinado, em equipamento de pasteurização, com o objetivo de destruir a maioria dos microrganismos vegetativos presentes no produto. Surto de toxinfecções alimentares relacionadas ao consumo de leite pasteurizado ainda são relatados, pois o processamento térmico pode ter sido mal conduzido ou devido a uma recontaminação pós-pasteurização (Gran *et al.*, 2003). Pelo fato da brucelose, tuberculose e outras zoonoses poderem ser transmitidas através da ingestão de leite e derivados crus o aquecimento do leite foi reconhecido como uma medida preventiva. A pasteurização foi introduzida na indústria de laticínios para combater as doenças e aumentar a vida de prateleira do produto. A resistência térmica dos microrganismos definiu os parâmetros de tratamento térmico (Hadjenwurcel, 1997).

2.5.1.1 Pasteurização lenta

Este tipo de pasteurização é realizada em tanques de parede dupla, onde o leite é aquecido em temperaturas entre 60 - 65°C por 30 minutos. A vantagem deste sistema é que conserva as propriedades do leite o mais aproximado do seu estado *in natura* (Tronco, 1997; Brasil_a, 2001).

2.5.1.2 Pasteurização rápida

A pasteurização rápida utiliza os pasteurizadores de placa. Estes consistem em um grupo de placas retangulares onduladas ou com nervuras, em número variável, colocadas em posição vertical, fechadas umas com as outras, separadas por uma junta de borracha que deixa um espaço de circulação entre as placas. Por este espaço, circula o leite, vapor, água quente e fria. Neste tipo de pasteurização o leite é aquecido em temperaturas que variam entre 72°C e 75°C por 15 a 20 segundos. As temperaturas alcançadas durante este processo são suficientes para destruir microrganismos tais como as bactérias Gram-negativas, algumas bactérias Gram-positivas e fungos (Tronco, 1997; Brasil, 2002). Alguns microrganismos termorresistentes que podem resistir a pasteurização são os pertencentes aos seguintes gêneros: *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium* e, ocasionalmente, alguns bastonetes Gram-negativos (Gran *et al.*, 2003; Aaku *et al.*, 2004).

2.5.2 Esterilização

Leite esterilizado é aquele submetido a um processo de aquecimento que garante a destruição de todos microrganismos, inclusive esporulados (Madrid *et al.*, 1986). Este tipo de processo térmico pode ser realizado por Ultra Alta Temperatura (UAT - tradução de "Ultra High Temperature" - UHT) ou por autoclavagem. O resultado é a obtenção de um

produto final de alta qualidade com aumento de vida de prateleira, em temperatura ambiente, de até 120 dias (Tronco, 1997).

2.5.2.1 Leite esterilizado embalado assepticamente

O leite esterilizado embalado assepticamente também é conhecido como leite UAT ou Longa Vida. Costuma-se agregar à sigla UHT as letras ST, do inglês “short time”, significando espaço curto. Em outras palavras, tratamento a temperaturas elevadas, durante um curto espaço de tempo (Madrid *et al.*, 1986). Este tipo de processo consiste na conservação do leite por meio de uma breve e intensa exposição a um aquecimento adequado. O leite é aquecido de 135 a 150°C durante dois a oito segundos em um fluxo térmico contínuo e imediatamente resfriado (temperatura inferior a 32°C) e envasado em condições assépticas, em embalagens esterilizadas (Madrid *et al.*, 1986; Tronco, 1997).

2.5.2.2 Autoclavagem

Na autoclavagem, o leite, já envasado, é aquecido em temperatura entre 110°C a 120°C durante 10 a 25 minutos e resfriado em temperaturas que podem variar entre 20 a 35°C, devendo, após, ser armazenado adequadamente. Este tratamento térmico garante a destruição dos microrganismos vegetativos e esporulados presentes no leite (Tronco, 1997).

2.6 Legislação brasileira e o leite

A Normativa 51, de 18 de setembro de 2002, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com vigência a partir de 1º de julho de 2005 para as regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste (Brasil^b, 2002), aprovou e estabeleceu os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. O leite *in natura* e o leite pasteurizado tipo C devem estar dentro dos padrões microbiológicos estabelecidos nesta normativa (Tabela 2).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde considerando a importância de compatibilizar a legislação nacional com regulamentos no Mercosul, relacionados aos critérios e padrões microbiológicos, aprovou o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos na Resolução-RDC Nº. 12, de 2 de janeiro de 2001 (Brasil^a, 2001). O leite bovino pasteurizado, leite UAT e derivados tem o seu padrão microbiológico contemplados nesta Resolução (Tabela 3). O descumprimento aos termos desta Resolução constitui infração sanitária.

2.7 Fontes de contaminação do leite

Com o surgimento de alimentos preparados, começaram a ocorrer problemas relacionados com doenças transmitidas pelo seu consumo e com a rápida deterioração devido, principalmente, à conservação inadequada destes

alimentos. As principais fontes de contaminação são: solo, água, plantas, fômites, homem, animais, ração animal, ar e poeira (Silva *et al.*, 1997).

TABELA 2: Padrões microbiológicos máximos estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Normativa 51 de 18/09/2002) para leite *in natura* e pasteurizado Tipo C (Brasil^b, 2002).

Leite Tipo C	CPP ^a (log.ufc/mL ^b)	Coliformes totais (log.ufc/mL)	Coliformes fecais (log.ufc/mL)	<i>Salmonella</i> sp. /25 mL
<i>In natura</i>	6	-	-	-
Pasteurizado	5,47	0,60	0,30	Ausência

^aContagem padrão em placa

^bLogaritmo da unidade formadora de colônia por mililitro

- Não exigido na legislação acima

TABELA 3: Padrões microbiológicos máximos estabelecidos para leite pasteurizado, leite UAT e derivados, na Resolução-RDC Nº. 12, de 2 de janeiro de 2001, ANVISA, Ministério da Saúde (Brasil^a, 2001).

Leite	Coliformes fecais (log.ufc/mL ^a)	<i>Salmonella</i> sp. /25mL
Pasteurizado	0,60	ausência
UAT ^b (após 7 dias de incubação a 35-37°C de embalagem fechada)	Não deve apresentar microrganismos patogênicos e causadores de alterações físicas, químicas e organolépticas do produto, em condições normais de armazenamento.	

^a Logaritmo da unidade formadora de colônia por mililitro

^b Ultra Alta Temperatura

2.8 Microrganismos de interesse no leite

Os microrganismos podem desempenhar papéis muito importantes nos alimentos. É possível classificar os microrganismos em três grupos, dependendo do tipo de interação entre eles e o alimento: (1) microrganismos causadores de deterioração nos alimentos (alteração da cor, sabor, odor, textura e aspecto); (2) microrganismos patogênicos, refletindo condições

precárias de higiene durante a produção, processamento, armazenamento, distribuição ou manuseio e (3) microrganismos presentes no alimento que causam alterações benéficas, modificando suas características originais de forma a transformá-lo em um novo alimento (Silva *et al.*, 1997).

A presença de bactérias ácido-láticas no leite é normal e inócua, quando em pequeno número (inferior a 10^3 células por mililitro). Altas contagens obtidas no leite *in natura* são responsáveis por defeitos na qualidade do leite pasteurizado (Soler *et al.*, 1995).

A microbiota normal do leite é composta pelos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Micrococcus*. Entretanto, a detecção de microrganismos patogênicos no leite pode ocorrer devido a contaminações oriundas, principalmente, do úbere, utensílios e equipamentos utilizados durante a ordenha, água e ordenhadores. O processamento do leite, especialmente as condições de higiene dos equipamentos utilizados nesta etapa, é uma importante fonte para introdução de microrganismos no leite *in natura* (Cliver, 1990).

As bactérias estão envolvidas em mais de 90% dos casos de surto de toxinfecção alimentar relacionados ao consumo de leite. Algumas bactérias patogênicas que podem estar relacionadas ao consumo de leite incluem *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter* sp., *Staphylococcus aureus*, *Brucella* sp., *Mycobacterium* sp. e *Clostridium botulinum* (Chye *et al.*, 2004).

Entre as bactérias Gram-negativas, citam-se as da família *Enterobacteriaceae* como uma das mais freqüentes no leite. Esta família tem

importância sob os pontos de vista tecnológico e higiênico. Do ponto de vista higiênico, diversas espécies de enterobactérias são responsáveis por toxinfecções importantes, entre estas a *Salmonella* sp. Já sob o ponto de vista tecnológico são importantes devido aos efeitos indesejáveis como a acidificação do leite (Tronco, 1997).

2.9 Temperatura e os microrganismos

A temperatura de armazenamento do leite pós-ordenha é o fator determinante no crescimento bacteriano no leite não refrigerado, sendo os microrganismos mesófilos (capazes de crescer em temperaturas entre 25 a 40°C) que predominarão neste caso. Estes microrganismos provocam a acidificação do leite pelo acúmulo de ácido láctico, resultante da fermentação da lactose (Santos & Fonseca, 2001). Para melhorar a qualidade do leite produzido, mudanças no setor leiteiro estão sendo implementadas, dando ênfase à refrigeração do leite (entre 4-5°C) na propriedade e durante o transporte (Sorhaug & Stepaniak, 1997; Santos & Fonseca, 2001; Brasil_b, 2002).

A refrigeração do leite tem como objetivo controlar a multiplicação de microrganismos aeróbios mesófilos. No entanto, a refrigeração abaixo de 7°C permite o crescimento de microrganismos psicrótrópicos, que podem multiplicar-se em temperaturas de refrigeração (Sorhaug & Stepaniak, 1997; Santos & Fonseca, 2001; Brasil_b, 2002).

Existe certa confusão quanto à utilização dos termos psicrófilo e psicrótrófico, pois antigamente estes termos eram empregados como

sinônimos. Microrganismos psicrófilos são aqueles que apresentam temperatura ótima de crescimento abaixo de 7°C. Enquanto, os psicrotróficos são aqueles microrganismos que apresentam temperatura ótima de crescimento entre 20 e 40°C, porém podem crescer em temperaturas inferiores a 7°C (Santos & Fonseca, 2001). Segundo Aaku *et al.* (2004) o leite *in natura* mantido em temperaturas de refrigeração durante alguns dias, antes do processamento térmico, pode apresentar microrganismos pertencentes aos seguintes gêneros *Enterococcus*, *Proteus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter*.

Os psicrotróficos degradam proteínas e gorduras do leite, através da produção de enzimas termoestáveis durante a fase exponencial ou no início da fase estacionária da multiplicação celular (Wessels *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 2003). As enzimas proteolíticas e lipolíticas podem comprometer a qualidade do leite e seus derivados quando as contagens de psicrotróficos atingirem $6 \log. \text{ufc.mL}^{-1}$ (Santos & Fonseca, 2001; Santana *et al.*, 2001). Estas enzimas podem manter sua atividade mesmo após a pasteurização ou esterilização do leite, comprometendo a produção de seus derivados e causando alterações na cor e sabor nos produtos, perda da consistência na formação do coágulo para fabricação do queijo e gelatinização do leite longa vida. O leite bovino é um produto biologicamente ativo devido à existência de atividade enzimática (Chen *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004). As proteases e lipases, produzidas por microrganismos contaminantes, têm papel substancial

na qualidade e tempo de prateleira do leite e seus derivados (Santos *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2003).

