

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO**

**ISOLAMENTO DE *Escherichia coli* O 157: H7 E CONTAGEM DE MICRO-  
ORGANISMOS INDICADORES EM LEITE CRU OBTIDOS POR ORDENHA  
NÃO MECANIZADA E MECANIZADA DE PROPRIEDADES DA REGIÃO DO  
RECÔNCAVO BAIANO**

**ALINE BATISTA SANDES**

**CRUZ DAS ALMAS-BA  
JANEIRO - 2014**

**ISOLAMENTO DE *Escherichia coli* O 157: H7 E CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS INDICADORES EM LEITE CRU OBTIDOS POR ORDENHA NÃO MECANIZADA E MECANIZADA DE PROPRIEDADES DA REGIÃO DO RECÔNCAVO BAIANO**

**ALINE BATISTA SANDES.**

Dissertação submetida ao colegiado do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ludmilla Santana Soares e Barros.

**CRUZ DAS ALMAS-BA  
JANEIRO - 2014**

## FICHA CATALOGRÁFICA

|       |   |
|-------|---|
| S214i | <p>Sandes, Aline Batista.</p> <p>Isolamento de <i>Escherichia coli</i> O 157: H7 e contagem de micro-organismos indicadores em leite cru obtidos por ordenha não mecanizada e mecanizada de propriedades da Região do Recôncavo Baiano / Aline Batista Sandes. _ Cruz das Almas, BA, 2014.</p> <p>65f.; il.</p> <p>Orientadora: Ludmilla Santana Soares e Barros.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Leite – Microorganismos. 2.Leite – Higiene alimentar. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 637</p> |
|-------|---|

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
ALINE BATISTA SANDES**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ludmilla Santana Soares e Barros – (Orientadora)  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Helena Silva.  
Universidade Federal da Bahia.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Tatiana Pacheco Rodrigues.  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

**CRUZ DAS ALMAS-BA**

**JANEIRO - 2014**

## **DEDICO....**

A Deus, por ter permitido mais uma vitória em minha vida.

Aos meus pais pela minha existência e pelo amor infinito.

A meu filho Caio Sandes, que é a razão do meu viver.

A toda minha família em especial a meus tios Carlinda e Cícero, pelo apoio a minha carreira profissional.

A Maria Helena Silva pelo exemplo de amor fraterno, agradeço a confiança e as palavras de coragem, sem você não teria realizado essa conquista.

A minha orientadora Ludmilla Santana Soares e Barros pela constante disponibilidade e atenção.

Ao amigo e colega Valdir, meus eternos agradecimentos, pela infinita paciência, pela humildade em repartir seus conhecimentos e por me auxiliar durante esse caminho que tornou meu sonho em realidade. Você me ensinou muito...receba, então, todo o meu carinho e minha admiração.

Às minhas colegas do mestrado e hoje amigas, Evelin Santiago, Luciana Freitas e Marilice Andrade, pela dedicação e atenção.

## **AGRADEÇO...**

A Deus, por conduzir sempre a minha vida pelo caminho do bem e da dignidade.

Aos meus pais e ao meu filho Caio pela compreensão pelas horas ausentes de estudo e de trabalho.

A minha orientadora Prof. Dr<sup>a</sup>. Ludmilla Santana Soares, por ter me aceitado como orientanda e pela sua cordialidade;

Ao todos os proprietários das fazendas, que contribuíram com esta pesquisa.

A técnica do laboratório Maria Carolina (Carol), por contribuído para a conclusão deste trabalho.

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, em especial, ao Departamento de Ciência Agrária Ambientais e Biológicas pela oportunidade de realização deste mestrado;

A todos colegas do Mestrado, pelos momentos felizes que passamos juntos e pelo ótimo relacionamento que construímos durante esse tempo;

Ao Prof. Dr. Roberto Franke, meu orientador do PIBIC, por ter me incentivado a seguir o caminho da pesquisa...

**“A perseverança é uma qualidade dos fortes de espírito  
e traz aos mesmos a vitória em tudo que  
fizerem”.**

**Sheakespeare**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Mapa da Bahia com destaque para a região do Recôncavo Baiano. ....                                   | 26 |
| <b>Figura 2:</b> Sala específica para ordenha mecanizada.....   | 28 |
| <b>Figura 3:</b> Contador de colônias - mesófilos aeróbios.....   | 29 |
| <b>Figura 4:</b> Placa de Petri colônias contendo fungos filamentosos e leveduras.....                                | 30 |
| <b>Figura 5:</b> Sala de ordenha em uma propriedade mecanizada. ....  | 48 |
| <b>Figura 6:</b> Tanque de expansão nas propriedades em que o leite foi obtido por sistema de ordenha mecanizada..... | 49 |
| <b>Figura 7:</b> Prova de Lauril Sulfato com Triptose.....  | 50 |
| <b>Figura 8:</b> Placa de Petri com Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB).....   | 51 |
| <b>Figura 9:</b> Ágar Nutriente inclinado .....   | 52 |
| <b>Figura 10:</b> Método Probac.....  | 53 |
| <b>Figura 11:</b> Singlepath® E. coli 0157 mostrando resultado teste negativo e positivo respectivamente.....         | 54 |



## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Produtividade de leite, segundo as grandes regiões no Brasil no período de 2005-2010.....  | 5  |
| <b>Tabela 2.</b> Resultado do questionário aplicados em propriedades não mecanizada e mecanizada do Recôncavo da Bahia .....  | 33 |
| <b>Tabela3.</b> Microorganismos indicadores em leite cru obtidos por ordenha não mecanizada de propriedades do Recôncavo Baiano, entre os meses de novembro de 2012 a abril de 2013. ....                             | 34 |
| <b>Tabela 4.</b> Microorganismos indicadores em leite cru obtidos por ordenha mecanizada de propriedades do Recôncavo Baiano, entre os meses de novembro de 2012 a abril de 2013. ....                                | 35 |
| <b>Tabela 5.</b> Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e <i>E. coli</i> em leite cru obtidos de propriedades não mecanizada do Recôncavo Baiano, durante o período de novembro de 2012 a abril de 2013..... | 55 |
| <b>Tabela 6.</b> Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e <i>E. coli</i> em leite cru obtidos em propriedades mecanizada do Recôncavo Baiano, durante o período de novembro de 2012 a abril de 2013.....     | 56 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|   |          |
|---|----------|
| <b>Gráfico 1: Aquisição de leite Brasil 2000-2011 .....</b>                       | <b>6</b> |
| <b>Gráfico 2: Exportação de leite in natura em volume, Brasil 2005-2011 .....</b> | <b>6</b> |

## LISTA DE ABREVIações

|         |   |
|---------|---|
| ACP     | Ágar Contagem Padrão  |
| BHI     | Brain Heart Infusion  |
| BOD     | Demanda Bioquímica de Oxigênio  |
| CCAB    | Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas                         |
| CBHAM   | Contagem bacteriana de heterotróficos aeróbios mesófilos                    |
| FAO     | Food and Agriculture Organization   |
| EUA     | Estados Unidos da América   |
| EC      | <i>Escherichia coli</i>   |
| EMB     | Ágar Azul de Metileno   |
| EAggEC  | <i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa                                    |
| EHEC    | <i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica                                   |
| EIEC    | <i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva                                      |
| EPEC    | <i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica                                    |
| ETEC    | <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica                                    |
| et al.  | e colaboradores   |
| IBGE    | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística                             |
| IN      | Instrução Normativa   |
| LST     | Lauril Sulfato Triptose   |
| MAPA    | Ministério da Agricultura da Pecuária e do Abastecimento                    |
| MS      | Ministério da Saúde   |
| NMP     | Número Mais Provável  |
| OMS     | Organização Mundial de Saúde  |
| PCA     | Plate Count Ágar  |
| PNMQL   | Programa Nacional de Qualidade do leite                                     |
| PPHO    | Procedimento Padrão de Higiene Operacional                                  |
| RIISPOA | Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal |
| RDC     | Resolução da Diretoria Colegiada  |
| UFC     | Unidade Formadora de Colônia  |
| UFBA    | Universidade Federal da Bahia   |

UFRB      Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
VTs      Verotoxinas

## LISTA DE SÍMBOLOS

|      |                 |
|------|-----------------|
| %    | Porcentagem     |
| O° C | Grau Centígrado |
| +    |                 |
| -    | mais ou menos   |
| N°   | Número          |
| h    | Hora            |
| µl   | microlitro      |
| US\$ | Dólar           |

# SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO..... 1

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 17

## Capítulo 1

CONTAGEM DE MICROORGANISMOS INDICADORES EM LEITE CRU  
OBTIDOS POR ORDENHA NÃO MECANIZADA E MECANIZADA EM  
PROPRIEDADES DA REGIÃO DO RECÔNCAVO BAIANO ..... 22

## Capítulo 2

ISOLAMENTO DA *Escherichia coli* O 157: H7 EM LEITE CRU OBTIDOS POR  
ORDENHA NÃO MECANIZADA E MECANIZADA EM PROPRIEDADES DO  
RECÔNCAVO BAIANO..... 44

CONSIDERAÇÕES FINAIS ..... 61

## **ISOLAMENTO DE *Escherichia coli* O 157: H7 E CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS INDICADORES EM LEITE CRU OBTIDOS POR ORDENHA NÃO MECANIZADA E MECANIZADA DE PROPRIEDADES DO RECÔNCAVO BAIANO.**

**Autora: Aline Batista Sandes.**

**Orientadora: Ludmilla Santana Soares e Barros.**

**RESUMO:** Este trabalho objetivou avaliar os parâmetros higiênico-sanitário em vinte e seis propriedades do Recôncavo Baiano através de aplicação de questionário, determinação da contagem de micro-organismos indicadores e isolamento de *Escherichia coli* O 157: H7, em amostras de leite *in natura* obtidos por ordenha não mecanizada e mecanizada. A contagem de mesófilos aeróbios no leite obtido pela ordenha não mecanizada foi superior a mecanizada. Quanto a contagem de fungos filamentosos e levedura os resultados sugerem que a higiene foi insatisfatória durante o processo de ordenha em todas as propriedades avaliadas. Quanto ao NMP de Coliformes Totais em leite, as propriedades com sistema mecanizado apresentou valores inferiores aos da ordenha não mecanizada, demonstrando melhores condições higiênico-sanitárias durante a ordenha e estocagem, embora a IN 62 não estabeleça padrões em relação a estes micro-organismos. Os resultados de *E. coli* foram maiores no leite obtido por ordenha mecanizada. Não houve dados significativos com relação ao número *S.aureus* e bactérias psicrotróficas em nenhuma dos sistemas de ordenhas. Já a *Escherichia coli* O 157: H7 foi encontrada uma amostra positiva em uma propriedade leiteira, após ter sido realizado testes bioquímicos específicos para esta espécie. A respeito dos parâmetros higiênico-sanitário 90% das 18 propriedades que realizavam ordenha não mecanizada, apresentaram falhas nos procedimentos de higiene e limpeza na ordenha. Com relação as oito propriedades que realizam ordenha mecanizada, só uma apresentou falhas nos procedimentos de higiene.

**Palavras-chave:** leite *in natura*, parâmetros higiênico-sanitária, ordenha mecânica e não mecânica.

## ***Escherichia coli* O 157: H7 MICROORGANISMS AND INDICATORS IN MILK RAW PROPERTY NOT MECHANIZED AND MECHANIZED OF RECÔNCAVO BAIANO**

**Author:** Aline Batista Sandes.

**Guiding:** Ludmilla Santana Soares e Barros.

**ABSTRACT:** This work aimed to evaluate the hygienic- sanitary parameters in twenty- six properties Recôncavo Baiano through questionnaires, determining the count of micro - organisms indicators and isolation of *Escherichia coli* O 157 : H7 in samples of fresh milk obtained by milking non- mechanized and mechanized. The aerobic mesophilic count in milk obtained by non-mechanized mechanized milking were higher. As the count of filamentous fungi and yeast results suggest that hygiene is unsatisfactory during the milking process in all the evaluated properties. Regarding the MPN of coliforms in milk, mechanized system with properties inferior to the non- mechanized milking values , demonstrating best sanitary conditions during milking and storage, although the law prescribes standards for these microorganisms. The results of *E. coli* were higher in milk obtained by mechanized milking. There was no significant relationship with the number *S.aureus* and psychotropic bacteria in any of milking systems data. Have *Escherichia coli* O 157: H7 positive sample was found in a dairy property after specific biochemical tests have been conducted for this species. Regarding hygiene and sanitary parameters 90 % of eighteen properties that performed non-mechanized milking had failures in hygiene and cleaning procedures for milking. Regarding the eight properties that perform mechanized milking , only one had flaws in hygiene procedures.

**Keywords:** fresh milk, hygienic and sanitary parameters, mechanical and non-mechanical milking.



## 1. INTRODUÇÃO

A população mundial tem se preocupado cada vez mais com o consumo de alimentos considerados saudáveis e seguros. Este fato deve-se a ampla divulgação através de meios de comunicação sobre surtos provocados por Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's), consideradas uma das principais causas de morbidade mundial, além dos alertas realizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre a necessidade de se coibir a contaminação de alimentos por agentes biológicos com risco potencial de riscos à saúde dos consumidores.

Um alimento é considerado um risco microbiológico à saúde quando está contaminado com microorganismos patogênicos. Diversos países vêm buscando prevenir as DTA's através da produção de alimentos livres de patógenos. Acredita-se ser possível alcançar essa meta através de investimento em pesquisas na área de controle de qualidade dos alimentos, que vai desde a seleção da matéria-prima, processamento, transporte e armazenamento. Além disso, estes fatores deverão estar sempre associados à educação sanitária permanente da população sobre práticas higiênicas durante a manipulação dos alimentos.

Dentre os alimentos mais consumidos diariamente encontra-se o leite e seus derivados, por desempenhar um papel nutricional importantíssimo para o homem, particularmente nos primeiros anos de vida. No Brasil, o consumo destes produtos é bastante elevado, por isso a sua qualidade assume um papel de destaque sob o ponto de vista de Saúde Pública, merecendo uma atenção especial dos órgãos competentes.

Pesquisas nacionais citam que o leite produzido no país, de modo geral, ainda apresenta alta contagem de micro-organismos, demonstrando com estes dados que há deficiências na higiene durante sua produção, tendo em vista que a qualidade do produto está diretamente associada à carga microbiana inicial. Estes resultados são fruto da inexistência na maioria das vezes de um tratamento térmico, falta de higiene durante o processamento ou da temperatura inadequada de estocagem, na qual o leite *in natura* é mantido. Fatores estes que contradizem a Legislação Federal, como o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), (BRASIL,1997) do Ministério da

Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a IN 51 (BRASIL,2002) e a IN 62 (BRASIL,2011).

É de se esperar, portanto, uma grande preocupação em assegurar a integridade e a qualidade intrínseca do leite e dos produtos lácteos destinados ao consumo humano, para obtenção de produtos alimentícios de boa qualidade.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.2 OBJETIVO GERAL**

- Este trabalho teve como objetivo isolar a *Escherichia coli* O157: H7 e determinar microorganismos indicadores em leite cru de propriedades não mecanizada e mecanizada do Recôncavo Baiano.

### **1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar as propriedades fornecedoras do leite cru através de aplicação de questionário sobre as condições higiênico-sanitária da ordenha e da sanidade dos animais.

- Comparar os dados obtidos das amostras pesquisadas tendo como parâmetro da Instrução Normativa No. 62.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Segurança Alimentar

Desde 1880, se reconhece a contaminação dos alimentos por micro-organismos produtores de enfermidades, a partir de então, tem-se notificado a ocorrência de numerosos casos, denominada toxinfecção alimentar (PRATA, 2001).

Os surtos provocados por bactérias correspondem a 60% das hospitalizações e 70% das mortes dos casos de DTA's, embora a presença de bactérias patogênicas só estejam correlacionadas somente a 30% dos casos de etiologia conhecida e estão diretamente relacionados ao consumo de produtos de origem animal (IFT, 2004).

A contaminação microbiológica dos alimentos tem sido objeto de preocupação constante em diversos países. Nos Estados Unidos da América (EUA), estima-se que, anualmente, entre um a dois milhões de pessoas são acometidas por gastroenterites provocadas por toxinas de *Staphylococcus aureus* presentes, sobretudo, em produtos de origem animal (JAY, 2005).

Não são raros os casos de doenças associadas ao consumo de leite cru ou de derivados produzidos com leite contaminado com micro-organismos patogênicos (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004). Os dados existentes, possivelmente são subestimados devido à falta de notificação dos surtos, o que demonstra a relevância das medidas de controle sanitário dos alimentos destinados ao consumo humano, particularmente da matéria – prima de origem animal.

Dados indicam que as camadas menos favorecidas da população são as mais afetadas, pelos hábitos culturais da alimentação e necessidade de optar por produtos com menor preço, geralmente de pior qualidade e maior contaminação. O que requer maior atenção dos serviços estaduais e municipais de vigilância sanitária, aos quais é delegado o poder de inspecionar os produtos e punir os infratores.

## 2.2 Produção de Leite no Brasil

O Brasil apresenta grande área territorial disponível e uma diversidade de sistemas de produção viáveis, fatores estes que potencializam a produção de leite, demonstrando altas taxas de crescimento na sua produção, o que torna viável sua participação no mercado.

Além disso, a população brasileira é grande apreciadora do leite e dos produtos lácteos; é um alimento rico, que tem a capacidade de fornecer proteínas, carboidratos, gorduras e sais minerais necessários ao desenvolvimento do organismo (FONSECA & SANTOS, 2000).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010), o rebanho bovino brasileiro é formado de 209.541.109 cabeças, sendo que desse total, 22.924.914 são vacas que foram ordenhadas no ano 2010. A produção total foi de 30.715.460 litros de leite, com média nacional de 1.340 litros por vaca por ano. Os produtores que produzem menos de 10 litros por dia e comercializam a produção, têm aproximadamente um rebanho de 2,7 vacas ordenhadas com produtividade média animal de 309 litros de leite/vaca/ano e volume diário 7,3 litros/dia/propriedade. Por outro lado, existem estabelecimentos com média de 3.389 litros/vaca/ano, volume de aproximadamente 1 mil litros/dia e rebanho composto por 107 vacas (ZOCCAL, 2012).

A produtividade de leite no Brasil cresceu 12% no período de 2005 a 2010 (Tabela 1), sendo o sexto maior produtor de leite do mundo. E só em 2010, a produção de leite bovino chegou a 30.7 bilhões de litros, com um acréscimo de 5,5% em relação a 2009. Foram ordenhadas 22.935 milhões de vacas, representando 10,9% do efetivo total de bovinos (IBGE, 2010).

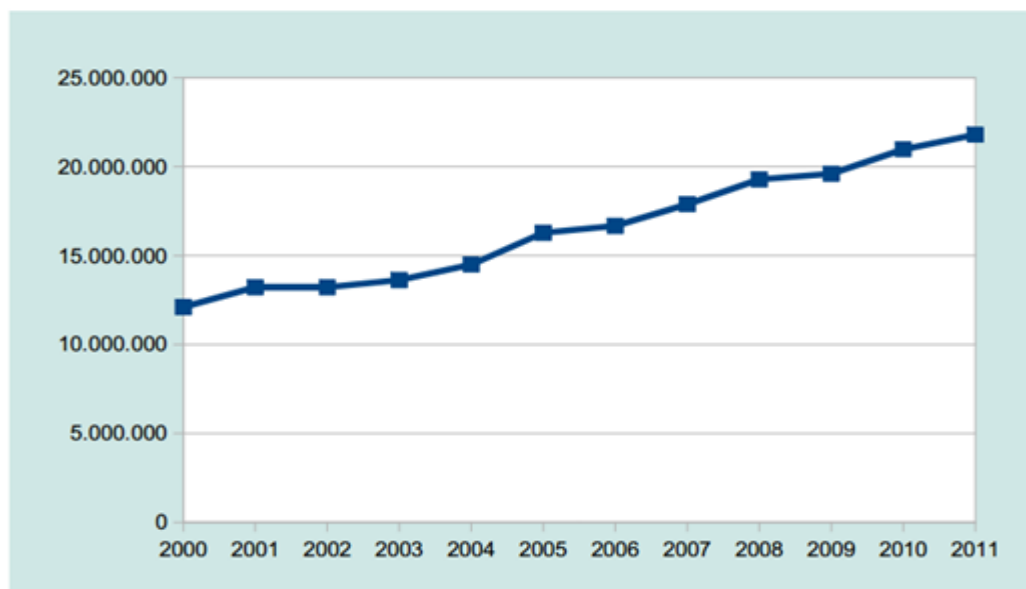
**Tabela 1:** Produtividade de leite, segundo as grandes regiões no Brasil no período de 2005-2010.

| Grandes Regiões | Produtividade de leite (Litros/vaca/ano) |              |              |              |              |              |
|-----------------|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                 | 2005                                     | 2006         | 2007         | 2008         | 2009         | 2010         |
| <b>Brasil</b>   | <b>1 194</b>                             | <b>1 213</b> | <b>1 237</b> | <b>1 278</b> | <b>1 297</b> | <b>1 340</b> |
| Norte           | 598                                      | 597          | 626          | 618          | 628          | 673          |
| Nordeste        | 747                                      | 767          | 775          | 787          | 795          | 811          |
| Sudeste         | 1 351                                    | 1 355        | 1 347        | 1376         | 1386         | 1 410        |
| Sul             | 2 005                                    | 2 066        | 2 157        | 2 265        | 2 314        | 2 388        |
| Centro-Oeste    | 1 116                                    | 1 115        | 1 129        | 1 166        | 1 178        | 1 220        |

**Fonte:** IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal, 2005-2010.

No 1º trimestre de 2013 a aquisição de leite cru foi de 5.686 bilhões de litros, com quedas de 1,4% com relação ao 1º trimestre de 2012 e de 2,0% com relação ao 4º trimestre de 2012. A região Nordeste ocupa o 4º lugar em aquisição regional de leite de todo País, o que corresponde a 5,8% (Tabela 1) (IBGE, 2010).

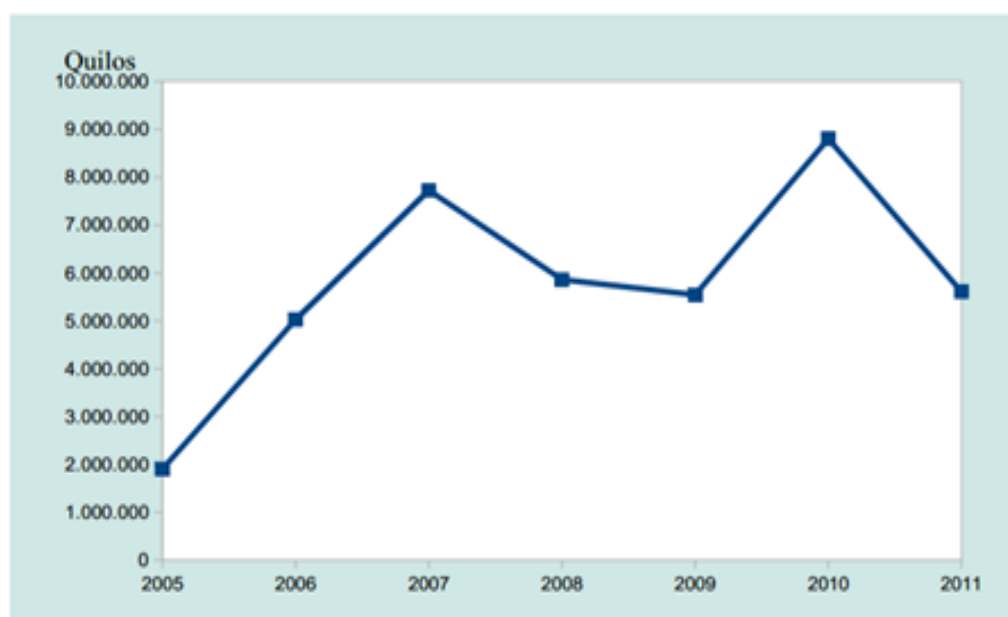
Com relação ao tipo de inspeção, 92,5% do leite adquirido no 1º trimestre de 2013 teve origem de estabelecimentos sob inspeção federal, 6,7% de estabelecimentos sob inspeção estadual e 0,8% municipal. Dados próximos obtidos no 1º trimestre de 2012 (IBGE, 2011).



Fonte: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa Trimestral do Leite 2011.

**Gráfico 1: Aquisição de leite no Brasil no período de 2000-2011.**

Durante todo o ano de 2011 foram exportadas 5.610 mil toneladas de leite *in natura*. Havendo uma queda de 36,3% no volume comercializado e 24,6% no faturamento em comparação a 2010. O preço médio da tonelada do leite *in natura*, passou de US\$2.113 no ano 2010 para US\$2.500 em 2011. As exportações em 2011 voltaram aos níveis de 2009 e 2008, o que pode ser observado no Gráfico 2 (IBGE, 2011).



Fonte: Secex, 2005 a 2011.

**Gráfico 2: Exportação de leite *in natura* em volume, Brasil 2005-2011.**

## **2.3 Legislação**

No ano de 1952 o RIISPOA foi publicado, estabelecendo assim, as condições mínimas da produção, identidade e qualidade dos produtos de origem animal, inclusive do leite e de seus derivados (BRASIL, 1997).

Na década de 90 o MAPA começou a buscar melhorias na qualidade do leite e juntamente com a Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite e de diversos representantes da comunidade científica criaram o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), cuja versão definitiva deu origem a da IN 51, que regulamenta a produção, identidade, qualidade do leite tipo A, B, C, além do regulamento técnico de identidade e qualidade do leite pasteurizado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Ficou preconizado que, o leite produzido nas propriedades rurais deve ser refrigerado até o momento do seu transporte para a indústria e os tanques de refrigeração por expansão direta devem refrigerar o leite até temperatura igual ou inferior a 4°C por no máximo de três horas após o término da ordenha e a temperatura máxima na propriedade leiteira deve ser de 7°C e no estabelecimento processador 10°C, com objetivo de melhorar as condições higiênico-sanitárias durante a obtenção do leite (BRASIL, 2002).

Em continuidade ao programa de melhoria da qualidade do leite foi aprovada a IN 62 com um dos objetivos principais de criar a identidade e os requisitos mínimos de qualidade para o Leite Cru Refrigerado produzido nas propriedades rurais do Brasil (BRASIL, 2011).

Mas vale ressaltar que o controle da temperatura somente, não garante a qualidade da matéria-prima. É importante que seja diminuída a contaminação inicial do leite cru, através de boas práticas de higiene na ordenha, incluindo utensílios e ambiente para que a contagem microbiana permaneça em níveis aceitáveis.

## **2.4 Qualidade do Leite Bovino**

Os alimentos principalmente os de origem animal, constituem-se em bons meios nutritivos para grande parte dos micro-organismos encontrados em toda natureza. Qualquer alimento está sujeito às diversas formas de contaminação,

seja por substâncias tóxicas, por bactérias patogênicas, vírus ou até mesmo alguns parasitos durante o processo de produção, elaboração, transporte, armazenamento e distribuição (FRAZIER, 1993).

O leite é um dos alimentos mais completos da natureza, é altamente nutritivo, de fácil obtenção para as classes menos favorecidas, além de estar presente na alimentação de pessoas de todas as idades destacando-se, principalmente, na dieta de crianças e idosos. Quando produzido por animais saudáveis, o leite encontra-se com um número reduzido de micro-organismos, mas alguns fatores como equipamentos e ambiente sem condições de higiene são considerados como principais fontes de contaminação, assim como, a mudança de temperatura, principalmente durante o armazenamento. Surtos relacionados ao consumo de leite pasteurizado foram atribuídos à contaminação pós-pasteurização, transporte e distribuição do produto. Devido à sua riqueza em nutrientes, torna-se susceptível ao ataque de grande número de microorganismos, provenientes do próprio animal, do homem e dos utensílios usados na ordenha (GONÇALVES & FRANCO, 1998).

Apesar do uso de tecnologia em grande parte de laticínios brasileiros para se atingir as metas de produção, a qualidade do leite produzido no Brasil ainda é insatisfatória. Trata-se de um problema crônico, onde fatores de ordem social, econômica, cultural ou até mesmo o ambiental exerce grande influência. A presença e a quantidade de micro-organismos no leite, está atrelada a higiene e ao manejo durante a ordenha, ao tempo, a temperatura de estocagem e as medidas profiláticas e preventivas a serem tomadas.

#### **2.4.1 Microorganismos indicadores de qualidade**

Dentre os micro-organismos que podem estar presentes no leite cru destacam-se: os não patogênicos, mas que alteram as propriedades do leite devido a produção de enzimas termotolerantes (FAGUNDES et al., 2006), e os patogênicos, responsáveis pelas intoxicações alimentares, como a espécie *Staphylococcus aureus* e os coliformes termotolerantes, que são indicadores de possível contaminação de origem fecal (MORAES et al., 2005).

A contaminação dos alimentos podem ser por meio da água, instalações, equipamentos e manipuladores. É necessário conhecimento das prováveis fontes



de contaminação e dos diferentes meios de difusão para que seu controle seja maximizado e os patógenos sejam excluídos sempre que possível (FRANCO & LANDGRAF, 2002).

O termo microorganismo indicador foi utilizado pela primeira vez em 1977. Esse termo é mais utilizado para avaliar a segurança e a higiene do que a qualidade, podendo ser aplicado a qualquer grupo de micro-organismo, cuja presença ou ausência indique uma característica particular do histórico da amostra, como os coliformes termotolerantes (FORSYTHE, 2002).

Os indicadores são específicos para cada fonte de contaminação. Por meio deles, pode-se formar juízo sobre a contaminação dos alimentos, por micro-organismos patogênicos ou toxigênicos e suas toxinas e apurar o estado de higiene e sanidade dos produtos (EVANGELISTA, 2001).

#### **2.4.2 Micro-organismos mesófilos**

Os chamados mesófilos são aqueles que possuem uma temperatura ótima de multiplicação entre 25°C e 40°C. Neste grupo inclui-se a maioria dos patógenos de interesse em saúde pública na área de alimentos (RIEDEL, 1992, FRANCO & LANDGRAF, 2002).

As bactérias ácido-láticas são consideradas mesófilas, portanto acidificam o leite se este não for imediatamente resfriado após a ordenha, resultando na fermentação da lactose, o que diminui a qualidade do produto mesmo após o tratamento térmico (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005).

Segundo Franco & Landgraf (2002), as bactérias aeróbias mesófilas são indicadoras da qualidade sanitária dos alimentos e um número elevado desses, indicam que o alimento é insalubre, principalmente os não perecíveis, o que torna-se sugestivo do uso de matéria-prima contaminada ou processamento insatisfatório. Já em alimentos perecíveis pode significar abuso durante o armazenamento em relação ao binômio tempo/temperatura, sendo as maiores fontes o próprio meio ambiente e o manuseio incorreto dos alimentos (LORENZETTI, 2006).

Nas propriedades leiteiras muitas vezes a temperatura é um fator ignorado, o que favorece a multiplicação dos mesófilos. Essas bactérias comprometem a

qualidade do leite, devido a produção de enzimas extracelulares como as lipases e proteases (TEBALDI et al.,2008).

### 2.4.3 Coliformes totais e termotolerantes

De acordo com Evangelista (2001), os coliformes totais pertencem à família *Enterobacteriaceae*, encontram-se em forma de bastonete, são bactérias imóveis ou não, aeróbias ou anaeróbias facultativas, não esporogênicas, gram-negativas, oxidase negativa e catalase positiva, crescem bem na presença de sais biliares, degradam a lactose com produção de ácido e gás quando incubados a 36°C por 24-48h). Possui a capacidade de fermentar a lactose a temperatura de 35°C por 24-48h e capaz de fermentar açúcar produzindo ácidos álcool, gás carbônico (característica utilizada como base para metodologia de detecção de coliformes) (GONÇALVES & FRANCO, 1998).

Dentre as espécies existentes encontram-se tanto bactérias originárias do trato intestinal de humanos quanto de outros animais de sangue quente. Inclui três gêneros, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, sendo que as cepas de *Enterobacter* não são de origem fecal. Já a *E. coli* é a mais conhecida deste grupo, tem como habitat o trato gastrointestinal, servindo de indicadora de contaminação fecal em alimentos processados (SILVA,1997).

A presença de coliformes nos alimentos é de grande importância como indicação de contaminação durante o processo de fabricação ou mesmo pós-processamento. Estes microorganismos são comumente encontrados no meio ambiente e a sua contagem elevada sugere que as práticas de higiene foram inadequadas durante o processamento (MIRANDOLA, 2006).

### 2.4.4 *Staphylococcus aureus*

São considerados mesófilos (sobrevivem de 7°C a 47,8°C), gram-positivos e coagulase positivo. São imóveis, aeróbios facultativos, beta hemolíticos, forma colônias pigmentadas. Podem crescer em formato de cocos agrupados semelhantes a cachos de uva. Esse gênero é composto de várias espécies de interesse médico: *S.aureus*, *S.epidermidis* e *S. saprophyticus* (JAY, 2005).

Apesar de serem encontrados frequentemente na microbiota normal do corpo humano e dos animais, os *S. aureus* são responsáveis por uma gama de infecções, variando desde aquelas localizadas até as disseminadas, com elevada gravidade. As patogenias causadas por eles podem ser classificadas como superficiais, invasivas ou tóxicas, destacando que os principais fatores de virulência são os componentes da superfície celular, toxinas ou algumas enzimas (TRABULSI, 2004).

Alguns estafilococos são capazes de produzir uma toxina do tipo sorológico A, que é correlacionada com a produção de um fator enzimático que tem a capacidade de converter o fibrogênio do plasma em fibrina formando um coágulo. Esta característica é importante para identificação fenotípica de isolados de bactérias (TORTORA, FUNKE E CASE, 2005). Ressaltando que, *Staphylococcus coagulase positiva* é o mais patogênico entre os estafilococos.