Existem ainda os microrganismos psicrotróficos termorresistentes, os quais multiplicam-se bem em temperatura de refrigeração e também podem sobreviver ao tratamento térmico. Estes microrganismos podem produzir enzimas extracelulares termorresistentes, que comprometem a qualidade e a vida de prateleira do leite pasteurizado e seus derivados. Os psicrotróficos termorresistentes são classificados como Gram-positivos formadores ou não de esporos, sendo que a maioria dos microrganismos isolados do leite *in natura* pertencem ao gênero *Bacillus*. Este gênero está amplamente distribuído no ambiente e pode contaminar o leite e seus derivados durante a produção e processamento. Também pertencem a este grupo os gêneros *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Streptococcus*, *Micrococcus* e *Corynebacterium* (Sorhaug & Stepaniak, 1997; Santos & Fonseca, 2001; Chen *et al.*, 2003). No Brasil, foi verificada uma alta frequência de microrganismos Gram-positivos termorresistentes em leite pasteurizado (Santos & Fonseca, 2001). Estes microrganismos são normalmente isolados dos equipamentos utilizados durante a ordenha. A presença destes microrganismos tem sido considerada um indicativo de condições insatisfatórias de higiene e da baixa qualidade de grande parte do leite pasteurizado do país (Santana *et al.*, 2001).

2.9.1 Atividade enzimática no leite

São descritas no leite a existência de 50 a 60 atividades enzimáticas diferentes, incluídas as relacionadas com as bactérias contaminantes (Chen *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004). Apenas as proteases e lipases, produzidas por microrganismos contaminantes, têm papel substancial na qualidade e tempo de prateleira de leite e seus derivados (Santos *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2003).

As enzimas que hidrolisam as ligações peptídicas apresentam várias denominações gerais as quais incluem proteases, proteinases, peptidases e enzimas proteolíticas. Geralmente, as espécies de *Bacillus* apresentam uma elevada atividade proteolítica e apresentam a capacidade de produzir diversos tipos de proteases, diferentemente do gênero *Pseudomonas* que é capaz de produzir apenas um ou dois tipos de metalo-protease, que confere elevada resistência térmica ao microrganismo (Chen *et al.*, 2003). Um dos efeitos diretos da proteólise é o aparecimento de sabor amargo no leite (Santos & Fonseca, 2001). No leite, as proteases também podem causar mudanças microestruturais (como a floculação da caseína) e aumento na viscosidade (gelatinização) no leite UAT (Chen *et al.*, 2003; Datta & Deeth, 2003). As proteases hidrolisam a caseína localizada na superfície das micelas de gordura, causando sua desestabilização e coagulação do leite. O armazenamento em temperatura ambiente é o principal fator responsável pelas alterações no sabor e na textura, limitando o tempo de prateleira do leite UAT devido à proteólise (Datta & Deeth, 2003).

Os lipídeos do leite são encontrados sob a forma globular, envolvidos por uma membrana composta por proteínas, fosfolipídios, glicolipídios, esteróis e glicerídios. Os efeitos causados no leite pela ação das enzimas lipolíticas são o aparecimento de odores indesejáveis e sabor rançoso no leite, porém são menos, comuns quando comparados aos causados pelas proteases. Isto porque, os processos térmicos, como a pasteurização e autoclavagem, determinam uma diminuição da atividade da maioria das enzimas lipolíticas. Enzimas lipolíticas termorresistentes são produzidas pelos gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter* e *Serratia*, porém os gêneros *Alcaligenes* e *Flavobacterium* têm sua atividade lipolítica destruídas pelo calor. Os microrganismos mais relacionados com alterações lipolíticas são as *Pseudomonas* sp. (Chen *et al.*, 2003; Santos & Fonseca, 2001).

Existem ainda, outros grupos de enzimas importantes no leite denominadas de fosfolipases (fosfolipase C ou lecitinase), produzidas pelo *Bacillus cereus* e por algumas espécies de *Pseudomonas*. As fosfolipases têm a capacidade de hidrolisar a membrana protetora do glóbulo de gordura do leite possibilitando a ação das lipases sobre os triglicerídeos. Após esta ação enzimática, ocorre a formação de ácidos graxos livres, monoglicerídeos e diglicerídeos provocando o aparecimento de sabor característico de rancidez. No leite *in natura* a produção de fosfolipases está relacionada aos seguintes microrganismos Gram-negativos: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella* e *Pseudomonas*. No leite pasteurizado as bactérias Gram-positivas, *Bacillus mycoides* e *Bacillus cereus* têm sido responsáveis pela produção de fosfolipases (Santana *et al.*, 2001).

2.10 Microrganismos indicadores

Os microrganismos indicadores são grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial de um alimento. Podem indicar condições sanitárias inadequadas durante a produção, processamento ou armazenamento. Na indústria leiteira, a contagem de coliformes é o indicador mais utilizado das condições de higiene na produção de leite e no controle de contaminação pós-pasteurização (Silva *et al.*, 1997; Beloti *et al.*, 2002).

2.10.1 Coliformes totais

Este grupo é composto por bactérias da família *Enterobacteriaceae*. O grupo dos coliformes totais inclui bactérias na forma de bastonetes Gram-negativos, não formadores de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, com capacidade de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas de incubação a 35°C. Pertencem a este grupo de bactérias aproximadamente 20 gêneros, onde se encontram bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos e animais de sangue quente. Também é composto por diversos gêneros e espécies de bactérias não-entéricas, como *Serratia* e *Aeromonas*. A presença de coliformes totais nos alimentos não indica, necessariamente, contaminação de origem fecal. Entretanto, sua presença em alimentos processados é um indicador de contaminação pós-sanitização ou

pós-processamento (principalmente na pasteurização), salientando práticas de higiene insatisfatórias para o processamento de alimentos (Silva *et al.*, 1997). O limite máximo permitido para o leite pasteurizado tipo C é de 0,6 log.ufc.mL⁻¹ (Brasil^b, 2002) e sua presença não é tolerada em leite UAT.

2.10.2 Coliformes fecais e *Escherichia coli*

Os coliformes fecais são um subgrupo dos coliformes totais que fermentam a lactose em temperaturas elevadas de incubação (44,5°C a 45,5°C) sendo, posteriormente, denominados como coliformes termotolerantes (Germano & Germano, 2001). Atualmente, sabe-se que o grupo de coliformes fecais inclui pelo menos quatro gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* (Silva *et al.*, 1997).

A pesquisa de coliformes fecais nos alimentos fornece, com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e indicação da eventual presença de enteropatógenos. *Escherichia coli* é a espécie predominante entre os diversos microrganismos anaeróbios facultativos que fazem parte da microbiota intestinal de animais de sangue quente, porém outras bactérias entéricas, como a *Klebsiella* sp., também são consideradas coliformes fecais (USFDA, 2002). Por ser uma enterobactéria, uma vez que *E. coli* for detectada no alimento indica que este tem uma contaminação microbiana de origem fecal e, portanto está em condições higiênicas insatisfatórias (Silva *et al.*, 1997; Tronco, 1997). No leite pasteurizado tipo C é tolerado o máximo de 0,6 log.ufc.mL⁻¹ sendo que em leite UAT não deve ser observada sua presença (Brasil^a, 2001).

Além de identificar condições higiênicas insatisfatórias, a contaminação de origem fecal, pode indicar a possibilidade de transferência de *E. coli* patogênicas ao homem (Pereira *et al.*, 1999; Chye *et al.*, 2004).

E. coli é uma enterobactéria Gram-negativa, catalase positiva e oxidase negativa. Embora, existam cepas capazes de multiplicar-se a 4°C, é um microrganismo mesófilo típico, capaz de desenvolver-se em temperaturas que variam entre 7 a 46°C, sendo 37°C sua temperatura ótima de crescimento. Este microrganismo não apresenta termorresistência, sendo destruído em temperaturas em torno de 60°C em poucos segundos (Germano & Germano, 2001).

A dose infectante de *E. coli* em humanos adultos é geralmente entre 10^6 a 10^8 células, porém alguns autores afirmam que entre 10 a 10^2 células podem ser suficientes para causar a doença (Strachan *et al.*, 2001; Sippy *et al.*, 2003). O período de incubação varia entre 18 a 24 horas após contaminação e a duração da doença pode ser de alguns dias (Cliver, 1990).

O leite *in natura* é responsável por surtos de toxinfecções enterohemorrágicas e enteroinvasivas em humanos (Germano & Germano, 2001). *Escherichia coli* O157:H7 é considerada um importante patógeno responsável por toxinfecções alimentares relacionadas ao consumo de leite *in natura* (Conedera *et al.*, 2004). Estudos epidemiológicos prévios revelam o rebanho bovino como o principal reservatório deste microrganismo, porém caprinos, ovinos e eqüinos podem ser considerados importantes reservatórios (Dontorou *et al.*, 2004; Jo *et al.*, 2004; Marek *et al.*, 2004).

Em 1982, *E. coli* O157:H7 foi reconhecida como patogênica a humanos após ter sido implicada como a principal causa de colite hemorrágica em dois surtos ocorridos nos Estados Unidos (Dontorou *et al.*, 2004). Desde então, mais de 30 países notificaram surtos causados por *E. coli* O157:H7 (Jo *et al.*, 2004). *E. coli* sorotipo O157:H7, produtoras de verocitotoxinas, têm sido associadas com Síndrome Urêmica Hemolítica, colite e diarreia hemorrágicas (Dontorou *et al.*, 2004; Jo *et al.*, 2004). Este sorotipo de *E. coli* causou inúmeros surtos, sendo considerado um dos mais relevantes patógenos em saúde pública, bem como, a mais severa zoonose de ocorrência mundial (Dontorou *et al.*, 2004).

2.11 Métodos convencionais para detecção de coliformes totais, fecais e *Escherichia coli*

A maioria dos métodos usados na detecção de coliformes totais, coliformes fecais e *E. coli* são métodos de enumeração baseados na fermentação da lactose. A técnica do Número Mais Provável (NMP), também conhecida como técnica dos tubos múltiplos, é um método estatístico comumente utilizado pelos laboratórios de microbiologia para estimar a contagem de coliformes totais, coliformes fecais e *E. coli* em alimentos. A partir desta técnica são obtidas informações através de testes presuntivos e testes confirmatórios. Neste método, diluições seriadas decimais são inoculadas em grupos de três ou cinco tubos, contendo caldo Lauril Sulfato Triptose suplementado com 4-metil-umbeliferil- β -D-glucuronídeo (LST-MUG). Analisando o número de tubos com fermentação da lactose (produção de gás),

realiza-se uma combinação de resultados positivos para ser relacionada com tabelas específicas de NMP para estimar o número de microrganismos presentes nas amostras. Contudo, este teste apresenta desvantagens como o tempo requerido para realização das etapas de identificação dos microrganismos e quantidade de vidraria utilizada (Leclercq *et al.*, 2002; USFDA, 2002).

Outro método é a inoculação em meios sólidos, como o ágar Vermelho Violeta Bile Lactose (Violet Red Bile Lactose Agar - VRBA), o qual contém um indicador de pH que formará colônias de coloração rosa intenso indicando a fermentação da lactose. As vantagens da utilização do VRBA estão relacionadas com o tempo de confirmação dos resultados (Silva *et al.*, 1997; USFDA, 2002). Porém, este meio sólido também apresenta suas desvantagens como a necessidade de incubação a $47 \pm 2^{\circ}\text{C}$ para evitar danos as bactérias (Leclercq *et al.*, 2002).

As membranas de filtração também podem ser utilizadas na detecção destes microrganismos, medindo a formação de aldeído devido à fermentação da lactose (USFDA, 2002). O princípio é o mesmo utilizado na técnica do NMP, baseando-se na filtração da amostra em membrana filtrante com grade hidrofóbica e transferência para ágar seletivo e diferencial. Para contagem de *E. coli*, deve-se transferir a membrana para um segundo meio de cultura contendo MUG. As vantagens inerentes a este método estão relacionadas à eliminação das diluições, melhor visualização das colônias, utilização de maiores volumes, menor tempo para confirmação. Entretanto,

também apresenta algumas desvantagens tais como o custo elevado das membranas filtrantes (Silva *et al.*, 1997; USFDA, 2002).

2.12 Bactérias relacionadas a doenças transmitidas por alimentos

2.12.1 *Salmonella* sp.

O gênero *Salmonella* pertencente à família das *Enterobacteriaceae* dentro da subclasse Delta das Proteobactérias, compreende bastonetes Gram-negativos não produtores de esporos. É altamente relacionada aos gêneros *Escherichia*, *Shigella* e *Citrobacter* baseado na similaridade do ADN (Cohen *et al.*, 1996). São anaeróbios facultativos, produzem gás a partir da glicose (exceto *S. typhi*) e a maioria é capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. A maioria é móvel, através de flagelos peritríquios. As *Salmonella* multiplicam-se em temperaturas entre 7 a 50°C. A temperatura ideal para a multiplicação deste microrganismo é de 37°C (Forsythe, 2002).

Ainda não existe um consenso definitivo sobre a classificação das salmonelas. Baseando-se na hibridização ADN/ADN foi proposto que o gênero *Salmonella* continha uma única espécie, a *S. enterica*, conhecida anteriormente como *S. cholerae-suis*. Estudos mais recentes afirmam a existência de duas espécies de *Salmonella*: a *S. enterica* (dividida em oito subespécies) e a *S. bongori*. A nomenclatura dos sorovares pertencentes a *S. enterica* subespécie *enterica* são relacionados com o local onde foram isolados

inicialmente (Popoff *et al.*, 2004). A imensa maioria dos isolamentos realizados em humanos pertence a *S. enterica* subespécie *enterica*, a qual inclui cerca de 60% dos mais de 2.300 sorovares conhecidos (Pignato *et al.*, 1995; Tan & Shelef, 1999; Forsythe, 2002). Dentre os microrganismos, que podem ser encontrados no leite, considera-se também a *Salmonella* Enteritidis um dos mais relevantes (Leite *et al.*, 2002).

Toxinfecções causadas pelo gênero *Salmonella* são a segunda doença de maior prevalência no mundo causada pela ingestão de alimentos contaminados, sendo o consumo de carne, leite e seus derivados os mais implicados nos surtos (Favrin *et al.*, 2003). Muitos países relatam surtos de toxinfecções alimentares causadas por *Salmonella* sp. em humanos. Estima-se que estes relatos de surtos representem apenas 1 a 10% da real incidência da doença. Nos Estados Unidos, entre 1973 e 1987, os produtos derivados do leite foram responsáveis por 2,8% dos surtos de salmonelose (Franco *et al.*, 2000). A Divisão de Vigilância Sanitária do Estado do Rio Grande do Sul (RS), no Brasil, relatou alta incidência de surtos de toxinfecções alimentares no final da década de 90. Entre 1997 e 1999, foram investigados 323 surtos ocorridos no RS relacionados ao consumo de alimentos contaminados, sendo que deste total, 116 (35,7%) foram causados por *Salmonella* sp. (Costalunga & Tondo, 2002).

O período de incubação médio da salmonelose é de 18 horas. Sintomas como diarreia, náusea, vômito, dor abdominal, febre e cefaléia podem manifestar-se entre 6 a 72 horas após a ingestão de alimentos contaminados com esta enterobactéria (Germano & Germano, 2001;

Forsythe, 2002). Este quadro clínico pode estender-se durante dois a sete dias, na maioria dos casos, dependendo da dose infectante ingerida, do sorovar envolvido e das condições do hospedeiro. Alguns autores sugerem que a dose infectante da *Salmonella* sp. seja de 10^8 a 10^9 células, porém estudos retrospectivos demonstraram doses mais baixas (20 até 10^6 células) causando a doença. O número de células capaz de causar a doença vai depender do tipo de alimento e da linhagem de *Salmonella* sp. envolvidos no surto (Forsythe, 2002).

2.12.1.1 Detecção de *Salmonella* sp.

A técnica de detecção de *Salmonella* sp. em alimentos é o método convencional de isolamento bacteriano e geralmente são necessários de quatro a seis dias para a sua total realização (Pignato *et al.*, 1995; Favrin *et al.*, 2003). O método recomendado para detecção, embora apresente algumas variações na seleção dos meios de cultura e forma de preparação das amostras, segue basicamente quatro etapas que podem ser aplicadas a qualquer tipo de alimento. A etapa conhecida como pré-enriquecimento permite a recuperação das células danificadas. As etapas de enriquecimento seletivo em meio líquido e de isolamento diferencial em meio sólido permitem o crescimento de *Salmonella* sp. e a inibição do crescimento de outros microrganismos. Por último, a etapa de confirmação dos isolados através de provas bioquímicas e sorológicas. Atualmente, outros métodos de detecção deste microrganismo estão sendo empregados por serem mais rápidos e menos laboriosos como a provas que utilizam o ADN (Pignato *et al.*, 1995). Outras provas baseiam-se na

tecnologia de métodos de ensaio imuno-enzimático (ELISA). Entretanto, a maioria dos métodos rápidos disponíveis para a detecção de *Salmonella* sp. são pouco sensíveis, caros e necessitam alto grau de habilidade e tecnologia para sua realização (Favrin *et al.*, 2003).

Muitas vezes o isolamento de *Salmonella* sp. em amostras de alimentos torna-se difícil, pois este microrganismo pode estar presente em número baixo nas amostras. A recuperação e o crescimento de *Salmonella* sp. podem ser inibidos por metabólitos produzidos por outras bactérias, pela depleção de nutrientes, pelo baixo potencial de oxidação-redução e por mudanças no pH. As *Salmonella* sp. podem entrar em uma fase estacionária de crescimento antes que números detectáveis possam ser alcançados devido à alta concentração de outras bactérias Gram-negativas. As células deste microrganismo podem estar danificadas pelo tipo de processamento que o alimento é submetido ou por fatores intrínsecos do próprio alimento. Devido a estas razões, as fases de pré-enriquecimento e cultivo em meios de cultura com agentes seletivos, se fazem necessárias para proporcionar um maior probabilidade de detecção nos alimentos (Baylis *et al.*, 2000).

2.13.2 *Brucella* sp.

A brucelose é uma doença infecto-contagiosa causada por bactérias do gênero *Brucella*. Os membros deste gênero são bactérias Gram-negativas, imóveis, não formadoras de esporos com morfologia de cocobacilos, intracelulares facultativos e podem apresentar-se em cultivos primários com morfologia colonial lisa ou rugosa (Rojas *et al.*, 2001; Ocholi *et al.*, 2004).

Possuem requerimentos fastidiosos para seu crescimento, pois a maioria requer meios complexos enriquecidos com soro e de atmosfera enriquecida com 5 a 10% de dióxido de carbono (Alton *et al.*, 1988; Ocholi *et al.*, 2004).

Considera-se que o gênero *Brucella* contenha seis espécies: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* e *B. neotomae* subdividas dentro de biovars ou biotipos (Moreno *et al.*, 2002; Zygmunt *et al.*, 2002; Ko & Splitter, 2003; Ocholi *et al.*, 2004). A estas seis espécies podem ser incluídas as espécies isoladas de mamíferos marinhos tais como cetáceos e pinípedes (Halling & Boyle, 2002; Moreno *et al.*, 2002; Ko & Splitter, 2003). Atualmente, duas novas espécies estão sendo propostas, *B. cetaceae* e *B. pinnipediae*, devido ao isolamento nestes mamíferos marinhos (Cloeckert *et al.*, 2003; Vizcaíno *et al.*, 2004).

A brucelose é considerada como a zoonose mais importante com ocorrência mundial. Esta afirmação é apoiada também por órgãos internacionais como a Organização de Alimentos e Agricultura (Food and Agriculture Organization - FAO), a Organização Mundial da Saúde (World Health Organization - WHO) e o Escritório Internacional de Epizootias (Office International des Epizooties - OIE) (Poester *et al.*, 2002).

As bactérias deste gênero, apesar de permanecerem no ambiente, não se multiplicam no mesmo. Elas são medianamente sensíveis aos fatores ambientais, entretanto a resistência diminui quando aumentam a temperatura e a luz solar direta ou diminui a umidade. A pasteurização é um método eficiente de destruição deste microrganismo, assim como as radiações ionizantes (Brasil, 2003).

O gênero *Brucella* produz infecção característica nos animais, podendo infectar o homem. Sendo uma zoonose de distribuição universal, acarreta problemas sanitários importantes e prejuízos econômicos vultosos devido a abortos, diminuição na produção leiteira e infertilidade nos animais (Rojas *et al.*, 2001; Arellano-Reynoso *et al.*, 2004). A maioria dos casos de brucelose bovina é causada por *B. abortus* e *B. suis*, porém algumas vezes *B. melitensis* pode estar envolvida como agente etiológico (Luna-Martínez & Mejía-Terán, 2002). As principais manifestações nos animais, como abortos, nascimentos prematuros, esterilidade, entre outros sintomas, contribuem para uma considerável baixa na produção de alimentos. A brucelose é responsável pela diminuição de 25% da produção de leite, pela diminuição na produção de terneiros em 15% e uma em cada cinco fêmeas bovinas infectadas aborta ou torna-se permanentemente estéril (Brasil_c, 2003).

Dentre as espécies de *Brucella*, *B. melitensis* tem sido considerada a mais patogênica ao homem, embora alguns autores demonstrem que *B. abortus* produza doença com intensidade semelhante (Soberón-Mobarak *et al.*, 2000; Ocholi *et al.*, 2004). Por afetar grupos profissionais específicos, ocupa um lugar de destaque em saúde ocupacional. Estão incluídos nestes grupos os médicos veterinários, funcionários de frigoríficos e de granjas leiteiras, além de pessoas que trabalham em laboratórios que manipulem materiais contaminados com este microrganismo (Salgado *et al.*, 1995; Metin *et al.*, 2001; Poester *et al.*, 2002).

A brucelose bovina está disseminada através do Brasil e, no Estado do Rio Grande do Sul, como resultado de programa de vacinação bem

sucedido, a prevalência da doença passou de 2,0%, em 1977, para 0,3% em 1986 (Poester *et al.*, 2002). A prevalência de brucelose é de 2,49% do rebanho bovino brasileiro com sorologia positiva e 2,04% apresenta resultados suspeitos (Langoni *et al.*, 2000).

A sintomatologia em humanos é bastante variável. De modo geral, a manifestação da brucelose é aguda e os sinais clínicos mais comuns são: febre, suores noturnos e astenia. Ainda são relatados outros sinais como insônia, febre intermitente, anorexia, cefaléia, artralgia, dores generalizadas, irritação, nervosismo, depressão. Nos exames clínicos complementares salientam-se adenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia (Metin *et al.*, 2001; Leclerc *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2002; Ko & Splitter, 2003).