O *S.aureus* é considerado um dos principais agentes etiológicos das mastites contagiosas, sendo incidentes nos rebanhos leiteiros do mundo inteiro. Por esta razão, pode ser considerado um dos principais micro-organismos transmitidos pelo consumo de leite e de seus derivados, independente dele está *in natura* ou tratado termicamente, já que, produz enterotoxinas termoestáveis. A contaminação pode ocorrer através de duas formas: do úbere das vacas infectado ou através de utensílios e equipamentos utilizados na ordenha que tenham a presença desse micro-organismo (FONSECA & SANTOS, 2000).

Rosec et al. (1997), detectaram presença de enterotoxinas estafilocócicas no leite e em produtos lácteos 73,7% toxina do tipo C em 61 amostras analisadas. NG & TAY (1993), estudaram amostras de leite cru e encontraram 32,45 % contaminado com *S. aureus* coagulase positivo.

Além das perdas econômicas, é importante salientar o aspecto de risco para a saúde pública dessas cepas produtoras de enterotoxinas e de toxina. A síndrome do choque tóxico é determinada mais frequentemente pela toxina do choque tóxico, porém as enterotoxinas do tipo B e C também podem ser implicadas (CHAPAVAL et al.,2010).

A ingestão de toxinas produzidas e liberadas pela *S. aureus* durante sua multiplicação no alimento, pode causar uma intoxicação alimentar estafilocócica, caracterizada clinicamente por náuseas, vômito, mal-estar, debilidade geral, diarreia, cefaléia e dor abdominal (MURRAY et al., 2006). Mas, apesar dos riscos

e da gravidade, os dados das incidências dos casos de intoxicação estafilocócica no Brasil, não são fiéis a realidade, devido a subnotificação das DTA's que ocorre no país pelos órgãos responsáveis pelo seu controle e notificação (BORGES et al., 2008).

#### **2.4.5 Fungos filamentosos e leveduras**

Os fungos filamentosos podem crescer numa margem de temperatura maior do que as bactérias, sendo que, a maioria são capazes de se multiplicar em alimentos refrigerados ou congelados (FRANCO & LANDGRAF, 2002).

O crescimento de fungos filamentosos é mais lento que as bactérias em alimentos de baixa acidez e alta quantidade de água, o que permite assegurar que dificilmente serão responsáveis pela deterioração desses alimentos. A presença de fungos e leveduras no leite cru praticamente é inexistente logo após a sua obtenção. Mas existem fatores que favorecem essa contaminação como por exemplo os utensílios mal higienizados, o corpo do animal e o meio ambiente, criando a possibilidade de deteriorar o alimento. Tornar-se um perigo à saúde pública devido à produção de micotoxinas. Portanto, a contaminação constitui causa mais freqüente de problemas sanitários, além das perdas econômicas. Pode-se concluir que a higiene e o controle do leite e produtos lácteos têm como objetivo básico assegurar a sua inocuidade ao consumidor (PADINHA et al., 2001).

#### **2.4.6 Psicotróficos**

O resfriamento do leite logo após a obtenção preserva a sua qualidade evitando sua deterioração, mas ocasiona outro problema ao leite, que é o aparecimento de micro-organismos psicotróficos.

Os micro-organismos psicotróficos são classificados como aqueles que têm a capacidade de se desenvolver em temperaturas entre 0° e 7° C, o que possibilita a sua multiplicação em alimentos refrigerados. A sua determinação avalia o grau de deterioração e vida útil nos alimentos conservados pelo frio (FRANCO & LANDGRAF, 2002).

Segundo Arcuri et al., (2008) são considerados os principais agentes de deterioração de leite cru refrigerado e de seus derivados. Tem ação deterioradora devido à produção de proteases e lípases que hidrolisam respectivamente a proteína e a gordura do leite que podem causar rancificação, mudança do odor, sabor de alguns produtos lácteos como o queijo e a manteiga e a gelatinização do leite UHT. Não sobrevivem à pasteurização, porém as enzimas hidrolíticas são termorresistentes, podendo resistir mesmo ao tratamento UHT e permanecerem ativas. Portanto, o estudo desses micro-organismos é de grande relevância por avaliar o grau de deterioração de alimentos refrigerados ou aqueles submetidos a tratamento térmico.

Bactérias psicrófilas representam cerca de 10% da microbiota total do leite cru quando produzido em condições normais de higiene (PINTO et al., 2006).

Os micro-organismos psicrófilos presentes no leite cru incluem bactérias gram-positivas e gram-negativas. Entre as bactérias gram-negativas o gênero *Pseudomonas* spp. é o mais frequente. Comumente são encontrados em água não tratada, solo e vegetais e são introduzidos no leite como resultado da contaminação dos equipamentos utilizados durante a ordenha e para o úbere e tetas a partir destas fontes (MOLINERI et al., 2012).

#### **2.4.7 *Escherichia coli***

É um bacilo Gram-negativo, não esporogênico, anaeróbio facultativo, sua temperatura ótima de crescimento está entre 30-37°C, pertencem a família Enterobacteriaceae, fermentam a glicose e ampla variedade de outros açúcares. São bactérias oxidase negativa, catalase positiva e crescem bem em Ágar MacConkey, porque não são inibidos pelos sais biliares presentes no meio (GONÇALVES et al., 2002).

Foi isolada pela primeira vez em 1885 por Teodor Escherich, e denominada inicialmente por *Bacterium coli commune*, a escolha desta denominação se deve ao fato desta bactéria ser encontrada no cólon. (KONEMAN et al., 2008).

O uso da *E.coli* como indicador de contaminação fecal ocorreu a partir de 1892 e até o momento é a fonte mais importante, dentro do grupo dos coliformes termotolerantes relacionada à segurança alimentar, pois, é um micro-organismo

encontrado no conteúdo intestinal do homem e animais, o que permite sinalizar se há contaminação fecal direta ou indireta nos alimentos (BRENER, 1984).

As linhagens patogênicas de *E.coli* são divididas de acordo com os mecanismos da patogenicidade e seus sintomas: as enterotoxigênicas (ETEC) são muito conhecidas por causar “diarréia dos viajantes”, o micro-organismo coloniza as proximidades do intestino delgado; as cepas enteropatogênicas clássicas (EPEC) causa em criança diarréia aquosa contendo muco em crianças, está presente em todo intestino; as cepas entero-hemorrágicas (EHEC) causam diarréia sanguinolenta, síndrome urêmica hemolítica e estão incluídas neste grupo os sorotipos O157,O26 e O111; as enteroagregativas (EAaggEC) causam diarréia de mais de 14 dias e produzem toxina termosensível; as enteroinvasivas (EIEC) causam febre e diarréia profusa contendo muco e sangue (FORSYTHE, 2002).

#### 2.4.7.1 *Escherichia coli* O157:H7

A *Escherichia coli* O157:H7 é um sorotipo da *E.coli* evoluiu a partir da EPEC e adquiriu os genes de *Sh.dysenteriae* via bacteriófago.Possuem características que as diferenciam de outras cepas como a não capacidade de utilizar sorbitol. Somente em 1983 ocorreu a primeira associação desta bactéria com infecção intestinal, quando epidemiologistas investigavam dois surtos de diarréia sanguinolenta provocada pela ingestão de hambúrgueres nos EUA. É considerado emergente apesar de sua incidência relativamente baixa, constitui sério risco à saúde, sendo, algumas vezes, fatal, principalmente para crianças e idosos (FOODBORNE, 2002).

A *E.coli* O157:H7 é um dos mais importantes micro-organismos responsáveis pelas DTA's, gerando um número considerado de vítimas de sua ação, principalmente paciente imunodeprimido, tem o bovino como o principal reservatório e o meio de transmissão mais comum é o consumo de alimentos contaminados, como carne cruas ou mal cozidas e leite cru (GONÇALVES et al., 2002).

É considerada um patógeno zoonótico, que raramente causa doença em animais. Existem relatos em ovinos, caprinos, búfalos e veados, já os suínos e aves de capoeira não são considerados portadores de EHEC. A epidemiologia desta doença, mudou bastante durante os últimos dez anos e um aumento do

número de veículos alimentares incomuns têm sido associados com infecções humanas, como a possibilidades de transmissão para pessoas durante visitas a fazendas e uma grande variedade de exposições relacionadas com o ambiente. (CAPRIOLI et al., 2005).

A sua ocorrência em número elevado principalmente em alimentos frescos de origem animal indica manipulação em condições de higiene precária ou armazenamento inadequado. A criação intensiva de animais também favorece a contaminação dos alimentos por este microorganismo, devido a possível contaminação dos rios e lençóis freáticos, pelas fezes dos animais e da circulação dessa bactéria no meio ambiente quando o esterco é usado como adubo (GONÇALVES et al., 2002).

Neste grupo inclui estirpes que produzem fatores citotóxicos descritos como verotoxinas (VTs) ou Shiga-like toxinas (SLTs) (DOYLE *et al.*, 1997). Dentre as cepas de *Escherichia coli* que produzem shigatoxinas, classificadas como *E. coli* shigatoxigênicas (STEC), existem algumas que são altamente patogênicas aos seres humanos, entre estas, encontram-se *E. coli* pertencentes aos sorogrupos O157, O111 e O113. Estes micro-organismos são considerados uma ameaça à saúde pública uma vez que, as patologias por eles provocadas são, geralmente, de natureza grave.

O envolvimento de *Escherichia coli* STEC em casos esporádicos e surtos de doenças pode está ligada a ingestão de leite e produtos lácteos. Como os ruminantes são portadores saudáveis, pode-se afirmar que as DTA's estão ligadas diretamente ao consumo de leite e dos produtos lácteos, por fornecerem a estas bactérias, condições favoráveis para o seu crescimento, tornando-se uma fonte potencial (FARROKH et al., 2013).

Existem muitos relatos indicando a associação entre o consumo de leite cru e a colite hemorrágica ou a síndrome hemolítica urêmica (KIRK et al., 1997). Em uma pesquisa realizada, no Reino Unido, Chapman et al. (1997), confirmaram o leite não tratado como fonte de *E. coli* O157:H7.

Até mesmo o leite tratado pode estar contaminado, se a pasteurização for inadequada ou ocorrer contaminação pós-pasteurização. Resultados obtidos por Katic & Radenkov (1998) indicaram que a *E. coli* O157:H7 sobrevive em leite pasteurizado, contaminado artificialmente com este sorotipo, mantido a 7°C e a 20°C, por mais de 21 dias.

Matthews et al., (1997), estudando a invasão das células epiteliais bovinas por *Escherichia coli* O157:H7 shigatoxigênica, observaram que todas *E. coli* O157:H7 isoladas demonstraram habilidade em penetrar nas células epiteliais da glândula mamária de bovinos. Este processo é importante, pois os bovinos podem, por meio desta via, contaminar o leite cru. Além disso, a localização intracelular da bactéria no tecido mamário pode servir como reservatório da bactéria para contaminação de trabalhadores, equipamentos e carcaças no momento do abate.

Estudos realizados por Randall et al., (1999) e por outros autores indicam que a *E.coli* shigatoxigênica O157:H7 (STEC) pode sobreviver por longos períodos no ambiente rural. Sendo assim, o ambiente da propriedade rural pode ser considerado como uma potencial fonte direta de contaminação para os seres humanos, como verificado por Rice et al. (1996) que constataram a presença da bactéria nas fezes de um garoto que apresentava severa diarreia sanguinolenta e estava diretamente ligado a criação do rebanho.

Em trabalho realizado no Rio de Janeiro, foi observada uma alta ocorrência (82%) de *E. coli* shigatoxigênica em rebanho leiteiro (CERQUEIRA et al., 1999). Além disso, a alta incidência de STEC em produtos cárneos crus, encontrada na cidade do Rio de Janeiro, pode representar um potencial risco à saúde pública (CERQUEIRA et al., 1997). Talvez, também se aplique em nosso país a afirmação de Swerdlow et al. (1992) de que as infecções, não só com *E.coli* O157:H7, mas também com O111 e O113, possam estar sendo subdiagnosticadas devido à falta de exames de fezes de rotina que detectem esses microorganismos.



## REFERÊNCIAS

ALVES, C. **Efeito de variações sazonais na qualidade do leite cru refrigerado de duas propriedades em Minas Gerais**, 2006 65f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ARCURI E.F.; SILVA P.D. L; BRITO M.A.V.P; BRITO J.R. F; LANGEI C.C.;MAGALHÃES M.A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v.38, Nº8, nov, 2008.

BORGES, M. F., ARCURI, E. F.; PEREIRA, J. L.; FEITOSA, T.; KUAYE, A. Y. *Staphylococcus* Enterotoxigênicos em Leite e Produtos Lácteos, suas Enterotoxinas e genes associados: Revisão. **B.CEPPA**, Curitiba v. 26, n. 1, p.71-86 jan./jun. 2008.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. RIISPOA. Decretonº2.244de04dejunhode1997. Disponível em:<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/servlet/VisualizarAnexo?id=14013>>. Acesso em: 03 de abril 2013.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Leite; Instrução Normativa, n.51 de 18 de setembro de 2002. Brasília. 95p.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa, n.62 de 26 de agosto de 2011. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis>> Acesso em: 10 JAN.2013.

BRENER, D.J. Facultatively anaerobic Gram-negative rods. In: KRIEG, NºR.; HOLT, J.G. **Bergey´s manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1984. Cap.7,p.408-423.

CAPRIOLI A.; MORABITO S.; BRUGÈRE H.; OSWALD E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Vet. Res.** 36 (2005) 289–311.

CERQUEIRA, A. M. F.; TIBANA, A.; GUTH, B. E. C. High occurrence of Shiga-like toxinproducing *Escherichia coli* isolated from raw beef products in Rio de Janeiro City, Brazil.**Journal of Food Protection**, Ames, v. 60, n. 2, p. 177-180, 1997.

CERQUEIRA, A. M. F. et al. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*(STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 70, p. 111-121, 1999.

CHAPMAN, P. A. et al. A one year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 119, p. 245-250, 1993.

CHAPAVAL, L. MOON, D.H. GOMES, J.E. DUARTE, F.R.; TSAI, S.M.; NASSUR, T. Efeito da temperatura sobre a produção de enterotoxina estafilocócica em leite. **Revista Higiene Alimentar**, v.24, p180-181, jan./fev.1999.

DOYLE, M.P.; ZHAO, T.; MENG, J. et al. *Escherichia coli* O157: H7. Foodborne pathogenic bacteria. In: **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. Washington, D.C.: Academic, 1997. p.171-191.

EVANGELISTA, J. Tecnologia de alimentos. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. 652p.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *S.aureus* e suas implicações em Saúde Pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1315-1320, jul./ago., 2004.

FAGUNDES, C. M.; FISCHER, V.; SILVA, W. P. CARBONERA, N.; ARAÚJO, M. R. Presença de *Pseudomonas* spp em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 568-572, 2006.

FARROKH C; JORDAN K.; AUVRAY F., GLASS K.; OPPEGAARD H.; Sabrina RAYNAUD S.; THEVENOT D.; CONDRON R.; REU K., GOVARIS A.; HEGGUM K.; HEYNDRIX M.; HUMMERJOHANN, J.; LINDSAY D.; MISZCZYCHA S.; MOUSSIEGT S.; VERSTRAETE K.; CERF O. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*(STEC) and their significance in dairy production. **International Journal of Food Microbiology** 162 (2013) 190–212.

FONSECA, L.F.L. DE SANTOS, M.V.dos. Resíduos de antibióticos e qualidade do leite. In \_\_\_\_\_. Qualidade do leite e controle da mastite. Lemos editorial, 2000. Cap.16 p.169-175.

FOODBORNE diseases, emerging. World Health Organization, Janeiro de 2002. Disponível em: <[www.who.int/mediacentre/factsheets/fs124/en](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs124/en)> Acessado em: 30 out. 2013.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Ed.Artmed, 2002.

FRANCO,B.D.G. M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 1996, p.27-31.

FRAZIER, W. C. **Microbiologia de los alimentos**. Acribia, 4ªed. Zaragoza, España, 681p. 1993.

GONÇALVES, RMS; FRANCO RM. Determinação da carga microbiana em leite pasteurizado tipos "B"e "C", comercializados na cidade do Rio de Janeiro. São Paulo, **Rev. Hig. Alim**1998; 12 (53): 61-6.

GONÇALVES, E.S; MARQUES, M.H. M; LUCCA, PSR. A segurança alimentar e os consumidores: um breve histórico sobre A *Escherichia coli*. **Revista CESUMAR-Ciências Humanas e Sociais Aplicadas** v.7, Nº1, dezembro/2002.

IFT, Institute of Food Science and Technology, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Produção Agropecuária 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Censo Agropecuário 2011.

JAY, J.M.; **Microbiologia de Alimentos**. 6.ed.Porto Alegre:ARMED,2005.711p.