A brucelose está incluída no contexto das doenças transmitidas por alimentos. O consumo de leite e seus derivados, não pasteurizados, constituem uma via importante de transmissão de *Brucella* sp. aos humanos (Metin *et al.*, 2001). Entretanto, ainda há possibilidade de inalação de aerossóis e pelo contato com conteúdo uterino de animais infectados. Após a penetração na mucosa epitelial, a bactéria é transportada, livre ou dentro dos macrófagos, até os linfonodos regionais. As células de *Brucella* sp. podem ficar cronicamente alojadas nos linfonodos supramamários e glândulas mamárias em 80% dos animais infectados. Estes animais podem excretar o patógeno em seus fluidos corporais, tais como o leite, mesmo que o período agudo da doença tenha acabado e os animais possam estar sem sinais da doença (Leal-Klevezas *et al.*, 1995). A mastite brucélica é uma doença crônica e sem

sinais clínicos aparentes e as fêmeas bovinas podem excretar um grande número de células viáveis de *Brucella* sp. através do leite durante meses até anos após a infecção (Langoni *et al.*, 2000).

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (Brasil_c, 2003), instituído no ano de 2001, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento tem com o objetivo diminuir o impacto negativo destas zoonoses na saúde comunitária e promover a competitividade da pecuária nacional. Este programa instituiu a vacinação obrigatória contra brucelose bovina e bubalina em todo o território nacional e definiu uma estratégia de certificação de propriedades livres ou monitoradas, onde estas enfermidades serão controladas com rigor. No Brasil, foram definidos como testes oficiais: Teste do Antígeno Acidificado Tamponado e Teste do Anel em Leite, como testes de triagem; Teste do 2-Mercaptoetanol e Teste da Fixação do Complemento, como testes confirmatórios (Brasil_c, 2003).

2.13.2.1 Detecção de *Brucella* sp.

2.13.2.1.1 Isolamento bacteriano

Um componente importante no diagnóstico de brucelose é o isolamento e a caracterização do seu agente etiológico (Romero *et al.*, 1995). A caracterização microbiológica do agente isolado é considerada o padrão ouro para o diagnóstico. O meio seletivo comumente utilizado no isolamento primário de *Brucella* sp. é denominado de ágar Farrel. Este meio inclui ágar nutriente, 1% de glicose, 5% de soro sanguíneo e alguns antimicrobianos

(vancomimicina, polimixina B, bacitracina, nistatina, ácido nalidíxico) (Alton *et al.*, 1988). Entretanto, este tipo de diagnóstico apresenta inúmeras desvantagens como o tempo de cultura de *Brucella* sp. (que pode ser de até 30 dias), tipo de material utilizado para o isolamento e a eliminação intermitente do agente. Os testes utilizados para caracterização desta bactéria são realizados com a utilização de bacteriófagos e aglutinação com soros específicos e devem ser realizados por equipe qualificada (Bricker, 2002). A *Brucella* é um microrganismo de classe III e o material deve ser manipulado dentro das regras de segurança microbiológica, sendo realizados por poucos laboratórios (Hamdy & Amin, 2002; Brasil, 2003). O agente etiológico da brucelose pode ser isolado a partir do sangue, membranas fetais, fetos abortados, conteúdo estomacal dos fetos, carcaças animais, sêmen e do leite, através de métodos diretos e sorológicos (Alton *et al.*, 1988).

2.13.2.1.2 Detecção sorológica

Os testes sorológicos têm papel importante na detecção de bruceloses em rebanhos devido à eliminação intermitente da bactéria, da praticidade da coleta e do tempo para confirmação do diagnóstico. O diagnóstico de brucelose inclui a sorologia do rebanho ou do indivíduo, a qual tem sido utilizada como ferramenta nos programas de controle e erradicação da brucelose por diversos países (Romero *et al.*, 2001). Existem diversos testes para o diagnóstico de brucelose bovina que variam quanto a sua especificidade e sensibilidade. Dentre os testes podem-se citar: Antígeno Acidificado Tamponado, Rivanol, Fixação do Complemento, Ensaio

Imunoenzimático (ELISA), 2-Mercaptoetanol e o Teste do Anel em Leite (TAL) (Alton *et al.*, 1988). No caso dos rebanhos, o monitoramento inicial deve ser realizado através de testes com baixo custo, de fácil realização, rápidos, alta sensibilidade e especificidade. A maioria dos testes baseia-se na aglutinação de antígenos com anticorpos específicos presentes em amostras de animais infectados (Bricker, 2002).

A necessidade do desenvolvimento de testes para detecção de *Brucella* sp. em leite foi uma alternativa encontrada para driblar os empecilhos da cultura deste microrganismo. O TAL é o teste sorológico mais utilizado para monitorar rebanhos leiteiros com suspeita de brucelose (Alton *et al.*, 1988). Uma das vantagens deste teste é seu custo relativamente baixo quando comparado aos outros testes sorológicos, além da possibilidade de realização a campo sem a necessidade de estrutura laboratorial (Brasil, 2003). A especificidade deste teste em leite tem sido questionada quando a prevalência é baixa, embora sua sensibilidade seja valorizada (Romero *et al.*, 1995; Hamdy & Amin, 2002). Porém, se o teste for realizado no dia da coleta ou o leite for proveniente de fêmeas bovinas com mastite há a possibilidade de surgirem resultados falso-positivos. A presença de anticorpos nem sempre significa um caso de brucelose, pois animais vacinados podem apresentar resposta imune persistente pós-vacinal. Além disto, pode ocorrer reação cruzada com outras bactérias Gram-negativas como *Yersinia enterocolitica* O:9 (Rijpens *et al.*, 1996; Hamdy & Amin, 2002).

O TAL é fundamentado na adesão dos glóbulos de gordura com os anticorpos, que sobem à superfície da amostra de leite e ficam concentrados

na camada de gordura após um período de refrigeração. O mecanismo do TAL envolve a adsorção de aglutininas específicas nos glóbulos de gordura que servem de superfície para reação do antígeno com o anticorpo (Patterson & Deyoe, 1976). Em amostras positivas, quando o antígeno inativado de *B. abortus* corado com hematoxilina for adicionado, irá ligar-se aos anticorpos e aos glóbulos de gordura, formando um anel de coloração roxa sobre uma coluna de leite de cor mais clara ou branca (Nielsen *et al.*, 1996). O resultado positivo do TAL envolve a aglutinação dos glóbulos de gordura com os anticorpos específicos, principalmente imunoglobulina A (IgA) e em menor grau imunoglobulina G (IgG) (Sutra *et al.*, 1986). A resposta sorológica pós-infecção ou vacinação é produzida a partir da primeira semana, aparecendo inicialmente o isotipo IgM e logo após o IgG₁. As respostas de IgG₂ e IgA aparecem mais tarde, aumentam gradativamente, mas permanecem em níveis baixos (Brasil, 2003).

O TAL pode ser empregado na análise do rebanho ou do indivíduo, detectando a doença antes que ocorra disseminação do agente, pois pode detectar a infecção na fase inicial (Nicolletti & Burch, 1969). Para a análise do rebanho, utiliza-se o leite de conjunto ou de mistura (mistura do leite produzido por vários animais) não afetando a sensibilidade do teste, proporcionando uma análise de diversos animais ao mesmo tempo e diminuindo os custos da análise. O TAL, realizado em leite de mistura, apresenta alta sensibilidade para detecção de rebanhos leiteiros contaminados com *Brucella abortus*. Este teste é capaz de identificar rebanhos leiteiros infectados (mesmo quando a prevalência de brucelose for baixa) e monitorar os rebanhos não-infectados

(Rolfe & Sykes, 1987). Entretanto, existe um fator de correção, que deve ser respeitado, relacionando o número de animais envolvidos na mistura com o volume de antígeno para que não ocorra um diagnóstico equivocado (Alton *et al.*, 1988).

A utilização de amostras de leite para realização dos testes sorológicos tem sua justificativa no que se refere à facilidade da coleta do material, na economia de tempo e no fato de não causar estresses desnecessários aos animais e coletadores como a utilização de instrumentos pérfuro-cortantes como agulhas (Nielsen *et al.*, 1996). No leite existem níveis de imunoglobulinas comparáveis aos níveis apresentados no sangue e no soro. Por esta razão, é válido assumir que as secreções mamárias refletem o estado imunológico dos animais (Vanzini *et al.*, 1998).

Estudos compararam o desempenho do TAL e do ELISA para diagnóstico de brucelose em amostras de leite coletadas de rebanhos leiteiros da Província de Ñuble, no Chile. Houve uma concordância entre as duas técnicas comparadas para detecção de *Brucella abortus*. Nesta comparação, foram obtidos os mesmos resultados. Todas as amostras classificadas como positivas no TAL tiveram a mesma classificação no ELISA (Lopez *et al.*, 1998). Entretanto, alguns autores afirmam que a utilização do ELISA para detecção de anticorpos de *B. abortus* em leite bovino apresenta uma maior sensibilidade quando comparado ao TAL (Boraker *et al.*, 1981; Nielsen *et al.*, 1996). Contudo, o ELISA também não é capaz de diferenciar animais vacinados de animais naturalmente infectados (Nielsen *et al.*, 1996). Este resultado está em desacordo com os apresentados por Boraker *et al.* (1981) onde os autores

afirmavam que o ELISA é capaz de diferenciar amostras vacinais de amostras de animais infectados naturalmente.

Outros métodos de diagnóstico com resultados promissores para o diagnóstico de brucelose estão sendo propostos (Brasil, 2003). A utilização do teste de polarização fluorescente homogênea foi sugerida na detecção de anticorpos de *B. abortus* em leite. A prova baseia-se no movimento ao acaso de uma molécula em solução. O antígeno utilizado neste teste é preparado com polisacarídeo O (cadeia O do lipopolissacarídeo) de *B. abortus* conjugado com isotiocianato de fluoresceína. Este teste apresentou alta sensibilidade (100%) e especificidade (99,1%) e foi capaz de diferenciar animais vacinados com a cepa 19 de *B. abortus* dos animais infectados naturalmente com este patógeno. Este método tem sido pouco utilizado até o momento devido ao alto custo inicial para sua implantação (Vanzini *et al.*, 2002).

A reação da polimerase em cadeia também tem sido sugerida com um método disponível para detecção de ADN de *Brucella* em amostras de leite (Romero *et al.*, 1995). Assim como o teste de hipersensibilidade tardia semelhante ao teste da tuberculina. Neste teste, uma área de três centímetros quadrados é escarificada na região cervical bovina onde é injetado por via subcutânea 0,1mL de um alérgeno (brucelina). A leitura é feita após 48 horas e qualquer aumento de volume na região é interpretado como resultado positivo (Bercovich & Tearlaak, 1990).

3. MATERIAS E MÉTODOS

As amostras de leite bovino de mistura foram coletadas entre novembro de 2003 e agosto de 2004. Estas amostras foram coletadas diretamente de 50 pequenas e médias propriedades, com média de 11 animais, localizados nos municípios de Esteio, Glorinha, Gravataí, Sapucaia do Sul e Viamão, no Rio Grande do Sul (RS). Estas propriedades fornecem leite *in natura* para uma indústria de beneficiamento de leite na região metropolitana de Porto Alegre, no RS, com capacidade de beneficiar cerca de 40.000 litros de leite por dia. Oito amostras (referentes a cada dia de coleta) foram coletadas diretamente na indústria de beneficiamento após tratamento térmico através de pasteurização ou autoclavagem.

3.1 Amostragem

Foram coletadas alíquotas com, aproximadamente, 50mL de cada propriedade, em frascos de vidro âmbar esterilizados com tampa rosca, com auxílio de conchas metálicas esterilizadas, sendo realizadas, no mínimo, três coletas em períodos diferentes em cada uma delas. As amostras foram

rotuladas, identificadas e transportadas em condições isotérmicas ($\pm 7^{\circ}\text{C}$), sendo imediatamente processadas. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Para a detecção de coliformes totais, coliformes fecais, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. foram utilizadas 116 amostras de 42 propriedades leiteiras. Para detecção sorológica de *Brucella* sp. foram utilizadas as 116 amostras acrescidas de 65 amostras fornecidas pela indústria de beneficiamento. As amostras incluídas eram provenientes das mesmas propriedades, e de oito outras propriedades que não entraram na detecção dos microrganismos descritos anteriormente. Para detecção de bactérias mesófilas e psicrotróficas foram utilizadas 29 amostras de 21 propriedades (Tabela 4).