KATIC, V.; RADENKROV, S. The fate of *Escherichia coli* O157:H7 in pasteurized milk. *Acta Veterinaria*. Belgrad, v. 48, n. 5-6, p. 345-350, 1998.

KIRK, J. H.; PRICE,S.; WRIGHT, J. C. *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *Large Animal Practice*. v. 18, n. 2, p. 16-19, 1997..

KONEMAN, E.W. ALLEN,S.D.; JANDA,W.M.; SCHERECKENBERGER,P.C.; WINN,W.C. **Diagnóstico microbiológico-texto e atlas colorido**.6 ed.Rio de Janeiro:Guanabara Koogan,2008.1760p.

LORENZETTI, D.K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismo psicotrópicos no leite cru de dois estados da região sul**.2006.71f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MATTHEWS, K. R.; MURDOUGH, P. A.; BRAMLEY, A. J. Invasion of bovine epithelial cells by verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157: H7. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v. 82, p. 197-203, 1997.

MIRANDOLA, A. **Panorama atual da cadeia produtiva do leite no Brasil.**2006.73f. Monografia (Especialização Latu Senso). Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, 2006.

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

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

MURRAY. P.R.:ROSENTHAL, K.S. PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. Elsevier: Rio de Janeiro.2006.979p.

NG, D.L.K.; TAY, L. Enterotoxigenic strains of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* in drinks and ready to eat foods. **Food Microbiol**, v.10, p.317-320, 1993.

PADINHA M. R. F. et al. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 34(2): 167-171, mar-abr, 2001.

PINTO, C.LO; MARTINS M.L. VANETT M.C. D; Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas;**Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26(3): 645-651, jul.-set. 2006.

PRATA, L. F. Fundamentos de ciência do leite. São Paulo: Unesp, 2001. 289p.

RENWICK, S. A.; WILSON, J. B.; CLARKE, R. C. Evidence of direct transmission of *Escherichia coli* O157: H7 infection between calves and a human. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 168, p. 792-793, 1993.

RANDALL, L. P.; WRAY, C.; DAVIES, R. H. Survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 under simulated farm conditions. **Veterinary Record**, London, v.145, p. 500-501, 1999.

RICE, D. H. et al. *Escherichia coli* O157 infection in a human linked to exposure to infected livestock. **Veterinary Record**, London, v. 138, p. 311, 1996.

RIEDEL, G. **Controle sanitário de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1992. 320 p.

ROSEC, J.P. et al. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *Int J Food Microbiol*, v.35, p.213-221, 1997.

SILVA, Neusely da. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. Valéria Christina Amstalden - São Paulo: Livraria Varela,1997, p31

SWERDLOW, D. L. et al. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 117, n. 10, p. 812-819, 1992.

TEBALDI, V.M.R.; OLIVEIRA, T.L.C. BOARI, C.A. PICCOLI, R.H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru proveniente de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n3, p753-760, jul/set. 2008.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R., CASE, C.L.; **Microbiologia**. 8 ed., Porto Alegre: Artemed, 2005, 894p.

TRABULSI, L.R.: ALTERTHUM. F **Microbiologia**. 4.ed. Atheneu, 2004.175.p

ZECCONI, A.; HAHN, G. Staphylococcus aureus in raw milk and human health risk. **Bulletin of IDF**, v.345, p.15-18, 2000.

ZOCCAL R. Quantos são os produtores de leite no Brasil? Panorama do leite On line. EMBRAPA. Centro de Inteligência do leite. Ano 6 no 64 - Março 2012.  
Disponível: [http://www.cileite.com.br/sites/default/files/Conjuntura\\_2012\\_03.pdf](http://www.cileite.com.br/sites/default/files/Conjuntura_2012_03.pdf).

## CAPÍTULO 1

### **CONTAGEM DE MICROORGANISMOS INDICADORES EM LEITE CRU OBTIDOS POR ORDENHA NÃO MECANIZADA E MECANIZADA DE PROPRIEDADES DO RECÔNCAVO BAIANO<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Parte do Capítulo foi submetido ao comitê editorial e avaliação do periódico Ciência Rural.

## CONTAGEM DE MICROORGANISMOS INDICADORES EM LEITE CRU OBTIDOS POR ORDENHA NÃO MECANIZADA E MECANIZADA EM PROPRIEDADES DO RECÔNCAVO BAIANO.

**Autora:** Aline Batista Sandes

**Orientadora:** Ludmilla Santana Soares e Barros

**RESUMO:** O leite devido sua composição rica em nutrientes, favorece a proliferação de micro-organismos, juntamente com as falhas na ordenha. Por isso, o leite deve ser sempre objeto de estudos microbiológicos, para conhecer a sua real condição de higiene. Esse trabalho teve como objetivo determinar as contagens mesófilos aeróbios, fungos filamentosos e leveduras, psicrotróficos e *Staphylococcus* coagulase positivo em leite cru obtido por ordenha não mecanizada e mecanizada em propriedades do Recôncavo Baiano e avaliar as propriedades quanto a higiene da ordenha e a sanidade do rebanho. Os resultados encontrados foram 90% das 18 propriedades não mecanizadas apresentavam falhas na higiene e limpeza da ordenha, somente 01 mecanizadas apresentou falhas nos procedimentos de higiene e limpeza na ordenha. Das amostras de leite provenientes de ordenha não mecanizadas 5,55%, atendem a IN 51 e apenas 25% da ordenha mecanizada. Quanto aos fungos filamentosos e leveduras os resultados variaram de  $7,0 \times 10^3$  UFC/mL a  $4,0 \times 10^9$  UFC/mL em amostras de leite provenientes de ordenha não mecanizada e de  $<1,0 \times 10^1$  UFC/mL a  $1,9 \times 10^7$  UFC/mL de ordenha mecanizada. Nas amostras provenientes de ordenha não mecanizada não foi verificado a presença de micro-organismos psicrotróficos, assim como cinco das amostras de leite obtidas por ordenha mecanizada, enquanto nas demais amostras os resultados variaram de  $3,4 \times 10^5$  UFC/mL a  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL Neste estudo não foi encontrada a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva.

**Palavras-chave:** mesófilos aeróbios, fungos filamentosos e leveduras, psicrotróficos e *Staphylococcus* coagulase positiva, leite *in natura*.

## COUNT OF MICROORGANISMS IN MILK OBTAINED BY MILKING MECHANIZED AND MECHANIZED NOT OF RECONCAVO BAIANO.

**Author: Aline Batista Sandes**

**Advisor: Ludmilla Santana Soares e Barros**

**ABSTRACT:** The milk because its composition is rich in nutrients, favoring the proliferation of microorganisms along with gaps in milking. By isse, milk should always be subject to microbiological studies, exploring its real hygienic condition. This study aimed to determine the mesophilic aerobic counts, yeasts and molds, psychrotrophic and coagulase positive *Staphylococcus* in raw milk obtained by non-mechanized and mechanized milking in the Reconcavo Baiano and evaluate properties as the hygienic- sanitary milking and the health of the herd. The results were 90 % of 18 non-mechanized properties presented failures in hygiene and cleanliness of milking, only 01 had flaws in mechanized procedures of hygiene and cleanliness in milking. Samples of milk from milking not mechanized 5.55%, IN 51 and meet only 25 % of mechanized milking. As for yeasts and the results ranged from  $7.0 \times 10^3$  CFU / mL to  $4.0 \times 10^9$  CFU / ml in milk samples from non-mechanized milking and  $<1.0$  to  $1.9 \times 10^1$  CFU/mL  $\times 10^7$  CFU/mL mechanized milking. In the samples from non-mechanized milking has not established the presence of psychrotrophic micro-organisms, as well as five of the milk samples obtained by mechanized milking , while in other samples the results vary from 3.4 to  $1.0 \times 10^5$  CFU/mL  $\times 10^7$  CFU/mL this not study the presence of coagulase positive *Staphylococcus*.

**Keywords:** aerobic mesophilic, filamentous fungi and yeasts, and *Staphylococcus* coagulase positive psychrotrophic, fresh milk .



## 1. INTRODUÇÃO

Todos os alimentos são passíveis de contaminação através da ação dos micro-organismos patogênicos ou pelas suas toxinas podendo ocasionar DTA's. assim como o leite, devido sua composição ser rica em nutrientes que favorecem a proliferação de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Sendo sua qualidade definida através de parâmetros da sua composição química, características físico-químicas e de higiene.

Até o momento de ser excretado nos alvéolos da glândula mamária sadia o leite é estéril, existindo grande possibilidade de sofrer contaminação microbiológica devido a falhas durante a ordenha, processamento, transporte, superfícies e utensílios ou do próprio ambiente contaminado. Todos esses fatores favorecem diretamente o crescimento de micro-organismos patogênicos, podendo atingir números da ordem de milhões de bactérias por mL.

Os principais grupos dos patogênicos são: os mesófilos, que se multiplicam rapidamente quando o leite não é armazenado sob refrigeração e os psicotróficos, que se multiplicam em temperaturas baixas.

Devido a existência de falhas ligadas a temperaturas inadequadas de conservação, comumente pode ocorrer a existência de produtos lácteos com características microbiológicas fora dos padrões regulamentares. Portanto é muito difícil se obter um leite livre de contaminantes. Por essa razão a legislação define parâmetros aceitáveis, com base nas alterações que determinado número de micro-organismos podem causar ao leite e seus derivados, servindo a sua presença como indicador das condições sanitárias em que o leite foi obtido até o chegar ao consumo.

Por esta razão, o leite deve ser sempre objeto de estudos microbiológicos, que irão refletir a sua real condição higiênica relacionadas com a produção, armazenamento, transporte e manuseio, com a finalidade de diminuir a ocorrência das chamadas DTA's.

### 1.1 OBJETIVO

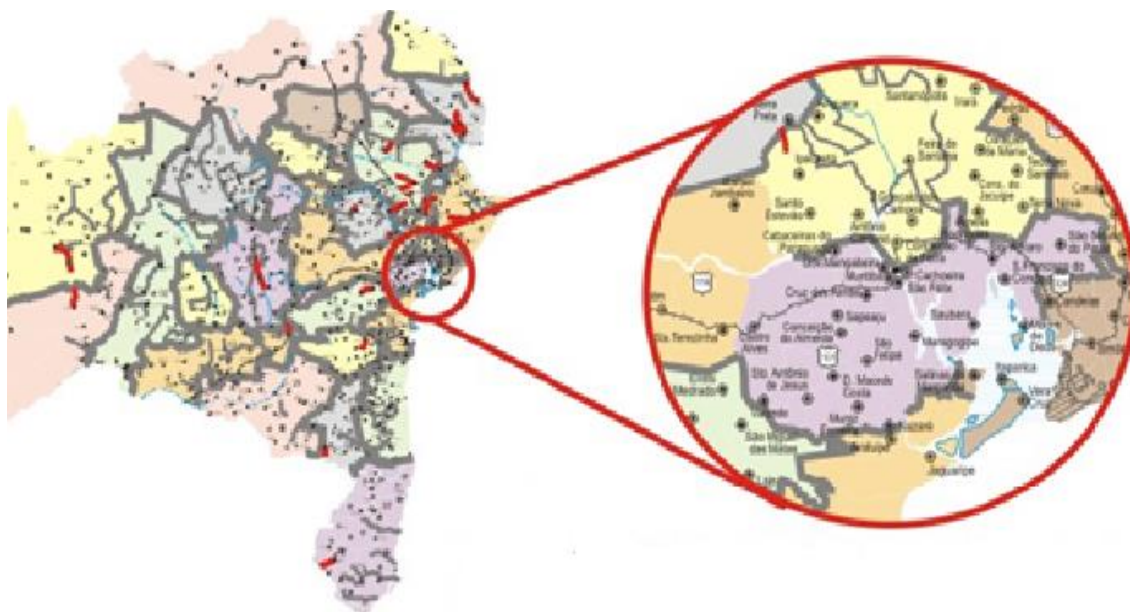
- Determinar as contagens de microorganismos mesófilos aeróbios, fungos filamentosos e leveduras, psicotróficos e *Staphylococcus* coagulase positivo em leite cru obtidos por ordenha não mecanizada e mecanizada na região do

Recôncavo Baiano, avaliando as propriedades fornecedoras das amostras de leite.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Coleta de Amostras

As amostras de leite *in natura* foram coletadas no período de novembro de 2012 a abril de 2013, em 26 propriedades leiteiras na região do Recôncavo Baiano, nos municípios de Teodoro Sampaio, Belém-Distrito de Cachoeira, São Gonçalo, Conceição de Feira e São Francisco do Conde.



**Figura1: Mapa da Bahia com destaque para a região do Recôncavo Baiano.**

Inicialmente foram divididas em 02 grupos de estudo, 18 propriedades em que se encontraram fazendas com ordenhas não mecanizadas (as amostragens foram realizadas diretamente dos latões nas propriedades, em pontos de coletas ou caminhão transportador e 08 propriedades com ordenhas mecanizadas (Figura 2) as amostragens foram retiradas diretamente do tanque de expansão, onde às medidas profiláticas de controle de qualidade higiênica do leite eram rigorosas e realizadas diariamente.

Das 18 propriedades não mecanizadas aproximadamente 80% dos animais são mestiços mantidos a pasto, e ordenhados uma vez ao dia, produzem em média de 66,6 litros/dia, com sistema “balde ao pé” e com a presença de bezerro. O leite é mantido em latões alguns plásticos e outros de metal e recolhido diariamente pela manhã pelo caminhão transportador ou levados diretamente até a propriedade um.

Foram aplicados questionários individuais em cada propriedade, com o objetivo de conhecer as condições higiênicas antes, durante e após o processo de ordenha e a sanidade dos animais. Contendo as seguintes informações: tipo de ordenha; horário das ordenhas; volume de produção; origem da água e se a mesma era clorada ou não; como era realizada a limpeza do estábulo; dos equipamentos; de tetos e do ordenhador. Adicionalmente foi realizado um levantamento sobre a sanidade das vacas e das técnicas de armazenagem do leite pós-coleta.

Em cada propriedade foi coletada 500 mL de leite *in natura* (01 amostra da ordenha matinal), sendo imediatamente armazenadas em frascos estéreis devidamente identificados com nome da propriedade e a data de coleta. Em seguida, as amostras foram transportadas em caixas de isopor com gelo e enviadas para o laboratório de microbiologia do Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas (CAABB) da Universidade Federal do Recôncavo Baiano (UFRB), onde foram mantidas sob refrigeração e imediatamente submetidas as análises microbiológicas.



**Figura 2. Sala específica para ordenha mecanizada.**  
Fonte: Arquivo pessoal

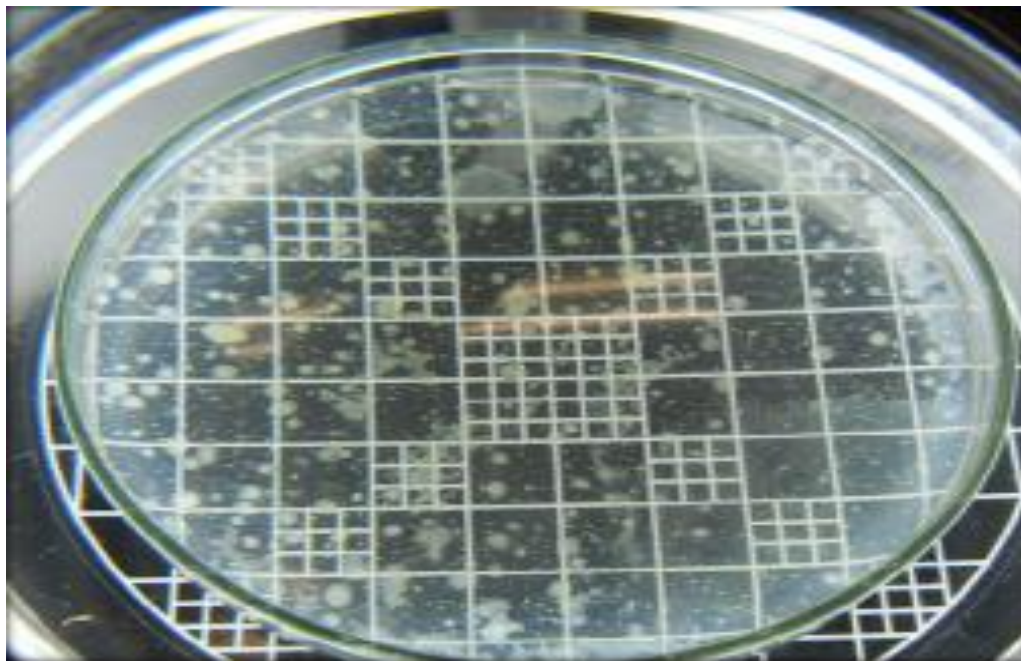
## 2.2 Contagem de Mesófilos Aeróbios

As amostras foram homogeneizadas e em seguida retirou-se uma alíquota de 1mL de cada amostra de leite *in natura*, onde foi preparada diluições em série de  $10^0$  a  $10^{-8}$  de leite diluído em 9 mL de solução salina peptonada a 0,1%.