TABELA 4: Tipos de microrganismos pesquisados, número de amostras e número de propriedades.

Microrganismo	Número Amostras	Número Propriedades
Coliformes totais	116	42
Coliformes fecais	116	42
<i>Escherichia coli</i>	116	42
<i>Salmonella</i> sp.	116	42
Bactérias mesófilas	29	21
Bactérias psicrotróficas	29	21
<i>Brucella</i> sp.	181	50

Oito amostras (referentes a cada dia de coleta) foram coletadas diretamente na indústria de beneficiamento após tratamento térmico através de pasteurização ou autoclavagem, sendo submetidas à detecção de coliformes totais, coliformes fecais, *E. coli*, *Salmonella* sp. e bactérias mesófilas e psicrotófica.

3.2 Diluição inicial das amostras

Após diluição inicial de 1:10, adicionando-se 25mL de cada amostra de leite em 225mL de água peptonada tamponada (APT - Merck - Alemanha) a 0,1%, foi realizada a diluição seriada decimal de 10^{-2} a 10^{-5} das amostras em tubos contendo 9mL de APT a 0,1%. A partir destas diluições foi realizada a detecção de coliformes totais, coliformes fecais, presença de *E. coli*, bactérias mesófilas e psicrotróficas. Após semeadura em meio sólido apropriado. Foram selecionadas as placas que continham entre 25 a 250 colônias destes microrganismos, para determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC), as quais foram contadas com auxílio de um contador de colônias.

3.3. Contagem de coliformes totais

Para a detecção destes microrganismos foi utilizado o método proposto pelo USFDA (2002) com modificações. Alíquotas de 1mL das diluições, citadas em 3.2, foram semeadas, pela técnica de profundidade, em placas onde foram adicionados 20mL de ágar Vermelho Violeta Bile Lactose (Violet Red Bile Lactose Agar - VRBA - Merck - Alemanha) dissolvido e

resfriado a 45°C com posterior homogeneização. Após solidificação, uma sobrecamada (5mL) do mesmo meio foi adicionada. As placas foram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas.

3.3.1 Presença de coliformes fecais

A presença de coliformes fecais foi investigada semeando 3 colônias características (rosa intenso com ou sem presença de precipitado de sais biliares), proveniente das placas contendo ágar VRBA, com alça de platina, em tubos contendo 10mL de caldo EC (Difco - EUA). Foram considerados positivos os tubos que evidenciaram a presença de gás no tubo de Durhan após 24 a 48 horas em banho-maria a 45°C. A partir dos tubos de caldo EC positivos, foram semeadas alíquotas, pela técnica de esgotamento, em placas contendo ágar MacConkey (Merck - Alemanha) e incubadas a 37°C por 24 a 48 horas.

3.3.2 Confirmação de *Escherichia coli*

As placas de ágar MacConkey (Merck - Alemanha) que apresentaram colônias circulares de cor rosa intenso (lactose positiva) foram submetidas às seguintes provas bioquímicas para confirmação de *E. coli*: indol, vermelho de metila, Voges-Proskauer e citrato (Citrato de Simmons - Biobrás - Brasil). Os resultados foram interpretados segundo USFDA (2002).

3.4 Isolamento de *Salmonella* sp.

Para a detecção deste microrganismo foi utilizado o método proposto pelo USFDA (2003) com modificações.

3.4.1 Pré-enriquecimento em meio não seletivo

As diluições iniciais de 1:10 de cada amostra, citadas em 3.2, foram incubadas a 37°C por 24 horas e utilizadas nas demais etapas.

3.4.2 Enriquecimento seletivo em meio líquido

Alíquotas de 1 e 0,1mL, de cada amostra, foram inoculadas em tubos contendo, respectivamente, 9mL de caldo Base Tetrionato (TT - Benton-Dickinson - EUA) e 9,9mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV - Merck - Alemanha), e incubadas em banho-maria a 42°C por 24 horas.

3.4.3 Isolamento em meio sólido seletivo

De cada tubo de enriquecimento seletivo foram semeadas alíquotas, pela técnica do esgotamento, na superfície dos seguintes meios seletivos: ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD - Merck - Alemanha) e ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (VB - Merck - Alemanha) e incubadas a 37°C por 24 horas. Decorrido este período, as placas foram analisadas quanto à característica das colônias em cada meio segundo especificações dos fabricantes.

3.4.4 Identificação das colônias

Colônias suspeitas nos meios sólidos seletivos foram isoladas em ágar Triptona de Soja (TSA - Oxoid - Inglaterra) e incubadas a 37°C por 24h. As colônias puras foram submetidas a testes de triagem (ítem 3.4.5). Todos isolados bacterianos que apresentaram perfil semelhante ao de *Salmonella* sp., nos meios de triagem, foram submetidas a provas bioquímicas fundamentais para caracterização. Os testes de triagem e bioquímicos necessários foram interpretados segundo os fabricantes.

3.4.5 Testes de triagem bioquímica

Foram utilizados o ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI - Biobrás - Brasil) e o ágar Ferro Lisina (LIA - Biobrás) para a triagem das colônias suspeitas. As colônias puras presuntivas de *Salmonella* sp. foram inoculadas com agulha, em tubos, contendo 6mL de TSI e 6mL de LIA. Cada tubo foi inoculado, com agulha reta, através de perfuração até a base e estriamento na inclinação, conforme MacFaddin (2001) e incubadas a 37°C por 24 horas. Nos tubos com LIA, foram considerados positivos aqueles que apresentaram base e inclinação alcalinas (cor púrpura) com presença de ácido sulfídrico. Nos tubos com TSI, foram considerados positivos aqueles que apresentaram base ácida (cor amarela) e inclinação alcalina (cor vermelha) e com presença de ácido sulfídrico (USFDA, 2003).

3.4.6 Provas bioquímicas

As seguintes provas bioquímicas foram realizadas: citrato (Citrato de Simmons - Biobrás - Brasil), Fenilalanina desaminase (Ágar Fenilalanina - Benton Dickinson - EUA), o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (caldo ONPG - Apêndice), SIM (meio SIM - Biobrás - Brasil) e urease (Caldo Uréia - Difco - EUA). Os resultados foram interpretados conforme USFDA (2003) e Silva *et al.* (1997).

3.5 Contagem de microrganismos mesófilos

Para contagem destes microrganismos foi seguido o método proposto por Silva *et al.* (1997) com modificações, em 29 amostras referentes a 21 propriedades. Foram utilizadas as diluições de 10^{-2} e 10^{-3} para esta contagem. Alíquotas de 1mL foram inoculadas em duplicata, pela técnica de profundidade, em placas onde foi adicionado 20mL de Ágar Padrão para Contagem (PCA - Oxoid - Inglaterra), sendo imediatamente homogeneizadas e incubadas a 37°C por 48 horas.

3.6 Contagem de microrganismos psicotróficos

Para contagem destes microrganismos foi seguido o método proposto por Silva *et al.* (1997) com modificações, em 29 amostras referentes a 21 propriedades. Foram utilizadas as diluições de 10^{-2} e 10^{-3} para esta contagem. Alíquotas de 100 μ L foram inoculadas em duplicata, com auxílio de

alça de Drigalski esterilizada, na superfície de placas contendo PCA e incubadas a 7°C por 10 dias.

3.7 Detecção sorológica de *Brucella* sp.

Foi realizado o teste sorológico para pesquisa de anticorpos específicos de *Brucella* sp. no leite bovino conhecido como TAL, segundo o método descrito por Alton *et al.* (1988) com modificações.

Após 24 horas de armazenamento, em temperatura de refrigeração, foram retiradas alíquotas de 1mL de cada amostra, após homogeneização, e colocadas em tubos de vidro com tampa. Nestes tubos foram adicionados 30µL de antígeno inativado de *Brucella abortus* (TECPAR - Brasil) e 30µL de formaldeído a 1%, homogeneizados manualmente por inversão e incubados a 37°C por 1h. Foram considerados positivos os tubos que apresentaram anel de gordura azul e coluna de leite branca.

3.10 Análise estatística

Os dados microbiológicos foram analisados utilizando valores em logaritmo. Foram realizadas análises da variância e o Teste de t de Student usando o programa SPSS/PC versão 8.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, USA), pelo Núcleo de Assessoria Estatística do Laboratório de Estatística na UFRGS.

Para o tipo de armazenamento foi utilizada a Análise de Variância Oneway (ANOVA) e para o tipo de ordenha foi utilizado o Teste t de Student. A variável resposta foi a contagem de coliformes totais no leite.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Contagem de coliformes totais e presença de *Escherichia coli*

Todas amostras analisadas evidenciaram a presença de coliformes totais (n= 116). Nas Tabelas 5 e 6 são apresentadas características como tipo de ordenha (mecânica ou manual), armazenamento (congelador a -20°C, resfriador, geladeira ou tanque de expansão) e médias das contagens dos coliformes totais em cada propriedade ao longo das coletas.

Em algumas propriedades não foi possível realizar as três coletas previstas, pois estas propriedades foram retiradas da lista de fornecedores de leite da indústria de beneficiamento.

Todas propriedades apresentaram média de contagem de coliformes totais superior ou igual a 4 log.ufc.mL⁻¹, exceto a propriedade 31 que apresentou contagem igual a 3,86 log.ufc.mL⁻¹. A contagem de coliformes totais

TABELA 5: Contagem de coliformes totais (log.ufc.mL⁻¹) na coleta manual, média das contagens e armazenamento das amostras de leite.

Propriedade	Tipo de Armazenamento	Datas das Coletas								Média
		25/nov	06/jan ^a	20/jan ^a	22/mar ^a	10/maio	05/jul ^c	19/jul	02/ago ^c	
1	congelador -20°C	-	4,28	5,23	5,39	-	-	-	≥4e	≥4e
2	congelador -20°C	-	4,13	5,1	-	-	-	-	≥4e	≥4e
3	congelador -20°C	4,79	-	-	5,27	-	-	-	≥4e	≥4e
4	congelador -20°C	-	5,15	5,05	-	-	-	-	≥4e	≥4e
5	congelador -20°C	-	4,35	5,14	-	-	-	-	≥4e	≥4e
6	congelador -20°C	5,37	4,47	4,14	5,42	-	-	-	-	4,85
7	congelador -20°C	-	-	-	-	5,45	3,77	2,86	-	4,02
8	congelador -20°C	5,36	4,31	-	5,39	-	-	-	-	5,02
9	congelador -20°C	3,79	3,94	-	4,47	-	-	-	-	4,06
10	congelador -20°C	5,3	5,33	-	5,05	-	-	-	-	5,22
11	congelador -20°C	-	-	4,97	-	-	-	-	-	4,97
12	congelador -20°C	4,14	-	-	5,03	-	-	-	≥4e	≥4e
13	geladeira	4,27	5,23	4,33	-	-	-	-	-	4,61
14	geladeira	-	-	-	-	3,96	-	-	-	3,96
15	geladeira	-	-	-	-	4,11	-	-	-	4,11
16	geladeira	-	-	-	-	5,32	3,38	4,32	-	4,34
17	resfriador	-	4,34	-	-	-	-	-	-	4,34
18	resfriador	3,03	5,16	-	4,96	-	-	-	-	4,38
19	resfriador	3,05	-	5,06	5,23	-	-	-	-	4,44
20	resfriador	-	-	-	-	-	≥4e	5,82	≥4e	≥4e
Média de contagem diária		4,34	4,60	4,87	5,13	4,71	≥4e	4,33	≥4e	

- Amostras não coletadas nestes dias

^aEm negrito propriedades com onfirmção de *Escherichia coli*; Letra 'e' significa contagem estimada

TABELA 6: Contagem de coliformes totais (log.ufc.mL⁻¹) na coleta mecânica, média das contagens e armazenamento das amostras de leite de mistura.

Propriedade	Tipo de Armazenamento	Datas das Coletas								Média
		25/nov	06/jan'	20/jan ^a	22/mar ^a	10/maio ^a	05/jul	19/jul	02/ago	
21	congelador -20°C	≥4e	5,24	-	5,2	-	-	-	-	≥4e
22	congelador -20°C	-	-	-	-	-	≥4e	3,55	≥4e	≥4e
23	congelador -20°C	3,96	4,04	-	-	-	-	-	≥4e	≥4e
24	congelador -20°C	-	-	5,33	-	-	-	-	≥4e	≥4e
25	congelador -20°C	-	-	-	-	-	≥4e	3,55	-	≥4e
26	congelador -20°C	3,32	4,31	-	4,42	-	-	-	-	4,01
27	congelador -20°C	3,2	5,31	-	5,31	-	-	-	-	4,60
28	congelador -20°C	-	-	-	-	5,51	3,56	4,84	-	4,63
29	congelador -20°C	6,05	5,31	5,32	5,12	-	-	-	-	5,45
30	congelador -20°C	-	-	4,29	-	-	-	-	≥4e	≥4e
31	resfriador	-	-	-	-	4,52	3,42	3,66	-	3,86
32	resfriador	-	-	-	-	5,3	2,92	4,66	-	4,29
33	resfriador	4,12	4,34	-	5,23	-	-	-	-	4,56
34	resfriador	6,21	4,05	-	3,79	-	-	-	-	4,68
35	resfriador	5,27	4,13	-	-	-	-	-	-	4,7
36	resfriador	-	-	-	-	5,41	5,81	4,36	-	5,19
37	resfriador	5,4	5,44	-	5,31	-	-	-	-	5,38
38	resfriador	-	4,12	-	-	-	-	-	-	4,12
39	resfriador	-	-	-	-	5,25	≥4e	5,82	-	≥4e
40	expansão	5,24	3,24	-	5,08	-	-	-	≥4e	≥4e
41	expansão	4,62	5,21	-	5,08	-	-	-	≥4e	≥4e
42	expansão	-	-	5,53	-	-	-	-	4,79	5,16
Média de contagem diária		≥4e	4,6	5,11	4,94	5,19	≥4e	4,34	≥4e	

- Amostras não coletadas nestes dias

^aEm negrito propriedades com onfirmção de *Escherichia coli*; Letra 'e' significa contagem estimada

variou entre 3,86 e 5,45 log.ufc.mL⁻¹, referente às propriedades 31 e 29, respectivamente (Tabela 6).

Nas 116 amostras foi detectada a presença de coliformes totais. Destas foram selecionadas 348 colônias típicas de coliformes (três colônias de cada uma das 116 amostras). Sete por cento (24) destas 348 colônias foram confirmadas para coliformes fecais em caldo EC. Posteriormente, as 24 colônias foram confirmadas como *E. coli*, sendo referentes a oito propriedades (19% das propriedades) (Tabelas 5 e 6).

Esses dados demonstram as condições sanitárias semelhantes encontradas nestas propriedades, quando comparados com outras amostragens de leite cru realizadas no Brasil. Badini *et al.* (1996) em amostras coletadas no interior de São Paulo, encontraram cerca de 18% das amostras contaminadas com coliformes fecais, enquanto as propriedades analisadas apresentaram 7%.

Vinte propriedades possuíam ordenha manual, sendo que 12 utilizavam como forma de armazenamento o congelamento a -20°C; quatro, o resfriador e quatro, a geladeira. Vinte e duas propriedades possuíam ordenha mecânica, sendo que dez utilizavam o congelamento a -20°C; nove, o resfriador e três, o tanque de expansão (Tabelas 5 e 6). Não foi observada diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os tipos de ordenha, bem como entre os tipos de armazenamento quanto à presença de coliformes totais.

Das 54 amostras de leite oriundas de ordenha manual, quatro (7%) apresentaram confirmação de *E. coli*, correspondendo a quatro propriedades. Foi detectada a presença de *E. coli* em três das 36 amostras de leite armazenadas em congelador a -20°C; em nenhuma, das oito amostras de leite armazenadas em geladeira e em uma, das dez amostras de leite armazenadas em resfriador.

Das 62 amostras de leite oriundas de ordenha mecânica, quatro (7%) apresentaram confirmação de *E. coli*, correspondendo a quatro propriedades. Foi detectada a presença de *E. coli* em uma das 28 amostras de leite armazenadas em congelador a -20°C; duas, das 24 amostras de leite armazenadas em resfriador e em uma, das dez amostras armazenadas em tanque de expansão.

Considerando a ausência de diferença estatística entre os dois tipos de ordenha e analisando os tipos de armazenamento, observou-se que quatro (6%) das 64 amostras de leite armazenadas em congelador -20°C; três (8%), das 34 amostras de leite armazenadas em resfriador e uma, das dez amostras de leite armazenadas em tanque de expansão apresentaram confirmação de *E. coli*. Nenhuma das oito amostras de leite armazenadas em geladeira apresentou confirmação de *E. coli*. A confirmação deste microrganismo ocorreu em uma única coleta das três efetuadas em cada propriedade, demonstrando que predominam boas condições de higiene nestes locais.

Na Tabela 7 estão relacionadas às temperaturas mínimas e máximas previstas para Porto Alegre, médias das contagens de coliformes

totais e número de amostras com confirmação de *E. coli* para cada dia de coleta.

TABELA 7: Temperaturas mínimas e máximas previstas para cidade de Porto Alegre, média das contagem de coliformes totais e número de *E. coli* confirmadas nos dias das coletas.

Dia da coleta	Temperatura mínima (°C)	Temperatura máxima (°C)	Contagem média de coliformes totais	Número de amostras confirmadas com <i>E. coli</i>
25/11/2003	20	26	≥4e	0
06/01/2004	21	34	4,6	2
20/01/2004	22	28	4,99	1
22/03/2004	14	24	5,03	3
10/05/2004	15	25	4,95	2
05/07/2004	9	19	≥4e	0
19/07/2004	8	17	4,33	0
02/08/2004	9	19	≥4e	0

Fonte: Correio do Povo, Porto Alegre - RS, nas datas indicadas.
Letra "e" significa contagem estimada

Das oito datas de coletas, uma foi realizada na primavera (25/Novembro), três no verão (06 e 20/Janeiro; 22/Março), uma no outono (10/Maio) e três no inverno (05 e 19/Julho; 02/Agosto). Foi observado que seis das oito amostras positivas para *E. coli* foram verificadas no verão e duas no outono (Tabelas 5 e 6).

Duas coletas foram realizadas em Terças-feiras (25/Novembro e 06/Janeiro) e as demais em Segundas-feiras. O leite coletado nas Segundas-feiras sempre representa a mistura dos leites da ordenha deste dia e do dia

anterior. Embora, este fato representasse uma maior probabilidade de haver contagens mais altas, isto não foi verificado. Nas Terças-feiras, as amostras coletadas foram oriundas de ordenha realizada neste dia e apresentaram as maiores contagens médias (Tabelas 5 e 6).

Nenhuma das oito amostras coletadas na indústria de beneficiamento após tratamento térmico apresentou crescimento de coliformes, demonstrando a eficácia do processamento térmico utilizado.

De acordo com a legislação vigente (RDC N.º 12) (Brasil^a, 2001) e a Normativa 51 do MAPA (Brasil^b, 2002) as amostras de leite pasteurizado estariam dentro dos padrões estabelecidos. Até o momento, nenhuma legislação em vigor contempla os padrões microbiológicos, quanto à presença de coliformes, para o leite *in natura*.

4.2 Detecção de *Salmonella* sp.

Nas 116 amostras de leite *in natura* testadas, referentes a 42 propriedades, não foi detectada a presença de *Salmonella* sp., assim como, em nenhuma das oito amostras coletadas na indústria de beneficiamento após tratamento térmico.

O não isolamento de *Salmonella* sp., ao longo deste trabalho, não representa a segurança das amostras coletadas. Frequentemente, a presença de altas contagens de microrganismos competidores, como observado neste trabalho, pode dificultar o isolamento desta *Enterobacteriaceae* em amostras de alimentos (Baylis *et al.*, 2000). Metabólitos inibidores produzidos por outras bactérias podem afetar a recuperação e o crescimento de *Salmonella* sp., bem

como, a depleção de nutrientes, redução do potencial de oxidação-redução e alterações no pH (Baylis *et al.*, 2000). Este microrganismo pode entrar em uma fase estacionária prematura antes que níveis detectáveis de células possam ser alcançados devido a altas concentrações de outras bactérias Gram-negativas. O tipo de processamento que o alimento é submetido também pode influenciar a detecção de *Salmonella* sp., assim como, fatores intrínsecos do próprio alimento (Baylis *et al.*, 2000). A presença de coliformes totais e a confirmação de *Escherichia coli* em oito das 116 amostras testadas é um indicativo da possibilidade de que outros patógenos possam estar presentes.

No Brasil, outros autores que realizaram pesquisas com amostras de leite *in natura* e pasteurizado, seguindo métodos de detecção semelhantes, também não detectaram a presença de *Salmonella* sp. nas amostras testadas (Ávila & Gallo, 1996; Garrido *et al.*, 2001; Leite *et al.*, 2002; Tinoco *et al.*, 2002).

4.3 Contagem de bactérias mesófilas e psicotróficas

A contagem de bactérias mesófilas e psicotróficas foi realizada a partir das três últimas datas de coletas (meses de inverno).

As propriedades analisadas no presente trabalho apresentaram contagens de bactérias mesófilas entre 3 log.ufc.ml⁻¹ e 5,98 log.ufc.mL⁻¹ (Tabela 8). Estas contagens são semelhantes às encontradas por outros autores ao analisarem leite *in natura* e pasteurizado no Brasil (Leite *et al.*, 2002; Tinoco *et al.*, 2002; Garrido *et al.*, 2001; Santana *et al.*, 2002).

As médias de contagens de bactérias mesófilas encontradas em neste trabalho estão dentro dos limites exigidos pela Normativa 51, anexo IV, onde o leite *in natura* refrigerado pode apresentar contagens até $6 \log.\text{ufc.mL}^{-1}$ (Brasil, 2002). No Brasil, o leite *in natura*, geralmente, apresenta altas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos, indicando higiene insatisfatória durante a produção (Santana, 2001). Contudo, segundo alguns autores, a presença de bactérias no leite é normal e inócua quando inferior a 10^3 células ($3\log.\text{ufc.mL}^{-1}$) por mililitro. Contagens superiores no leite *in natura* podem ser responsáveis por defeitos na qualidade do leite pasteurizado (Soler *et al.*, 1995).