Posteriormente, foi retirado 1mL das diluições sequenciais e transferidas para placas de Petri em duplicata, onde verteu-se 25 mL de Ágar Contagem Padrão (ACP) fundida anteriormente a 45° C, depois, as placas foram suavemente homogeneizadas, numa superfície plana, com movimentos circulares suaves, em forma de “8”. Após a solidificação à temperatura ambiente, as placas foram invertidas e incubadas em estufa a 35°C, por 48±3 horas.

A contagem foi efetuada em um contador de colônias (modelo CP 608, Phoenix – Araraquara, Brasil) (Figura 3) restringindo-se àquelas placas que apresentaram crescimento no intervalo de no mínimo 25 e no máximo 250 unidades formadoras de colônias (UFC) por placa e os resultados foram obtidos através da média do número de colônias encontrados nas placas de Petri

expresso em unidades formadoras de colônia por mL de amostra (UFC/mL) (APHA, 2001; BRASIL, 2003).

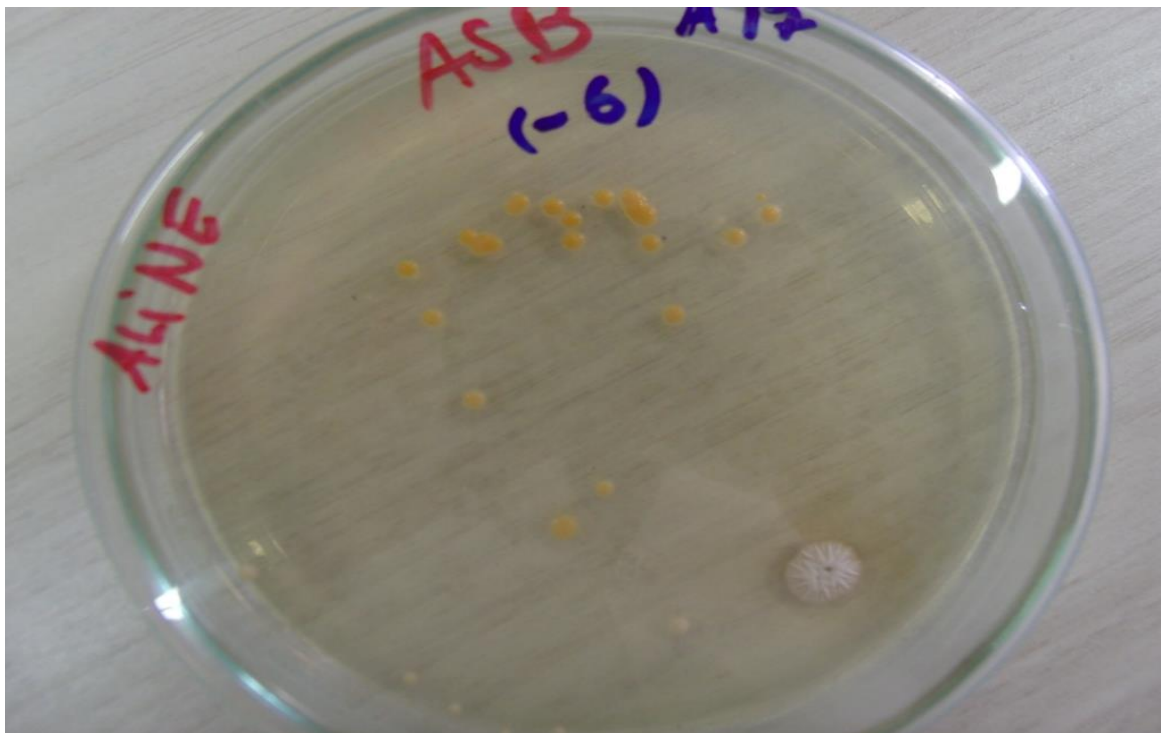


**Figura 3: Contador de colônias - mesófilos aeróbios.**

Fonte: Arquivo pessoal

### 2.3 Fungos Filamentosos e Leveduras

A partir de 1mL de cada amostra de leite cru foram preparadas diluições seriadas, empregando-se como solução diluidora 9 mL de solução salina peptonada a 0,1%. Em seguida, 0,1mL das diluições sequencias foram inoculadas sobre a superfície contendo Ágar Sabouraud (ASB) (Figura 4). A incubação das placas foi realizada em temperatura de  $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 7 e 15 dias em incubadora BOD (demanda bioquímica de oxigênio). A leitura foi efetuada no sétimo dia e no décimo quinto dia nas placas que continham entre 30 e 350 colônias (BRASIL, 2003).



**Figura 4. Placa de Petri colônias contendo fungos filamentosos e leveduras.**

Fonte: Arquivo pessoal

#### **2.4 Contagem de Psicotróficos**

A partir de 1mL de cada amostra de leite cru foram preparadas diluições seriadas, empregando-se como solução diluidora 9 mL de solução salina peptonada a 0,1%. Em seguida, 0,1mL das diluições seqüenciais, foram inoculadas sobre a superfície contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA). A incubação foi realizada em temperatura de  $8^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  por cinco dias (BRASIL, 2003).

A contagem das placas efetuou-se em um contador de colônias (modelo CP 608, Phoenix – Araraquara, Brasil), observando o intervalo de no mínimo 25 e no máximo 250 unidades formadoras de colônias (UFC) por placa e os resultados foram obtidos através da média do número de colônias encontrados nas placas de Petri expresso em unidades formadores de colônia por mL de amostra (UFC/mL) (APHA, 2001; BRASIL, 2003).

## 2.5 Pesquisa de *Staphylococcus aureus*

A partir de 1mL de cada amostra de leite cru foram preparadas diluições seriadas empregando-se como solução diluidora 9 mL de solução salina peptonada a 0,1%. Em seguida, 0,1 mL das diluições seqüenciais foram inoculadas sobre a superfície contendo Ágar Baird-Parker. A incubação foi realizada em temperatura de  $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  de 24 a 48 horas. Foram selecionadas cinco colônias típicas (negras brilhantes com anel opaco, rodeadas por halo claro) e cinco colônias atípicas para semeadura em tubos contendo Brain Heart Infusion (BHI), a incubação foi realizada em temperatura de  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas (BRASIL, 2003).

### 2.5.1 Prova da coagulase

Foi transferido 0,3 mL de cada tubo de cultivo em BHI, em tubos estéreis contendo plasma de coelho. A incubação foi realizada em temperatura de  $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 6 horas. Verificou-se a presença de coágulos e observou-se os seguintes critérios:

Reação 1+: coágulo pequeno e desorganizado.

Reação 2+: coágulo pequeno e organizado.

Reação 3+: coágulo grande e organizado.

Reação 4+: coagulação de todo conteúdo do tubo que não se desprende quando o mesmo é invertido.

A presença de *Staphylococcus aureus* foi determinada quando a reação for do tipo 3+ e 4+. Quando houver reação 1+ e 2+ os tubos foram repicados em caldo BHI para realização de testes complementares (coloração de Gram, termonuclease, catalase).

## 2.6 Análise Estatística

A análise de variância dos resultados e as médias dos mesmos foram comparadas pelo teste de Tukey, ao final de 5% de probabilidade (BANZANATTO & KRONKA, 1992).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com análise dos questionários aplicados (Tabela 2) *in loco* antes da coleta das amostras de leite, as propriedades apresentaram práticas distintas de higiene, onde 90% das 18 propriedades não mecanizadas pesquisadas apresentavam falhas nos procedimentos de higiene e limpeza antes da ordenha, a exemplo utilização de água não tratada e não clorada e o não uso de toalhas descartáveis.

Com relação aos cuidados profiláticos de doenças todas as propriedades não mecanizadas vacinavam seus animais contra Febre Aftosa, Brucelose e Raiva. Com base nas informações, 16 das 18 propriedades só requisitavam o Médico Veterinário caso houvesse problemas atípicos. Estas não faziam o controle do uso de vermífugos e de carrapaticidas, já as duas propriedades que recebem a visita mensal do Médico Veterinário agendavam períodos, doses e princípio ativo tanto do vermífugo quanto do carrapaticida a serem utilizados.

Quando questionados em relação à presença de mastite nos animais, todos os ordenhadores disseram que raramente ocorre, mesmo tendo constatado que o teste para este diagnóstico não era realizado rotineiramente. Relatou-se que em todas as propriedades executavam-se práticas de limpeza dos utensílios e dos equipamentos e higienização dos tetos das vacas, porém o que na prática observou-se foi que a água utilizada não era de fonte segura, não era realizada a cloração desta água nem controle microbiológico, sendo na maioria das propriedades proveniente de poços artesianos e/ou aguadas onde se coletava com vasilhames sem higienização adequada, além também de serem utilizadas pelos animais das propriedades.

Em 15 propriedades não mecanizadas os ordenhadores não utilizavam qualquer tipo de uniforme especial para a função, e as práticas de higienização dos tetos e dos utensílios eram realizadas de forma inadequada e sem critérios, principalmente por que não usavam papel toalha descartáveis e sim panos reutilizáveis. Somente em uma propriedade rural foi observada a presença de sanitário próximo ao estábulo.

Com relação aos animais que pertencem as 08 propriedades mecanizadas estes, são mais selecionados quando comparados ao sistema anterior. Recebem ração e suplementos minerais nos cochos e tem acesso ao pasto. Produzem em



média 8.000 L/dia, a ordenha é realizada duas vezes ao dia em sala específica, com sistema fechado. O leite obtido é refrigerado em tanque de expansão e a cada 02 dias transportado por um caminhão isotérmico.

Constatou-se que somente uma das 08 propriedades mecanizadas pesquisadas, havia falhas nos procedimentos de higiene e limpeza antes, durante a ordenha. Em relação aos cuidados profiláticos de doenças e parasitoses, foi relatado que todas as propriedades vacinavam seus animais contra Febre Aftosa, Brucelose e Raiva e tinham maior controle das doses de vermífugo e de carrapaticida que são utilizados além de possuírem assistência mensal do Médico Veterinário.

Com relação ao controle de mastite todos os ordenadores disseram que raramente ocorre e afirmaram categoricamente que fazem o teste para este diagnóstico diariamente. Foi verificado no estudo que a maioria das propriedades executavam práticas de limpeza dos utensílios e dos equipamentos e higienização dos tetos das vacas, utilizando pastilhas de cloro e as teteiras com álcool iodado além da utilização de papel toalha descartável. A água utilizada era na maioria proveniente de poços artesianos.

Todos os ordenadores utilizavam uniforme especial para a função e tinham sanitários a sua disposição nos estábulos.

**Tabela 2.** Resultados do questionário aplicados nas propriedades não mecanizada e mecanizada do Recôncavo Baiano.

| Características        | Ordenha não mecanizada      | Ordenha mecanizada |
|------------------------|-----------------------------|--------------------|
| Pré-dipping            | 90% faz mais com restrições | 100% faz           |
| Diagnóstico preventivo | 90% Não realiza             | 100% Realiza       |
| Número de ordenha      | 01                          | 02                 |
| Higienização das tetas | 90% insuficiente            | 90% suficiente     |
| Resfriamento do leite  | 90% não resfriam            | 100% resfriam      |
| Água tratada           | 90% não tinham              | 100% tinham        |

|                           |                         |                           |
|---------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Vermífugo e carrapaticida | 80% não tinham controle | 100% utiliza com controle |
| Uso de vacina             | Sim                     | Sim                       |
| Produção de leite         | 66,6 litros /dia        | 8.000 litros /dia         |
| Armazenamento do leite    | 90% Latões plásticos    | 100% Tanque de expansão   |
| Uso de uniforme           | 80% não utilizam        | 100% utilizam             |

Segundo as Tabelas 3 e 4, a contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios do leite obtido através de ordenha não mecanizada variou de  $5,0 \times 10^4$  UFC/mL a  $2,5 \times 10^9$  UFC/mL, enquanto para o leite obtido mediante ordenha mecanizada variou de  $3,0 \times 10^4$  UFC/mL a  $9,0 \times 10^7$  UFC/mL, demonstrando que no leite obtido através ordenha não mecanizada os valores encontrados foram superiores, tendo em vista que as amostras de leite foram coletadas diretamente do caminhão transportador e dos latões, em temperatura ambiente, além das condições higiênico-sanitárias inadequadas durante o processo da ordenha e transporte podem ter influenciado nos resultados. Ainda nas mesmas Tabelas 3 e 4 observa-se que não houve diferença estatística ao nível de 5% entre os dois sistemas de ordenha.

**Tabela 3.** Micro-organismos indicadores em leite cru obtidos por ordenha não mecanizadas de propriedades do Recôncavo Baiano, entre os meses de novembro de 2012 a abril de 2013.

| Propriedades | Mesófilos aeróbios<br>(UFC/mL) | Bolores e leveduras (UFC/mL) |
|--------------|--------------------------------|------------------------------|
| 01           | $5,8 \times 10^6$ Aa           | $1,2 \times 10^6$ Aa         |
| 02           | $2,5 \times 10^9$ Aa           | $4,0 \times 10^9$ Aa         |
| 03           | $5,4 \times 10^6$ Aa           | $2,0 \times 10^5$ Aa         |
| 04           | $4,9 \times 10^6$ Aa           | $4,0 \times 10^5$ Aa         |
| 05           | $2,1 \times 10^5$ Aa           | $4,0 \times 10^5$ Aa         |
| 06           | $2,7 \times 10^5$ Aa           | $2,8 \times 10^6$ Aa         |
| 07           | $3,4 \times 10^7$ Aa           | $7,0 \times 10^3$ Aa         |

|    |                         |                        |
|----|-------------------------|------------------------|
| 08 | 4,2X10 <sup>7</sup> Aa  | 2.1X10 <sup>8</sup> Aa |
| 09 | 9,3X10 <sup>6</sup> Aa  | 4,0x10 <sup>3</sup> Aa |
| 10 | 6,8X10 <sup>6</sup> Aa  | 1,0X10 <sup>4</sup> Aa |
| 11 | 2,6 X10 <sup>8</sup> Aa | 1,3X10 <sup>4</sup> Aa |
| 12 | 3,0X10 <sup>5</sup> Aa  | 1,5X10 <sup>4</sup> Aa |
| 13 | 8,1X10 <sup>7</sup> Aa  | 1,9x10 <sup>6</sup> Aa |
| 14 | 3,0X10 <sup>6</sup> Aa  | 8,0x10 <sup>5</sup> Aa |
| 15 | 7,6X10 <sup>7</sup> Aa  | 3,0X10 <sup>7</sup> Aa |
| 16 | 4,9X10 <sup>6</sup> Aa  | 1,0x10 <sup>7</sup> Aa |
| 17 | 5,0x10 <sup>4</sup> Aa  | 7,5x10 <sup>5</sup> Aa |
| 18 | 6,0x10 <sup>5</sup> Aa  | 4,0x10 <sup>4</sup> Aa |

Em cada linha valores seguidos de letras maiúsculas diferentes diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%. Em cada coluna valores seguidos de letras minúsculas diferentes diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

**Tabela 4.** Microorganismos indicadores em leite cru obtidos por ordenha mecanizadas de propriedades do Recôncavo Baiano, entre os meses de novembro de 2012 a abril de 2013.

| Fazendas | Mesófilos<br>Aeróbios<br>(UFC/mL) | Bolores e<br>Leveduras<br>(UFC/mL) | Psicrotróficos<br>(UFC/mL) |
|----------|-----------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| 19       | 3,0x10 <sup>4</sup> Aa            | 3.0x10 <sup>5</sup> Aa             | <1,0x10 <sup>1</sup>       |
| 20       | 6,0 x10 <sup>4</sup> Aa           | 2,0x10 <sup>5</sup> Aa             | <1,0x10 <sup>1</sup>       |
| 21       | 9,0 x10 <sup>7</sup> Aa           | 7,0x10 <sup>5</sup> Aa             | <1,0x10 <sup>1</sup>       |
| 22       | 1,1x10 <sup>7</sup> Aa            | 6,3x10 <sup>6</sup> Aa             | 1,0X10 <sup>7</sup>        |
| 23       | 8,3x10 <sup>5</sup> Aa            | 7,4x10 <sup>6</sup> Aa             | 7,7X10 <sup>5</sup>        |
| 24       | 9,2x10 <sup>6</sup> Aa            | <1,0x10 <sup>1</sup> Bb            | <1,0x10 <sup>1</sup>       |
| 25       | 4,2x10 <sup>5</sup> Aa            | 4,5x10 <sup>5</sup> Aa             | 3,4X10 <sup>5</sup>        |
| 26       | 7,2x10 <sup>6</sup> Aa            | 1,9x10 <sup>7</sup> Aa             | <1,0x10 <sup>1</sup>       |

Em cada linha valores seguidos de letras maiúsculas diferentes diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%. Em cada coluna valores seguidos de letras minúsculas diferentes diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

De acordo a IN 62 apenas 5,55% das amostras de leite obtidas através de ordenha não mecanizadas atenderam a esta legislação, enquanto para o leite produzido mediante ordenha mecanizada 25% estão de acordo com os parâmetros exigidos, que é  $3,0 \times 10^5$  UFC/mL (BRASIL, 2011).

Badini et al. (1996) nos municípios de Botucatu e de São Manuel, em São Paulo, verificaram a ocorrência de 8,3% e 83,3% respectivamente em amostras com contagens de micro-organismos mesófilos e de coliformes totais acima dos limites máximos permitidos e a presença de 50,0% e 18,3% amostras contaminadas por cepas de *Staphylococcus coagulase positiva* e por coliformes fecais, respectivamente. Apenas 8,3% das amostras mostraram-se dentro dos referidos padrões legais.

Em Brasília, DF, das 1.030 amostras coletadas, 23% do leite tipo C dessa amostragem foram reprovados. Os dados demonstraram que a contaminação do leite ocorria, em 48,4% das vezes, nas propriedades, em 22,5% nos caminhões usados no transporte da matéria-prima até os entrepostos e em 28,7% nos pontos de venda do leite (GONTIJO, et al.,1998). Beloti et al. (1999) em Cornélio Procópio, Paraná pesquisando 42 amostras de leite cru comercializado, encontraram 59,52% das amostras com contagem de mesófilos acima do permitido.

Catão et al. (2001) avaliando dois grupos que foram classificadas como amostras antes e pós mudança no processo de higienização da usina observaram elevada contaminação nas amostras de leite nas duas épocas. Em Salvador (BA), foram avaliadas 20 amostras de leite no comércio varejista. Os resultados mostraram que 13 amostras apresentaram um número de bactérias aeróbias mesófilas variando de  $10^2$  a  $10^6$  UFC/mL (LEITE et al., 2002).

Santos & Bergmann (2003) pesquisando amostras de leite cru transportado em temperatura ambiente, encontraram 57,6% das amostras com contagens de  $7,0 \times 10^6$ . Machado et al. (2006) estudando a CBT de amostras de leite cru refrigerado em Santa Catarina encontraram médias geométricas superiores a um milhão de UFC/mL em todos os meses pesquisados no período de outubro de 2005 a junho de 2006.

Dürr (2006), detectou valores entre 31,9% a 64,4% de amostras de leite cru no Estado do Rio Grande do Sul em desacordo com a legislação para Contagem Bacteriana Total.

Em análise de amostras de tanques de expansão individuais e comunitários demonstram-se variação entre as contagens de bactérias mesofílicas nas amostras coletadas em tanques individuais  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL a  $3,0 \times 10^6$  UFC/mL. Os autores sugeriram que, em algumas propriedades, as práticas higiênicas utilizadas não garantiram uma contagem baixa do leite estocado sob-refrigeração (PINTO et al., 2006).

Foi realizado um trabalho através de questionário sobre características de produção, ordenha e cuidados sanitários em 60 propriedades leiteiras localizadas na região de Viçosa, MG – Brasil com contagem de aeróbios mesófilos foi abaixo de parâmetros nacionais e internacionais (BRASIL, 2006). De acordo com a IN 51, o padrão de qualidade microbiológica adotado para o leite cru refrigerado atualmente na região Sudeste é uma contagem de aeróbios mesófilos máxima de  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, e 47 (78,3%) as amostras coletadas apresentaram contagens abaixo desse valor (NERO et al., 2009).

Em relação a fungos filamentosos e leveduras os resultados encontrados variaram de  $7,0 \times 10^3$  UFC/mL a  $4,0 \times 10^9$  UFC/mL em amostras de leite provenientes de ordenha não mecanizada enquanto que o leite obtido através de ordenha mecanizada os resultados variaram de  $<1,0 \times 10^1$  UFC/mL a  $1,9 \times 10^7$  UFC/mL (Tabelas 3 e 4). Apesar da legislação não preconizar exigências com relação a estes micro-organismos os resultados obtidos são de grande relevância, pois indicam as condições higiênico-sanitárias em que foi produzido o leite. Na tabela 4 observa-se diferença significativa ao nível de 5%, na propriedade 24 onde o leite foi obtido através de sistema de ordenha mecanizada e mostrou valores baixos de bolores e leveduras.

Melville et al. (2006), verificou uma média de  $14 \times 10^2$  UFC mL<sup>-1</sup> para fungos em dez amostras de leite cru comercializado, informalmente e sem fiscalização, no interior do Estado de São Paulo. Citadin et al. (2009) em leite refrigerado obtidos de tanque de expansão e de latões encontraram contagens que variaram de  $5,5 \times 10^1$  a  $1,2 \times 10^5$  UFC/mL e 64,51% das amostras apresentaram contagem acima de 100 UFC/mL, indicando higiene insatisfatória durante o processo de obtenção e deficiências do equipamento de ordenha..

Machado et al. (2012), no município de Parintins Estado do Amazonas, em três grupos denominados A, B e C encontraram os seguintes resultados médios para leveduras, em UFC mL<sup>-1</sup>, foram  $2,1 \times 10^3$  no grupo A,  $2,5 \times 10^3$  no grupo B e

$1,0 \times 10^4$  para o grupo C, enquanto que as médias de bolores foram de  $4,5 \times 10^1$  para o grupo A,  $13,0 \times 10^1$  para o grupo B e  $5,0 \times 10^1$  UFC mL<sup>-1</sup> para o grupo C. Os autores afirmam ainda que a alta umidade relativa do ar da região amazônica pode ter contribuído para maior proliferação destes micro-organismos no ambiente.

Nas amostras provenientes de ordenha não mecanizada não foi verificado a presença de micro-organismos psicotróficos, como também em 11,5% das amostras de leite obtidas por ordenha mecanizada, enquanto nas demais amostras os resultados variaram de  $3,4 \times 10^5$  UFC/mL a  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL (Tabela 4); apesar da legislação brasileira não estabelecer padrões para o leite cru em relação a estes micro-organismos. Estes resultados são preocupantes tendo em vista a produção de enzimas termoresistentes, além do desenvolvimento do sabor residual no leite pasteurizado.

Schimith et al.(2003) pesquisando leite cru em diversas regiões do Rio Grande do Sul, encontraram 16,66% das amostras com contagens de psicotróficos entre  $10^5$  a  $10^6$  UFC/mL e 83,34% acima de  $10^7$  UFC/mL.

Em Goiás, Santos et al.(2009) pesquisando microorganismos psicotróficos encontraram 14% das amostras de leite cru refrigerado em tanque de expansão com  $10^6$  UFC/mL e 20% apresentaram contagens de  $10^5$  UFC/mL, enquanto Santos & Fonseca (2003) também pesquisando leite refrigerado de tanques de expansão encontraram valores superiores a  $10^6$  UFC/mL.

No Rio de Janeiro e na região da Zona da Mata de Minas Gerais, em 20 amostras de tanques coletivos e 23 tanques individuais, as contagens de bactérias psicotróficas nas amostras de leite para os dois tipos de tanques de refrigeração variaram entre  $10^2$  e  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, porém, um maior número de tanques coletivos apresentou contagens acima de  $1 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>. Foi verificada a predominância de bactérias psicotróficas gram-negativas (81,2%). As bactérias gram-positivas (18,8%) foram identificadas os gêneros: *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Cellum/Microbacterium*, *Kurthiae Staphylococcus*. Os resultados ressaltam que maior atenção deve ser dada aos procedimentos que impeçam a contaminação do leite por esses micro-organismos (ARCURI et al., 2006).

Foram coletadas 50 amostras de leite cru em dois laticínios no Rio Grande do Sul entre 2005 e 2006. Do total de amostras 20 foram provenientes de tanque isotérmico de caminhões e 20 amostras no segundo estabelecimento. Os valores

médios encontrados foram entre 6,0 e 6,5 log UFC/mL de bactérias psicrotróficas nos diferentes laticínios. Estas bactérias podem ocasionar alterações indesejáveis no leite UAT, como a gelatinização e o desenvolvimento de sabor amargo (NOMBERG, 2009).

Em Umuarama (Paraná), foram coletadas amostras de leite do entreposto da Associação de Produtores da região no período de setembro de 2008 a julho de 2009. Observou-se diferença significativa ao nível de 5% nas concentrações de *Pseudomonas* spp. nos tempos avaliados, o que demonstra que a refrigeração inadequada e prolongada contribui para o aumento da concentração das bactérias e das contagens elevadas de coliformes totais e termotolerantes (SILVA, 2010).

No presente trabalho, não foi encontrada a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva nas amostras de leite analisadas diferindo do estudo em Londrina (PR) e Pelotas (RS) realizado por Santana et al (2010) onde em 101 amostras de leite cru, 19 (18,8%) apresentaram contagem acima de  $10^5$  UFC/mL.

Em Minas Gerais Lamaita et al (2005) pesquisando 80 amostras de leite cru refrigerado a 4°C e estocado por 48 horas em tanques refrigeradores de propriedades rurais do estado de Minas Gerais, encontraram contagem de *Staphylococcus* sp, em 100% das amostras de leite de tanque refrigerador, variando a contagens de  $1,0 \times 10^5$  a  $2,5 \times 10^7$  UFC/mL.

Santana et al. (2006) avaliaram 101 propriedade leiteiras na região de Londrina e Pelotas - RG, os resultados finais demonstraram que das 101 amostras examinadas todas apresentaram contagens de estafilococos e das 552 colônias avaliadas, 256 eram coagulase positivas. Entretanto, em Itapetinga-BA os resultados para *S.aureus* em todas as amostras analisadas variaram de  $2,5 \times 10^2$  a  $2 \times 10^6$  UFC/mL (MACIEL et al., 2008).

Tebaldi et al. (2008) encontraram *Staphylococcus* coagulase positiva em 10 amostras de leite provenientes de tanques de expansão, cuja contagens variaram de  $2,4 \times 10^3$  a  $1,73 \times 10^7$  UFC/mL, os autores afirmam ainda que elevadas concentrações podem refletir problemas de sanidade do rebanho, como a presença de animais com mastite subclínica.

## CONCLUSÃO

Após análise dos resultados, concluiu-se que das 90% das 18 propriedades não mecanizada pesquisadas apresentavam falhas na hora da ordenha e uma das 8 mecanizadas não mecanizadas. Quanto a presença de fungos filamentosos e leveduras não houve diferença estatística ao nível de 5% entre os dois sistemas de ordenha. Neste estudo não foi encontrada a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva.

Diante dos dados encontrados nas propriedades leiteiras analisadas pertencentes a região do Recôncavo Baiano torna-se necessário a realização de educação permanente direcionados aos manipuladores responsáveis pela ordenha com ênfase em higiene pessoal, e manejo adequado dos animais.



## REFERÊNCIAS

- ARCURI E.F., BRITO M.A.V.P.; BRITO J.R.F., PINTO S.M.; ÂNGELO F.F., SOUZA G.Nº. **Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.,v.58, Nº3, p.440-446, 2006.
- BADINI K.B.; FILHO A.N; AMARAL L.A.; GERMANO P.M.L. Risco à saúde representado pelo consumo de leite cru comercializado clandestinamente.**Rev. Saúde Pública**, 30(6): 549-52, 1996.
- BANZATTO, D. V.; KRONKA, S. do N. **Experimentação agrícola.** Jaboticabal: FCAV/UNESP, 1992. 247 p.
- BELOTI, V.; BARROS,M.A.F.; FREITAS,J.C., NERO,L.A.,SOUZA,J.A; SANTANA, E.M.V.;FRANCO, B.D.G.M.Fregany of 2,3,5 Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) non-redecing bactéria in pausteurized Milk. **Revista Microbiology** v.30,p.137,140,1999.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Leite; **Instrução Normativa, n.51** de 18 de setembro de 2002. Brasília. 95p.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa, n.62 de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Disponível em:<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis>>Acesso em: 10 JAN.2013.
- CATÃO R. M. R., CEBALLOS B.S. O. Título: LISTERIASPP., Coliformes totais e fecais e E.Coli no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil) **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 21(3): 281-287, set.-dez. 2001.
- CITADIN, Â. S.; POZZA, M. S. dos S.; POZZA, P. C.; NUNES, R. V.; BORSATTI, L.; MANGONI, J. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e fatores associados. **Rev. Bras. Saúde Prod. ANº**, v.10, Nº1, p.52-59, jan./mar, 2009.
- DÜRR, J. W.; MORO, D.V.; RHEINHEIMER, V.; TOMAZI, T. Estado atual da qualidade do leite no Rio Grande do Sul. In: MESQUITA, A. J.; DÜRR, J. W.; COELHO, K. O. **Perspectivas e Avanços da Qualidade do Leite no Brasil.** Goiânia: Talento, 2006. 352p. p.83-94.
- GONTIJO C.M.; BRANCO A.B.A.; Avaliação microbiológica do leite pasteurizado e de derivados do leite no Distrito Federal, janeiro/1990 a dezembro/1996. **Rev Saúde Dist. Fed** 1998; 9:27-32.

LAMAITA H.C., CERQUEIRA M.M.O.P., Carmo L.S., SANTOS D.A., PENNA C.F.A.M., SOUZA M.R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**,v.57, N°5, p.702-709, 2005.

LEITE, C.C.; GUIMARÃES, A.G.; ASSIS, P. N°; SILVA, M.D.; ANDRADE, C. S.0 Qualidade bacteriológica do leite integral (tipo C) comercializado em Salvador – Bahia. Bacteriological quality of whole milk type “c” commercialized in Salvador – Bahia. **Rev. Bras. Saúde Prod. AN° 3 (1):21-25,2002.** Publicação Online da EMV/UFBA.

MACIEL, J. F.; CARVALHO, E. A.; SANTOS, L. S.; ARAÚJO, Josy Barbosa de; NUNES, Vanessa Santos Qualidade microbiológica de leite cru comercializado em Itapetinga-BA. **Rev. Bras. Saúde Prod. AN°**, v.9, N°3, p. 443-448, jul/set, 2008.

MACHADO, P.F., CASSOLI, L.D. Diagnóstico da qualidade do leite na Região Sudeste. *In*: MESQUITA, A.J., DÜRR, J.W., COELHO, K.O. **Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil.** Goiânia: Talento, 2006. 352p. 2006.

MACHADO, N. J.B.; LAUREANO, M.; M. M.;MOTA, D. A.;MATOS, Í.T.S.R.; BRASIL, R.J.M.; HOSHIBA, M.A. Caracterização da qualidade microbiológica do leite cru de propriedades do município Parintins-AM.**Rev. Cienc. Agrar.**,v. 55, n. 4, p. 327-331, out./dez. 2012

MELO, B. A. de;SANTOS, T. M. C. dos;BARBOSA, Y.R. da S.; MOURA, C. T. R.de; MONTALDO, Y. C. aspectos microbiológicos de amostras de leite cru coletadas no município de major isidoro – alagoas. **Revista Verde (Mossoró – RN – Brasil)** v.5, n.5, p.01 - 05 (Numero Especial) dezembro de 2010

MELVILLE, P. A.; RUZ-PERES, M.; YOKOIA, E.; BENITES, N. R. Ocorrência de fungos em leite cru proveniente de tanques de refrigeração e latões de propriedades leiteiras, bem como de leite comercializado diretamente ao consumidor. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 3, p. 295-301, 2006

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

NÖMBERG M.F.B.L., TONDO E.C. & BRANDELLI A. Bactérias psicotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae.** 37(2): 157-163.2009.

PINTO, C.LO; MARTINS M.L.; VANETT M.C.D; Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas; **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26(3): 645-651, jul.-set. 2006.

SANTANA H.V.; BELOTI V.; BARROS M.A.F;MORAES L.B.; GUSMÃO V. V.; PEREIRA. M. S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Micro-organismos mesófilos aeróbios e psicrotróficos. **Semina: Ci. Agrárias**, Londrina, v. 22, Nº2, p. 145-154, jul./dez. 2006.

SANTANA, E. H. W.; CUNHA, M. L. R. S.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; MORAES, L. B.; ALEGRO, L. C. A.; BELOTI, V. Assesment of the risk of raw milk consumption related to staphylococcal food poisoning. **Cien. Anim. Bras.**, Goiânia, v. 11, n. 3, p.643-652, jul./set., 2010.

SANTOS, D.; BERGMANN, G.P. Influência da temperatura durante o transporte, sobre a qualidade microbiológica do leite cru. III - Psicrotróficos. **Hig. Alim.**, v.17, p.86-91, 2003.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Bactérias psicrotróficas e a qualidade do leite. **Revista CBQL**, v. 19, n. 1, p. 1215, 2003.

SANTOS, P.A dos; SILVA M.A.P da, SOUZA,C.M; ISEPON J. dos; OLIVEIRA, A.N de. Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no Desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos em leite Cru refrigerado coletado na macrorregião de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1237-1245, out./dez. 2009.

SCHMITT, A.; DÜRR, J. W.; SOARES, J. Contagens de mesófilos e de psicrotróficos em leite cru de diferentes regiões do Rio Grande do Sul. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, n. 104/105, p. 181, 2003.

SILVA, M.R. S., SACANAVACCA,J.;GANDRAT.K.V.SEIXAS,F.A.V.GANDRA,E.A. **Avaliação higiênico-sanitária do leite produzido em Umuarama (Paraná)** B.CEPPA, Curitiba, v. 28, Nº 2, p. 271-280, jul./dez. 2010.