As amostras coletadas na indústria de beneficiamento após tratamento pasteurização, não apresentaram crescimento de bactérias mesófilas, entretanto apresentaram crescimento de bactérias psicotróficas nas três coletas (Tabela 8), provavelmente devido a maior resistência térmica destas bactérias, pois na sua maioria são Gram-positivas esporuladas ou devido a uma recontaminação pós-beneficiamento do leite (Sorhaug & Stepaniak, 1997; Santos & Fonseca, 2001; Chen *et al.*, 2003). A frequência de bactérias psicotróficas em relação à de aeróbios mesófilos foi a mesma nas propriedades (Tabela 8). Santana *et al.* (2002) relatam variações entre 10% e 98,1%. Entretanto, é citada na literatura uma frequência em torno de 10% das bactérias psicotróficas em relação às mesófilas (Santana, 2001). Os microrganismos psicotróficos, podem produzir enzimas lipolíticas e proteolíticas que podem alterar as qualidades organolépticas e de textura do leite e de seus produtos (Wessels *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 2003).

A média da contagem de bactérias psicrotróficas encontrada em leite pasteurizado foi superior ou igual a $4 \log.\text{ufc mL}^{-1}$ (Tabela 8). Zocche *et al.* (2002) afirmam que podem ocorrer alterações de sabor, odor e textura no leite devido à atividade enzimática a partir da contagem de $4 \log.\text{ufc mL}^{-1}$. Entretanto, este resultado discorda de alguns autores que, afirmam que para ocorrerem deteriorações no leite e derivados devido à atividade enzimática, é preciso que a contagem de bactérias psicrotróficas seja superior ou igual a $6 \log.\text{ufc.mL}^{-1}$ (Wessels *et al.*, 1989; Fonseca & Santos, 2001; Santana *et al.*, 2002).

A ação acidificante das bactérias mesófilas é inibida pelas baixas temperaturas, porém proporciona o desenvolvimento de bactérias psicrotróficas que podem causar efeitos indesejáveis no leite e em seus derivados (Sorhaug & Stepaniak, 1997). Deve ser realizada uma análise dos pontos críticos que podem levar a um alto risco de contaminação do leite com estas bactérias. Conforme exposto neste trabalho, o resfriamento é uma ferramenta importante na qualidade do leite, mas deve ser acompanhada por higiene satisfatória desde a ordenha até o produto final (Santos & Fonseca, 2001).

TABELA 8: Média de contagens (log.ufc.mL⁻¹) das bactérias mesófilas e psicotróficas isoladas de leite *in natura* e pasteurizado em cinco municípios da Grande Porto Alegre.

Propriedades	Bactérias mesófilas ^a	Bactérias psicotróficas ^a
Coleta 05/07/2004 e 19/07/2004		
1*	≥3e	5,25
2	5,27	5,42
3	≥3	5,92
4	≥3	4,82
5	5,98	5,95
Pasteurizado	Sem crescimento	≥4e
Coleta 02/08/2004		
6	≥4e	≥4e
7	≥4e	≥4e
8	≥4e	≥4e
9	≥4e	≥4e
10	≥4e	≥4e
11	5,86	5,26
12	≥3e	5,83
13	≥4e	≥4e
14	≥4e	≥4e
15	≥4e	≥4e
16	≥4e	≥4e
17	≥4e	≥4e
18	≥4e	≥4e
19	5,97	5,86
20	≥3e	5,37
21*	≥4e	5,15
22	5,22	5,89
Pateurizado	sem crescimento	≥4e

^a Contagem média estimada; Letra 'e' significa contagem estimada

* Mesma propriedade

4.5 Detecção de rebanhos com brucelose

Foram coletadas 181 amostras de leite *in natura* em 50 propriedades. Foi possível detectar a presença de anticorpos específicos para *Brucella* sp. em dez amostras, provenientes de três propriedades. Das três propriedades, duas apresentaram resultado positivo em todas as coletas, indicando a presença de brucelose nestas propriedades. Uma terceira propriedade (42) apresentou resultado positivo na última coleta (Tabela 9). Este fato, provavelmente, deve-se à introdução de animais contaminados com bactérias do gênero *Brucella* no rebanho ou a uma resposta inespecífica. Para confirmação deveriam ser realizadas novas coletas, pois respostas inespecíficas geralmente são passageiras.

O TAL é o teste sorológico com maior praticidade e economia utilizado para o monitoramento de rebanhos leiteiros infectados com *Brucella* sp. A vantagem do TAL é o seu custo baixo, a coleta das amostras não interfere com o manejo do rebanho e pode ser rapidamente realizado em laboratório ou a campo (Rolfe & Sykes, 1987; Garin-Bastuji, 1992).

A prevalência de propriedades positivas para brucelose nas amostras analisadas foi de 6% (n=50) neste trabalho, correspondendo a três propriedades indicando a presença desta zoonose nestes locais. Segundo Poester *et al.* (2002), no Estado do Rio Grande do Sul, a prevalência da doença bovinos era de 0,3%, em 1986. Não existem trabalhos que forneçam dados mais atuais sobre a prevalência de brucelose nos rebanhos bovinos do Rio Grande do Sul, os quais possam ser comparados com os obtidos neste trabalho.

TABELA 9: Resultados da sorologia pelo Teste do Anel em Leite nos diferentes tempos de amostragens (TAL).

Datas das coletas	Propriedades		
	21	42	45
25/11/2003	+	NF	NF
28/11/2003	+	NF	+
17/12/2003	NF	NF	+
07/01/2004	+	-	NF
21/01/2004	+	-	NF
03/08/2004	+	+	NF

+ resultado positivo

- resultado negativo

NF não foi realizada sorologia nesta data

Os últimos dados, no Brasil, sobre prevalência de *Brucella* sp. no rebanho leiteiro foram um fator determinante para a realização deste trabalho. Três propriedades (Tabela 9) apresentaram resultados positivos pelo TAL. Embora, exista necessidade de diagnóstico confirmatório, estas propriedades apresentam características de risco à saúde pública, indicando a necessidade de uma intervenção com intuito educativo e preventivo.

Respostas sorológicas positivas indicam a necessidade de uma vigilância sanitária mais intensa nestas propriedades, visto que, a brucelose é uma zoonose e está fortemente relacionada ao hábito da ingestão de leite *in natura*. Estando confirmada a presença de anticorpos da brucelose nestas propriedades através do TAL realizado em leite *in natura* de mistura, a etapa seguinte seria a identificação dos animais reagentes e o isolamento da bactéria. Não foi possível realizar o isolamento bacteriano nas amostras positivas para o TAL devido à característica das propriedades com sorologia positiva. Alguns produtores, quando notificados, possivelmente

comercializariam estes animais, contrariando as diretrizes básicas recomendadas pelo MAPA que determina o sacrifício dos animais contaminados.

5. CONCLUSÕES

Os leites *in natura* obtidos nos cinco municípios analisados estava em condições higiênico-sanitárias satisfatórias.

A presença de coliformes totais nas propriedades testadas foi observada em todas as amostras analisadas. Apenas oito propriedades apresentaram confirmação de coliformes fecais e *E. coli* em leite *in natura*. O tratamento térmico realizado pela indústria de beneficiamento foi efetivo no controle de coliformes totais, coliformes fecais e bactérias mesófilas.

Não foi detectada a presença de *Salmonella* sp. nas amostras testadas, assim como nas oito amostras coletadas na indústria de beneficiamento após tratamento térmico.

Foi confirmada a presença de anticorpos específicos para *Brucella* sp. em três das 50 propriedades testadas através do Teste do Anel em Leite.

O tratamento térmico realizado pela indústria de beneficiamento foi efetivo em todas as datas de coletas, com exceção de bactérias psicotróficas nas amostras de leite pasteurizado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAKU, E.N. *et al.* Microbiological quality of milk from two processing plants in Gaborone Botswana. **Food Control**, Guildford, v. 15, p. 181-186, 2004.

ADESIYUM, A.A. Bacteriological quality and associated public health risk of pre-processed bovine milk in Trinidad. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 21, p. 235-261, 1994.

ALTON, G.G. *et al.* **Techniques for the brucellosis laboratories**. Paris, Institut National de La Recherche Agronomique – INRA, 1988. 190 p.

ARELLANO-REYNOSO, B. *et al.* Intracellular trafficking study of a RB51 *B. abortus* vaccinal strain isolated from cow milk. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 98, p. 307-312, 2004.

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

BADINI, K.B. *et al.* Health risk due to the consumption of raw milk commercialized without due authorization. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 30, p. 549-552, 1996.

BALBANI, A.P.S.; BUTUGAN, O. Contaminação biológica de alimentos. **Pediatria**, São Paulo, v. 23, p. 320-328, 2001.

BAYLIS, C.L.; MACPHEE, S.; BETTS, R.P. Comparison of methods for recovery and detection of low of injured *Salmonella* in ice cream and milk powder. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 30, p. 320-324, 2000.

BELOTI, V. *et al.* Use of readyculttm - LMX for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in milk. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo v.33, p. 49 - 52, 2002.

BERCOVICH, Z.; TEARLAAK, E.A. An evaluation of delayed-type hypersensitivity test for diagnosing brucellosis in individual cattle: a field study. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 22, p. 241-248, 1990.

BORAKER, D.K.; STINEBRING, W.R.; KUNKEL, J.R. BrucELISA: an enzyme-antibody immunoassay for detection of *Brucella abortus* antibodies in milk: correlation with *Brucella* Ring Test and with shedding of viable organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 14, n. 4, p. 396-403, 1981.

BRASIL_a. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Brasília, 2002. 22p.

BRASIL_b. Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento. **Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite**. Brasília, 2003. 54p.

- BRASIL_c. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual Técnico do Programa de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT**. Brasília, 2003. 130p.
- BRICKER, B. Diagnostic strategies used for the identification of *Brucella*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, p. 433-434, 2002.
- CHEN, L.; COOLBEAR, T.DANIEL, R.M. Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines. **International Dairy Journal**, Barking, v. 14, p. 495-504, 2004.
- CHEN, L.; DANIEL, R.M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipases activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, p. 255-275, 2003.
- CHYE, F.Y.; ABDULLAH, A.; AYOB, M.K. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. **Food Microbiology**, Londres, v. 21, p. 535-541, 2004.
- CLIVER, D.O. **Foodborne Diseases**. [s.l.]: Academic Press, 1990. 395p.
- CLOECKAERT, A. *et al.* Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, p. 593-602, 2003.
- COHEN, H.J.; MECHANDA, S.M., LIN, W. PCR amplification of the *fimA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium, a specif method for detection of *Salmonella* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 4303-4308, 1996.
- CONEDERA, G. *et al.* Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 96, p. 67-73, 2004.

COSTALUNGA, S.; TONDO, E.C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, p. 342-346, 2002.

DATTA, N.; DEETH, H. Diagnosing the cause of proteolyses in UHT milk. **Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie**, Londres, v. 36, p. 173-182, 2003.

DONTOROU, A. *et al.* Isolation of a rare *Escherichia coli* O157:H7 strain from farm animals in Greece. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v. 27, p. 201-207, 2004.

FAVRIN, S.J.; JASSIM, S.A.; GRIFFITHS, W. Application of a novel immunomagnetic separation-bacteriophage assay for detection of *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 in food. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, p. 63-71, 2003.

FORSYTHE, S.J. Microrganismos causadores de doenças de origem alimentar. In: MICROBIOLOGIA da segurança alimentar. Porto Alegre: Artmed. p.155-204.

FRANCO, R.M. *et al.* Avaliação da qualidade higiênico-sanitárias de leite e derivados. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, p. 70-77, 2000.

GARIN-BASTUJI, B. Reliability of serological tests in the diagnosis and of brucellosis with regard to species and herd prevalence. Review of current research. In: EXPERT CONSULTATION ON STRATEGIES IN DIAGNOSIS AND CONTROL OF BRUCELLOSIS IN ASIA, Beijing, 1992. **Relatório ...** Beijing: FAO, 1992.

GARRIDO, N.S. *et al.* Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Riberião Preto/SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 60, p. 141-146, 2001.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. 629 p.

GRAN, H.M. *et al.* Occurrence of pathogenic bacteria in raw milk, cultured pasteurized milk and naturally soured milk produced at small-scale dairies in Zimbabwe. **Food Control**, Guildford, v. 14, p. 539-544, 2003.

HAJDENWURCEL, J.R. Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) na Indústria de Laticínios. **Revista da Indústria de Laticínios do Instituto Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.52, p. 39-37, 1997.

HALLING, S.M.; BOYLE, S.M. Foreword. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, p. 1-3, 2002.

HAMDY, M.E.R.; AMIN, A.S. Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. **The Veterinary Journal**, Londres, v. 163, p. 299-305, 2002.

HOFFMANN, F.L. *et al.* Microbiologia do leite pasteurizado tipo "C", comercializado na região de São José do Rio Preto - SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, p. 51-54, 1999.

JO, M.Y. *et al.* Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* O157 from major food animals in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 95, p. 41-49, 2004.

KO, J.; SPLITTER, G.A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, p. 65-78, 2003.

LANGONI, H. *et al.* Isolation of *Brucella* spp. from milk of brucellosis positive cows in São Paulo and Minas Gerais states. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.37, p.0-0, 2000.

LEAL-KLEVEZAS, D.S. *et al.* Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 12, p. 3087-3090, 1995.

LECLERC, V. *et al.* Pathogens in meat and milk products: surveillance and impact on human health in France. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 76, p. 195-202, 2002.

LECLERCQ, A.; WANEGUE, C.; BAYLAC, P. Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1631-1638, 2002.

LEITE, C.C. *et al.* Qualidade bacteriológica do leite integral (tipo C) comercializado em Salvador - Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 3, p. 21-25, 2002.

LOPEZ, J.; BEST, A.; MORALES, C. Diagnóstico de brucelosis bovina en leche por el Ring Test y ELISA en lecherías de la provincia de Ñuble (VIII Región). **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 30, p. 133-137, 1998.

LUNA-MARTÍNEZ, J.; MEJÍA-TERÁN, C. Brucellosis in Mexico: current status and trends. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.90, p.19-30, 2002.

MACFADDIN, J.F. **J. Biochemical tests for identification of Medical bacteria**. 3.ed., Baltimore: Willians & Wilkins, 2001. 912p.

MADRID, A.; CENTANO,I.; VICENTE, J.M. O leite e sua composição. Tipos: pasteurizado, esterilizado e UHT. In: MANUAL da Indústria de Alimentos. Varela: São Paulo, 1986. p.89 - 130.

MAREK, P.; NAIR, M.K.M.; HOAGLAND, T.; VENKITANARAYANAN, K. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* O157:H7 in pasteurized and unpasteurized Cheddar cheese whey. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, p. 1-7, 2004.

METIN, A. *et al.* Cutaneous findings encountered in brucellosis and review of the literature. **International Journal of Dermatology**, Filadélfia, v. 40, p. 434-438, 2001.

MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYÓN, I. *Brucella* evolution and taxonomy. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, p. 209-227, 2002.

NICOLETTI, P.; BURCH, G.E. A comparison of the tube agglutination, supplemental, and brucellosis ring tests in selected dairy herds in New York., **Cornell Veterinary**, Ithaca, v.59 , p. 349-354, 1968.

NIELSEN, K. *et al.* Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in milk. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 52, p. 165-173, 1996.

OCHOLI, R.A. *et al.* Phenotypic characterization of *Brucella* strains isolated from livestock in Nigeria. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 103, p. 47-53, 2004.

OLIVEIRA, S.C., SOEURT, N. SPLITTER, G. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* and host immune responses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.90, p. 417-424, 2002.

PATTERSON, J.; DEYOE, B.L. Effect of physical properties of milk fat globules on Brucella Ring Test sensitivity. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 60, p. 851-856, 1976.

PEREIRA, M.L. *et al.* Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, p.427-431, 1999.

PIGNATO, S. *et al.* Evaluation of new cultura media for rapid detection and isolation of *Salmonellae* in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p.1996-1999, 1995.

POESTER, P.P.; GONÇALVES, V.S.P.; LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, p. 55-62, 2002.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L.L. Supplement 2002 (n° 460) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 155, p. 568-570, 2004.

RIJPENS, N. *et al.* Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 1683-1688, 1996.

- ROJAS, N. *et al.* Comparison of antibody response in adult cattle against different epitopes of *Brucella abortus* lipopolysaccharide. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlim, v. 48, p; 623-629, 2001.
- ROLFE, D. C.; SYKES, W.E. Monitoring of dairy herds for *Brucella abortus* infection when prevalence is low. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 64, p. 97-100, 1987.
- ROMERO, C. *et al.* Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 3198-3200, 1995.
- SÁ, E. Análises realizadas para o controle da qualidade de leite *in natura* de acordo com os parâmetros legais. **Leite e Derivados**, São Paulo, v. 81, p. 66-72, 2004.
- SALGADO, E.A. *et al.* Estudio de brucelosis a partir de muestras de leche de bovinos en el trópico subhúmedo del Estado de Guerrero. **Veterinaria Mexico**, México, v. 26, p. 359-363, 1995.
- SANTANA, E.H.W. *et al.* Principais pontos de contaminação do leite no processo de produção: microrganismos mesófilos, psicrotróficos e proteolíticos. **Leite & Derivados**, São Paulo, v. 2, p.36-40, 2002.
- SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F. Microrganismos psicrotróficos em leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, p. 27-33, 2001.
- SANTOS, J.A. *et al.* Characterization and extracellular activity of psychrotrophic bacteria isolated from Villalón cheese (fresh variety of Spain sheep's milk

cheese). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 33, p.301-306, 1996.

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

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 317p.

SIPPY, N. *et al.* Rapide electrochemical detection and identification of catalase positive microorganisms. **Biosensors and Bioelectronics**, Essex, v. 18, p. 741-749, 2003.

SOBERÓN-MOBARAK, A. *et al.* Absence of shedding of two *B. abortus* strains in goats after vaccination with live vaccines. **Vaccine**, Kidlington, v.18, p. 3018-3020, 2000.

SOLER, A. *et al.* The microbiological quality of milk produced in the Balearic Islands. **International Dairy Journal**, Barking, v. 5, p. 69-74, 1995.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 8, p. 35-40, 1997.

STRACHAN, N.J.C.; FENLON, D.R.; OGDEN, I.D. Modelling the vector pathway and infection of humans in an environmental outbreak of *Escherichia coli* O157. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 203, p. 69-73, 2001.

- SUTRA, L.; CAFFIN, J.P.; DUBRAY, G. Role of milk immunoglobulin in the *Brucella* Milk Ring Test. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 12, p. 359-386, 1986.
- TAN, W.; SHELEF, L.A. Automated detection of *Salmonella* spp. in foods. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 37, p. 87-91, 1999.
- TINOCO, A.L.A. *et al.* Estudo microbiológico comparativo de leites pasteurizados em estabelecimentos com inspeção federal e em fazendas. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, p. 88-93, 2002.
- TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: UFSM, 1997. 380p.
- U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION. Center for Food safety & Applied Nutrition. **Bacteriological Analytical Manual Online**. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. Rockville, 2002. Disponível em: [http:// www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov). Acesso em: 20/06/2004.
- U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION. Center for Food safety & Applied Nutrition. **Bacteriological Analytical Manual Online**. *Salmonella*, Rockville, 2003. Disponível em: [http:// www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov). Acesso em: 20/06/2004.
- VANZINI, V.R. *et al.* Evaluation of indirect ELISA for diagnosis of bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentina. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 36, p. 211-217, 1998.
- VIZCAÍNO, N. *et al.* DNA polymorphism in the *omp25/omp31* family of *Brucella* spp.: identification of a 1.7-kb inversion in *Brucella cetaceae* and of a 15.1kb genomic island, absent from *Brucella ovis*, related to the synthesis of

smooth lipopolysaccharide. **Microbes and Infection**, Paris, v. 6, p. 821-834, 2004.

WESSELS, D.; JOOSTE, P.J.; MOSTERT, J.F. Psychrotrophic, proteolytic and lipolytic properties of *Enterobacteriaceae* isolated from milk and dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 9, p. 79-83, 1989.

ZIGMUNT, M.S. *et al.* Single-step and evaluation of recombinant BP26 protein for serological diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.87, p. 213-220, 2002.

ZOCHE, F. *et al.* Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 7, p. 59-67, 2002.

7. APÊNDICE

7.1 Caldo ONPG

Solução A - Solução do reativo ONPG

2-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG, C₁₂H₁₅NO₃)6,0g

Fosfato de sódio tamponado pH 7,5 (Na₂PO₄ -
0,01M).....1000mL

Dissolver o ONPG na solução de fosfato de sódio tamponado e esterilizar por filtração.

Solução B - Água Peptonada 1%

Peptona de carne10g

Cloreto de sódio (NaCl).....5,0g

Água destilada.....1000mL

Dissolver a peptona de carne e o NaCl na água destilada e autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Preparo do caldo ONPG

Misturar assepticamente em frasco estéril 250mL da solução A e 750mL da solução B.

7.2 Análise da variância (ANOVA)

TABELA 9: Análise de Variância para tipo de armazenamento do leite utilizado nas propriedades coletadas em cinco municípios do Rio Grande do Sul.

ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA)					
	Soma dos quadrados	Graus de liberdades	Média dos quadrados	Frequência	Significância
Entre grupos	1.363	3	0.454	0.467	0.708
Dentro dos grupos	27.267	28	0.974		
Total	28.630	31			

8. VITA

8.1 Dados Pessoais

Nome: Cristiane da Rosa Moraes

Nascimento: 17/10/1972, Porto Alegre/RS – Brasil

Endereço Residencial: Rua Itaboraí, 400, apt 201, Jardim Botânico,
CEP 90.670-030, Porto Alegre, RS

Telefone: (51) 3332-1259 / (51) 9162-4741

E-mail: crismovet@pop.com.br

8.2 Formação Acadêmica / Titulação

2003-2005 - Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, RS, Brasil

1995-2002 - Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, RS, Brasil

8.3 Áreas de Atuação

1. Biologia e Fisiologia de Microrganismos,
2. Bacteriologia
3. Microbiologia Aplicada
4. Microbiologia de Alimentos
5. Microbiologia Veterinária

8.4 Produção Científica

8.5 Resumos em anais de eventos

MORAES, Cristiane da Rosa; GALIA, Carlos Roberto; MACEDO, Carlos Alberto Souza; ROSITO, Ricardo; OLIVEIRA, Augusto Medaglia de. Relato de Caso de Revisão de Prótese Total de Quadril Bilateral: Comparação entre Enxerto Ósseo Homólogo Congelado e Heterólogo Liofilizado. In: 8a Jornada de Ortopedia e Traumatologia do Planalto Médio, 2002, Passo Fundo - RS. 8a Jornada de Ortopedia e Traumatologia do Planalto Médio. 2002.

8.6 Prêmios e Títulos

2002 - Prêmio BAUMER/CEOP na 8ª Jornada de Ortopedia e Traumatologia do Planalto Médio, BAUMER/CEOP (Centro de Estudos Ortopédicos de Passo Fundo-RS).