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

## CAPÍTULO 2

### ISOLAMENTO DA *Escherichia coli* O 157: H7 EM LEITE CRU OBTIDOS POR ORDENHA NÃO MECANIZADA E MECANIZADA EM PROPRIEDADES DO RECÔNCAVO BAIANO <sup>2</sup>

---

<sup>2</sup>Parte do Capítulo foi submetido ao comitê editorial de avaliação do periódico Ciência Rural.

## ISOLAMENTO DA *Escherichia coli* O 157: H7 EM LEITE CRU OBTIDOS POR ORDENHA NÃO MECANIZADA E MECANIZADA EM PROPRIEDADES DO RECÔNCAVO BAIANO.

**Autora:** Aline Batista Sandes

**Orientadora:** Ludmilla Santana Soares e Barros

**RESUMO:** A qualidade do leite é um dos temas mais discutidos no cenário nacional, por se tratar de um alimento acessível a várias classes sociais e por ter um grande potencial de veicular micro-organismos patógenos ao homem como, por exemplo, a *E.coli* enterohemorrágica (EHEC) sorotipo O 157: H7. A *E.coli* O157: H7 pode causar colite hemorrágica e uma uremia grave. O objetivo desse trabalho foi determinar e isolar *Escherichia coli* O157:H7 em amostras de leite *in natura* obtidas por ordenha não mecanizada e mecanizada na região do Recôncavo Baiano. Os resultados de NMP de Coliformes Totais em leite cru, variaram de  $1,1 \times 10^3$  NMP/mL a  $3,6 \times 10^9$  NMP/mL no leite obtido por ordenha não mecanizada, enquanto  $1,1 \times 10^3$  NMP/mL a  $4,6 \times 10^6$  NMP/mL para o leite obtido através de ordenha mecanizada, o qual apresentou valores inferiores em relação ao leite obtido por ordenha não mecanizada, demonstrando melhores condições higiênico-sanitárias durante a ordenha e estocagem, embora a legislação não estabeleça padrões, os resultados sugerem que em alguma etapa da cadeia produtiva houve falhas, as quais devem ser identificadas e sanadas. Verificou-se os resultados para *E. coli*  $<3,0$  NMP/mL a  $7,5 \times 10^3$  NMP/mL para o leite obtido por ordenha não mecanizada enquanto  $1,5 \times 10^4$  NMP/mL a  $1,1 \times 10^7$  NMP/mL para o leite obtido por ordenha mecanizada. Quanto a *Escherichia coli* O 157: H7, foi encontrado uma amostra positiva em uma fazenda, após ter sido realizado teste bioquímico específico para esta espécie.

**Palavras-chave:** Qualidade do leite, coliformes totais, condições higiênico-sanitária da ordenha, *Escherichia coli* O 157:H7.

**ISOLATION OF *Escherichia coli* O 157: H7 IN MILK OBTAINED BY MILKING MECHANIZED AND MECHANIZED NOT OF PROPERTIES RECÔNCAVO BAIANO.**

**Author: Aline Batista Sandes**

**Guiding: Ludmilla Santana Soares e Barros**

**ABSTRACT:**The quality of milk is one of the most discussed topics on the national scene, because it is one of the various social classes affordable food and to have a great potential to serve the man pathogens micro-organisms, eg, enterohemorrhagic *E.coli* ( EHEC ) serotype O157 : H7 . The *E. coli* O 157: H7 can cause bleeding colitis and severe uremia . The aim of this study was to determine and isolate *Escherichia coli* O 157:H7 in fresh milk obtained by non-mechanized and mechanized milking in the Reconcavo Baiano region. The results of MPN of coliforms in raw milk ranged from  $1.1 \times 10^3$  MPN / mL to  $3.6 \times 10^9$  MPN / ml in milk obtained by non-mechanized milking , while  $1.1 \times 10^3$  MPN / mL to  $4.6 \times 10^6$  MPN / mL for milk obtained through mechanized milking , which showed lower values for milk obtained by non-mechanized milking , demonstrating best sanitary conditions during milking and storage , although the legislation does not set standards, the results suggest that at some stage of the production chain were no failures , which should be identified and remedied. Found that the results for *E. coli* <math>3.0 \text{ MPN / ml}</math> at  $7.5 \times 10^3$  organisms / ml for not milk obtained by milking mechanically as  $1.5 \times 10^4$  organisms / ml  $1,1 \times 10^7$  organisms / ml for mechanized milk obtained by milking. As for *Escherichia coli* O 157: H7, a positive sample was found on a farm after specific biochemical test has been conducted for this species.

**Keywords:** Milk quality, total coliforms, hygienic and sanitary conditions of milking, *Escherichia coli* O 157:H7.

## 1. INTRODUÇÃO

O leite é um alimento consumido há séculos pela humanidade, possui uma excelente qualidade nutricional e exerce um importante papel econômico e social em todo mundo.

Por essa razão, no cenário nacional a qualidade do leite é um dos temas mais discutidos. Entretanto, o leite obtido no Brasil ainda é processado sob condições higiênico-sanitárias insatisfatórias e algumas vezes implicado como um veículo de surtos de doenças gastrointestinais de origem alimentar. Geralmente é proveniente de pequenas propriedades, onde não há investimento em tecnologias e nem assistência técnica, o que resulta em baixa qualidade do produto final.

Um dos principais meios de avaliação dessa qualidade é a enumeração de micro-organismos indicadores higiênico-sanitários, dos quais pertencem os grupos aeróbios mesófilos, coliformes totais e termotolerantes. Entre eles podemos destacar a *Escherichia coli* O157:H7, que tem como principal reservatório o trato intestinal dos bovinos. A principal fonte de transmissão é a ingestão de alimentos contaminados como: carne, leite e água.

Pode causar colite hemorrágica e uma uremia grave, muitas vezes sendo fatal. O que permite afirmar que o monitoramento da qualidade microbiológica do leite é um fator indispensável e de valor inegociável independente da viabilidade de sua obtenção, servindo como alerta a população sobre o perigo do consumo de produtos de baixa qualidade.

### 1.1OBJETIVO

Isolar *Escherichia coli* O 157:H7 em amostras de leite *in natura* em propriedades não mecanizada e mecanizada do Recôncavo Baiano.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Coleta de Amostras

As amostras de leite *in natura* foram coletadas em 26 propriedades leiteiras na região do Recôncavo Baiano, nos municípios de Teodoro Sampaio, Belém-Distrito de Cachoeira, São Gonçalo dos Campos, Conceição de Feira e São Francisco do Conde no período de novembro de 2012 a abril de 2013

Inicialmente foram divididas em 02 grupos de estudo, 18 propriedades em que se encontraram fazendas com ordenhas não mecanizadas (as amostragens foram realizadas diretamente dos latões dos caminhões transportadores) e 08 propriedades com ordenhas mecanizadas as amostragens foram retiradas diretamente do tanque de expansão (Figura 6) no dia da ordenha, onde às medidas profiláticas de controle de qualidade higiênica do leite eram rigorosas e realizadas diariamente.



**Figura 5. Sala de ordenha em uma propriedade mecanizada.**

Fonte: Arquivo pessoal





**Figura 6 Tanque de expansão nas propriedades em que o leite foi obtido por sistema de ordenha mecanizada.**

Fonte: Arquivo pessoal

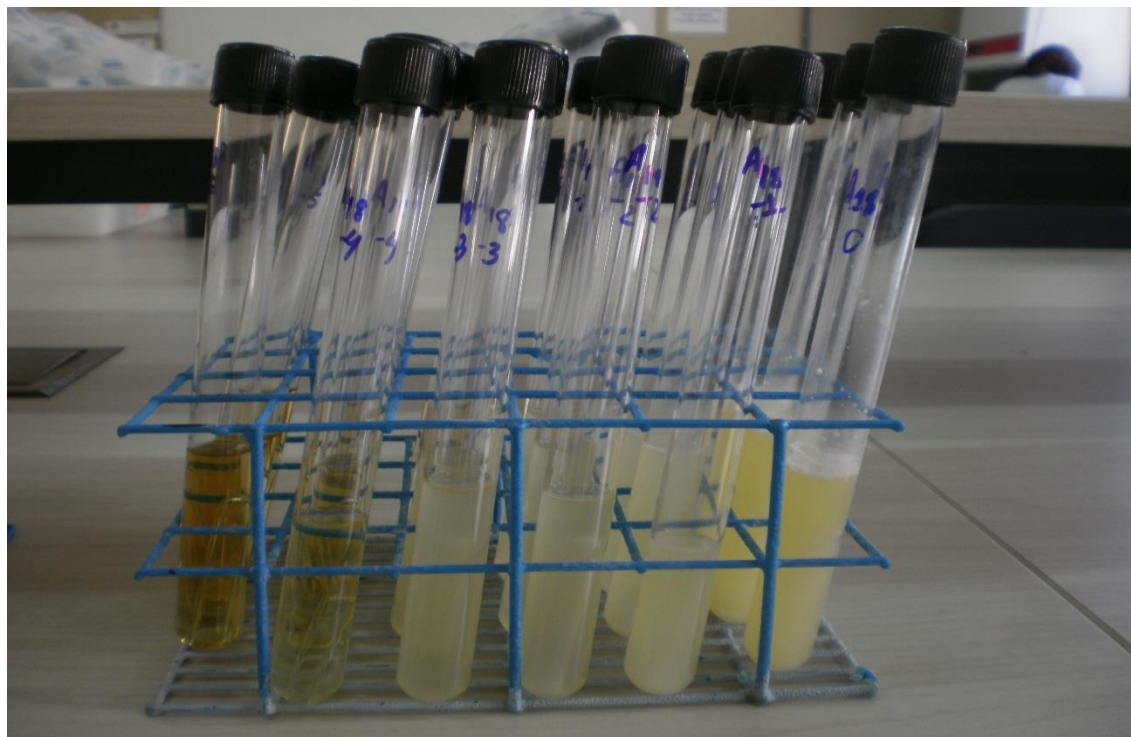
## **2.2 Número mais Provável de Coliformes Totais (NMP)**

A técnica consistiu na inoculação de amostras em Caldo Lauril Sulfato de Triptose e Caldo Verde Brilhante Bile Lactose 2%, onde a presença de gás nos tubos de Durham é indicativo da presença de coliformes, que é capaz de fermentar lactose presente no meio de cultura (APHA, 2001; BRASIL, 2003).

### **2.2.1 Prova presuntiva**

Foi utilizado a técnica de tubos múltiplos para determinar o NMP de coliformes totais. Inoculou-se 1 mL de cada amostra do leite *in natura* diluído em 9 mL de solução salina peptonada a 0,1%. Em seguida 1 mL de cada diluição foi misturado em 03 tubos de ensaio contendo Lauril Sulfato de Triptose (LST) com tubos de Durham invertidos (Figura 7), que em seguida foi incubado a 36° C por

24-48 horas, onde observou-se a turvação e produção de gás (BRASIL, 2003; MACIEL et al., 2008).



**Figura 7. Prova de Lauril Sulfato com Triptose.**

Fonte: Arquivo pessoal

### **2.2.2 Prova confirmativa para detecção de coliformes totais**

O material dos tubos positivos, caracterizados pela produção de gás no caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), foram transferidos para tubos com Caldo Verde Brilhante Bile Lactosado a 2%. Os tubos inoculados foram incubados a  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  por 48 h. Os resultados positivos foram confirmados pela turvação do meio e pela produção de gás ou efervescência quando suavemente agitados. Em seguida foram anotados os tubos positivos e o Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais foi determinado mediante a tabela de Mc Crade com base no número de tubos positivos em cada uma das três diluições (BRASIL, 2003; MACIEL et al. 2008).

### 2.2.2 Prova confirmativa para detecção dos coliformes termotolerantes

Os tubos positivos na prova confirmativa foram inoculados em caldo *Escherichia coli* (EC) e incubados a  $45^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  por 24 h em banho-maria com agitação. Os resultados positivos dos tubos no caldo EC foram confirmados pela formação de gás ou efervescência quando levemente agitados e o Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes determinado mediante a tabela de Mc Crade com base no número de tubos positivos em cada uma das três diluições (BRASIL, 2003).

### 2.2.3 Confirmação de *Escherichia coli*

Os tubos positivos no caldo EC foram semeados em Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) (Figura 8). Posteriormente foi efetuada a incubação das placas a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, em seguida foram selecionadas cinco colônias típicas de *E. coli* (colônias escuras e lisas com ou sem brilho metálico). Estas foram transferidas para Ágar Nutriente Inclinado (Figura 9). Posteriormente procedeu-se a incubação a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 h, e logo após efetuou-se a coloração de Gram das culturas. As culturas que apresentaram bacilos Gram negativos curtos foram submetidas às provas bioquímicas (BRASIL 2003; MACIEL et al., 2008).

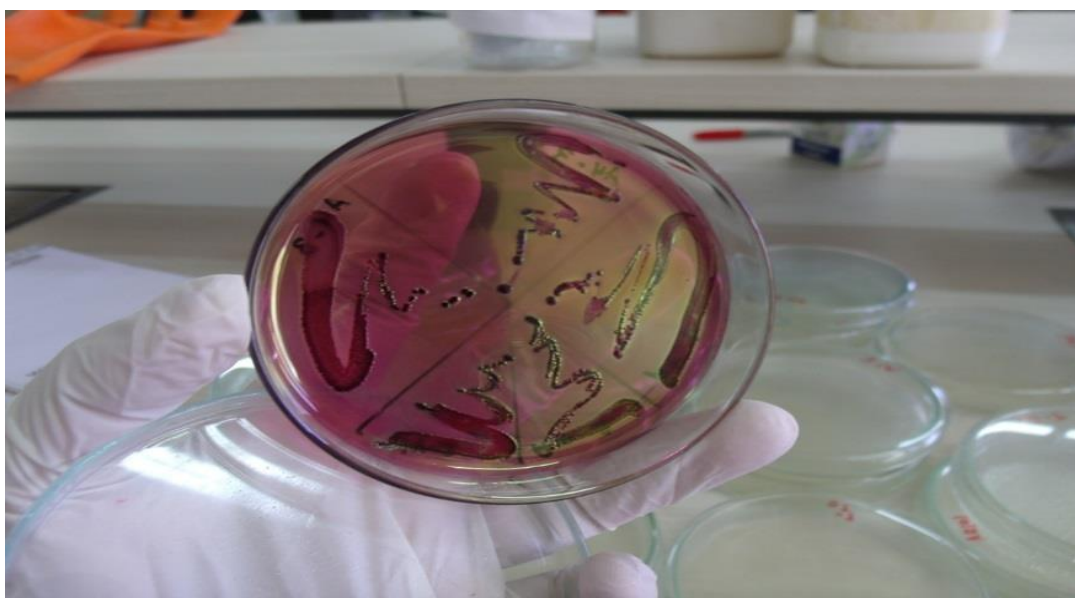


Figura 8. Placa de Petri com Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB).

Fonte: Arquivo pessoal



**Figura 9. Ágar Nutriente inclinado.**

Fonte: Arquivo pessoal

### **2.2.5 Painel para enterobactérias – PROBAC**

Utilizou-se um painel (Figura 10) que possui um amplo número de provas bioquímicas que permite determinar com maior segurança as espécies e subespécies dos isolados através das seguintes provas: Indol, Voges Proskauer, Citrato de Simons, Produção de H<sub>2</sub>S hidrólise da ureia, triptofanodesaminase, controle de descarboxilação, descarboxilação de lisina, descarboxilação de arginina, descarboxilação de ornitina, maionato e oxidação de glicose, fermentação de lactose, fermentação de sacarose, fermentação de manitol, fermentação de adonitol, fermentação de mioinositol, fermentação de sorbitol, fermentação de rafinose, fermentação de ramnose, fermentação de maltose, fermentação de melobiose, B-D-galactosidase, hidrólise de esculina.



**Figura 10. Método Probac**

Foi utilizado 3 a 4 mL da solução Inoculante Probac do Brasil na escala 0,5 Mc Farland, distribui-se 0,1 mL desta turvação, bem homogeneizada, em cada poquinho da microplaca.

Nos poços controle de descarboxilação, descarboxilação de lisina, descarboxilação de arginina, descarboxilação de ornitina, adicionou-se uma gota de solução estabilizante de aminoácidos que acompanha o kit e a seguir pingou-se duas gotas de óleo mineral estéril nas provas de produção de H<sub>2</sub>S, hidrólise de uréia, controle de descarboxilação, descarboxilação de lisina, descarboxilação de arginina, descarboxilação de ornitina.

Em seguida, realizou-se a prova de oxidase do isolado. Retirou-se uma fita do kit e com o auxílio de uma alça de platina, foi realizado um esfregaço da bactéria a ser identificada.

### **2.2.6 Singlepath – Glisa – *E.coli* O157 : H7**

Utilizou-se GLISA-Rapid Test (Gold Labelled ImmunoSorbent Assay) para detecção qualitativa da *E. coli* O157 em alimentos da Merck KGaA. Sobre uma superfície plana, coletou-se o caldo da cultura, sendo utilizada 05 gotas na área circular do dispositivo do kit, a uma temperatura de 26° C. Após 20 minutos

observa-se o resultado com uma ou duas linhas vermelhas com sensibilidade e especificidade acima de 99%.



**Fig. 11** Singlepath® E. coli 0157 mostrando resultado teste negativo e positivo respectivamente

### 2.3 Análise Estatística

A análise de variância dos resultados e as médias dos mesmos foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, foi encontrada uma amostra de leite suspeita STEC. Tal detecção ocorreu na propriedade Nº 1, em que o leite foi obtido por ordenha não mecanizada.

Nas Tabelas 5 e 6 estão expressos os resultados de Número Mais Provável de Coliformes Totais em leite cru obtidos em propriedades com sistema de ordenha não mecanizada e mecanizada na região do Recôncavo Baiano. Observa-se que os resultados variaram de  $1,1 \times 10^3$  NMP/mL a  $3,6 \times 10^9$  NMP/mL no leite obtido por ordenha não mecanizada, enquanto  $1,1 \times 10^3$  NMP/mL a  $4,6 \times 10^6$  NMP/mL para o leite obtido através de ordenha mecanizada, o qual apresentou valores inferiores em relação ao leite obtido por ordenha não mecanizada, demonstrando melhores condições higiênico-sanitárias durante a ordenha e estocagem, embora a legislação não estabeleça padrões em relação a

estes micro-organismos, os resultados sugerem que em alguma etapa da cadeia produtiva houve falhas, as quais devem ser identificadas e sanadas.

Ainda nas mesmas Tabelas 5 e 6 verificam-se os resultados para *E. coli* <3,0 NMP/mL a  $7,5 \times 10^3$  NMP/mL para o leite obtido por ordenha não mecanizada enquanto  $1,5 \times 10^4$  NMP/mL a  $1,1 \times 10^7$  NMP/mL para o leite obtido por ordenha mecanizada.

**Tabela 5.** Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e *E. Coli* em leite cru obtidos em propriedades com sistema de ordenhas não mecanizadas na região do Recôncavo Baiano, durante o período de novembro de 2012 a abril de 2013.

| Fazendas | Coliformes totais<br>(UFC/mL) | <i>E. coli</i><br>(NMP/mL) |
|----------|-------------------------------|----------------------------|
| 01       | $3,6 \times 10^9$ Aa          | <3,0 Ba                    |
| 02       | $1,9 \times 10^8$ Aa          | <3,0 Ba                    |
| 03       | $3,6 \times 10^8$ Aa          | <3,0 Ba                    |
| 04       | $2,3 \times 10^8$ Aa          | <3,0 Ba                    |
| 05       | $1,1 \times 10^3$ Aa          | <3,0 Ba                    |
| 06       | $4,3 \times 10^4$ Aa          | $3,0 \times 10^3$ Bb       |
| 07       | $2,4 \times 10^3$ Aa          | <3,0 Ba                    |
| 08       | $1,1 \times 10^3$ Aa          | <3,0 Ba                    |
| 09       | $2,4 \times 10^3$ Aa          | <3,0 Ba                    |
| 10       | $2,4 \times 10^3$ Aa          | <3,0 Ba                    |
| 11       | $2,4 \times 10^3$ Aa          | <3,0 Ba                    |
| 12       | $1,1 \times 10^4$ Aa          | <3,0 Ba                    |
| 13       | $2,4 \times 10^6$ Aa          | $2,3 \times 10^2$ Ab       |
| 14       | $1,5 \times 10^4$ Aa          | $0,36 \times 10^3$ Ab      |
| 15       | $9,3 \times 10^3$ Aa          | $0,7 \times 10^2$ Ab       |
| 16       | $1,5 \times 10^3$ Aa          | $1,1 \times 10^3$ AA       |
| 17       | $1,1 \times 10^3$ Aa          | $1,5 \times 10^3$ AA       |
| 18       | $1,1 \times 10^3$ Aa          | $7,5 \times 10^3$ Aa       |

Em cada linha valores seguidos de letras maiúsculas diferentes diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%. Em cada coluna valores seguidos de letras minúsculas diferentes diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

**Tabela 6.** Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e *E. Coli* em leite cru obtidos em propriedades com sistema de ordenha mecanizada na região do Recôncavo Baiano, durante o período de novembro de 2012 a abril de 2013.

| Fazendas | Coliformes Totais       | <i>Escherichia coli</i> |
|----------|-------------------------|-------------------------|
| 19       | 4,6x10 <sup>6</sup> Aa  | 2,3x10 <sup>5</sup> Aa  |
| 20       | 7,5x10 <sup>5</sup> Aa  | 9,3x10 <sup>4</sup> Aa  |
| 21       | 1,1 X10 <sup>3</sup> Aa | 1,1x10 <sup>7</sup> Aa  |
| 22       | 1,1 X10 <sup>3</sup> Aa | 2,1x10 <sup>6</sup> Aa  |
| 23       | 9,3x10 <sup>5</sup> Aa  | 1,5x10 <sup>4</sup> Aa  |
| 24       | 2,0 x10 <sup>3</sup> Aa | 4,6x10 <sup>6</sup> Aa  |
| 25       | 2,1x10 <sup>6</sup> Aa  | 4,6x10 <sup>6</sup> Aa  |
| 26       | 1,1 X10 <sup>3</sup> Aa | 1,1x10 <sup>7</sup> Aa  |

Em cada linha valores seguidos de letras maiúsculas diferentes diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%. Em cada coluna valores seguidos de letras minúsculas diferentes diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Devido às características patogênicas da *E. coli* O:157 H:7, é importante que sua prevalência em produtos alimentícios seja a mais baixa possível (TUTENEL et al., 2002).

Araújo et al. (2009) em Minas Gerais realizaram uma pesquisa em 32 propriedades na bacia leiteira do município de Luz, durante o período de 2005 a janeiro de 2006, para avaliar a qualidade do leite produzido nessa região e os dados demonstraram que 87,5% das propriedades estavam fora dos padrões estabelecidos pela legislação RDC 12, principalmente no que se refere à pesquisa de coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli*.

Além disso, aqueles que manipulam a carne deveriam ter certeza de que todos os equipamentos e superfícies que entram em contato com ela são adequadamente higienizados e sanitizados antes de serem utilizados em alimentos que não serão cozidos (RODRIGUE et al., 1995).



Um dos maiores surtos de *Escherichia coli* O157: H7 associado ao consumo de leite foi relatado por Upton & Coia (1994). Foram afetadas mais que 100 pessoas, um terço das quais foram hospitalizadas, nove crianças desenvolveram síndrome urêmica hemorrágica, seis precisaram de diálise, uma mulher idosa desenvolveu púrpura trombocitopênica trombótica. Investigações epidemiológicas revelaram que mais que 90% dos infectados haviam consumido leite pasteurizado envasado em caixa de papelão ou garrafas, procedente de um laticínio local. Acredita-se que sete casos resultaram do contágio secundário, pessoa-a-pessoa, nas próprias casas. Várias amostras foram colhidas e *E. coli* O:157 H:7 foi encontrada na tubulação que conduzia o leite do pasteurizador à máquina de engarrafamento e numa borracha da máquina de engarrafamento.

Adesiyum et al. (1997) isolaram 18,5% de STEC do leite do tanque de resfriamento, Hussein & Sakuma (2005) isolaram 3,8% e Klie et al. (1997) relataram incidência de STEC em 3,9% do leite cru e 2,1% no leite certificado na Alemanha.

Em quatro regiões da península da Malásia, Sul (Johor / Melaka), Central (Selangor / Negeri Sembilan), Norte (Perak / Kedah) e Leste (Kelantan / Terengganu), cerca de aproximadamente 90% das amostras estavam contaminadas por bactérias coliformes e 65% foram positiva para *E. coli*, com contagens média que variaram de  $10^3$  -  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>. Enquanto isso, *E. coli* O:157 H:7 foi também detectada em 312 (33,5%) amostras (CHYE et al., 2004).

A marca da patogenidade do sorotipo O157:H7 é uma evidência epidemiológica de que apenas algumas células são necessárias para causar a doença em humanos (GRIFFIN & TAUXE, 1991). A dose infectante pode ser de apenas 10 bactérias, que não precisam multiplicar-se no alimento, sendo a contaminação original já suficiente para causar doença (WAHLSTRÖM, 2001). O regulamento do Serviço de Inspeção de Segurança Alimentar dos EUA declara que a presença de uma unidade formadora de colônia de *E. coli* O157: H7 em 25g constitui uma carne bovina com risco à saúde pública (JOHNSON et al., 1998).

É uma preocupação da indústria leiteira o fato de bactérias patogênicas serem transmitidas aos seres humanos por meio do leite e seus subprodutos (VASAVADA, 1988). A *E. coli* O:157H:7 é um destes patógenos humanos. Práticas de higiene durante o processo de ordenha podem diminuir a contaminação fecal do leite cru, mas a pasteurização adequada e a prevenção da

contaminação pós-pasteurização são medidas necessárias para garantir a segurança deste alimento (HEUVELINK et al., 1998). Ademais um modo efetivo na prevenção de surtos associados ao leite é evitar sua ingestão na forma crua (BLEEM, 1994).

Diversos trabalhos demonstraram a possibilidade de contaminação do leite cru com *E. coli* patogênicas está potencialmente presente durante o processo de ordenha em propriedades leiteiras. Uma vez que as fontes são as fezes, o conteúdo ruminal e o ambiente da propriedade, os micro-organismos podem contaminar o couro, úbere e superfície do teto das vacas

A transmissão direta de STEC O157: H7 de animais para humanos já foi várias vezes relatada. Rebanhos que pastejam em piquetes tratados com esterco podem apresentar uma prevalência de STEC e O157 maior (HANCOCK et al., 1998). Segundo Kudva et al. (1995) a *Escherichia coli* O157:H7 pode sobreviver por pelo menos seis semanas nas fezes e possivelmente se multiplicar neste material. Porter et al. (1997) relataram que o sorotipo O157: H7 foi isolado com maior frequência de amostras ambientais colhidas próximas ao depósito de esterco dos animais.

A contaminação superficial do teto pode conduzir a uma futura contaminação do leite cru (MATTHEWS et al., 1997). A mais, a contaminação do teto, conforme foi relatado previamente, conduz a infecção intramamária com *E. coli* (BRAMLEY et al., 1981).

Em estudo realizado por Belongia et al (2003) durante as visitas era permitido às pessoas tocar e alimentar os animais, assim como comer e beber enquanto interagem com eles. Chegou-se a conclusão de que crianças que moram em fazendas são comumente expostas à *E. coli* O157: H7, mas não há um correspondente aumento na incidência de diarreia clinicamente aparente. Acredita-se que o estímulo antigênico repetido nessas crianças poderia prevenir a doença.

De acordo com Hussein & Sakuma (2005), considerando a ampla distribuição de STEC em propriedades leiteiras, as altas taxas de prevalência já relatadas e o isolamento de vários sorotipos de alta virulência de rebanhos leiteiros e seus produtos, deveriam ser desenvolvidas estratégias em longo prazo para garantir a segurança de alimentos provenientes desses rebanhos. Estas estratégias poderiam incluir o estabelecimento de programas para conscientizar

fazendeiros, trabalhadores e consumidores do risco das STEC. É essencial desenvolver e implementar métodos de controle pré e pós abate para reduzir efetivamente o número de bovinos portadores de STEC e eliminar a contaminação dos seus produtos durante o processamento.

Vicente et al. (2005), em 10 propriedades leiteiras em Jaboticabal, SP, Brasil, pesquisaram a prevalência de *Escherichia coli* STEC e TEC O157 sorogrupos, O111 e O113 em respectivamente 454, 54 e 30 amostras de fezes, água e leite. Os dados afirmam que nenhum dos sorogrupos foram identificados em amostras de leite.

Além do manejo adequado de dejetos, existem outras medidas a serem tomadas a fim de reduzir a disseminação das STEC, tais como, evitar a introdução de animais infectados no rebanho, principalmente bezerros e novilhas, fazer a desinfecção adequada das baias antes de introduzir novos animais, controlar o contato entre bezerros e vacas, oferecer água potável, manter bebedouros e comedouros limpos, prover cama adequada e acomodações limpas (RAHN et al., 1997, LAHTI et al., 2003).

Embora a incidência de infecção em humanos por STEC seja, relativamente, baixa, a gravidade dos sintomas e a frequência de sequelas renais e neurológicas são motivos de preocupação. A doença é de relevância em saúde pública e existe a necessidade de desenvolver tratamento ou medidas de prevenção. Já houve um considerável progresso em compreender a ecologia das STEC em hospedeiros animais e os modos de transmissão aos seres humanos. Estratégias para reduzir a prevalência em bovinos são cruciais para a diminuição da incidência de infecção em humanos (STEVENS *et al.*, 2002).

Vacinas para evitar a infecção em animais segundo Dean-nystrom (2002) e em crianças (AHMED *et al.*, 2006) também estão sendo desenvolvidas e podem ajudar a diminuir a incidência em seres humanos.

Clough et al., (2009) realizaram uma avaliação quantitativa da provável exposição a VTEC O157:H7 através do leite vendido como pasteurizado no Reino Unido, com o objetivo de saber se existe qualquer risco diferencial entre o leite que é processado em on- e off- fazenda laticínios. O estudo foi realizado da cadeia de produção de leite da fazenda até o ponto de varejo, onde em comparação entre estes dois ambientes, detectou-se que o leite processado na

fazenda apresenta comparativamente maior risco, embora esse risco ainda seja pequeno.

Na Itália entre os anos 2009 a 2011, foi realizada uma pesquisa de monitoramento do leite cru num total de 618 amostras de leite cru foram coletadas a partir de 112 rebanhos leiteiros. Das amostras coletadas, 0,3 % tinham *Salmonella* spp positiva, 0,2 % *E. coli* O: 157, 1,5 % de *Campylobacter* spp, e 1,6% para *Listeria monocytogens* (BIANCHI *et al.*,2013).

Foram coletadas 297 amostras de leite cru na Nova Zelândia a *E. coli* estava presente a <100 UFC / mL em 99% das amostras e excedeu  $10^3$  UFC / mL em 0,7% de amostras. *E. coli* O157: H7 não foi detectada enquanto que as estirpes não patogénicas *E. coli* O157 foram detectadas em 1% das amostras. Os resultados demonstram que leite cru coletados na Nova Zelândia, assim como em outros países, inevitavelmente contém patógeno, portanto o controle por pasteurização continua a ser fundamental (HILL *et al.*, 2012).

## CONCLUSÃO

As análises das amostras de leite in natura revelaram quantidades importantes de coliformes e de *E.coli* tendo sido identificado uma amostra contendo a *E. coli* O157: H7. Os resultados demonstraram maiores contagens de coliformes nas propriedades mecanizadas e curiosamente as propriedades não mecanizadas foram responsáveis pelo maior número de *E. coli*. Sendo assim, o estudo aponta para a necessidade da adoção de melhorias nas medidas de controle para contaminação por microrganismos em ambos os sistemas de produção.

Novos estudos podem ser realizados com a finalidade de esclarecer o porquê de haver tão poucas infecções por STEC relatadas no Brasil, uma vez que este e outros trabalhos já mostraram que a prevalência desses patógenos, não só no rebanho, mas também em produtos alimentícios, é real.

## REFERÊNCIAS

ADESIYUM, A.A. et al. Prevalence and characteristics of strains of *Escherichia coli* isolated from milk and feces of cows on dairy farms in Trinidad. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 60, p. 1174-1181, 1997.

AHMED, A. et al. Safety and Immunogenicity of *Escherichia coli* O157O-Specific Polysaccharide Conjugate Vaccine in 2–5-Year-Old Children. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 193, p. 515–21, 2006.

ARAÚJO, M.M.P; ALVES P.D.D; BARBOSA F.H.F; ROSA, C.A. Qualidade higiênico-sanitária do leite e da água de algumas propriedades da bacia leiteira do município de Luz – MG. **Revista de Biologia e Ciências da Terra volume 9 - número 2 - 2º Semestre 2009.**

BANZATTO, D. V.; KRONKA, S. do N. Experimentação agrícola. Jaboticabal: FCAV/UNESP, 1992. 247 p

BELONGIA, E. A. et al. Diarrhea incidence and faro-related risk factors for *Escherichia coli* O157: H7 and *Campylobacter jejuni* antibodies among rural children. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 187, p. 1460-1468, 2003.

BIANCHI, D.M.; BARBARO A.; GALLINA S.; VITALE N°; CHIAVACCI L.; CAMELLI, M.; DECASTELLI L.. Monitoring of foodborne pathogenic bacteria in vending machine raw milk in Piedmont, Italy. **Food Control** 32 (2013) 435 e 439.

BLEEM, A. *Escherichia coli* O157: H7 in raw milk: A review. Annual Health Insight, Suffolk, p. 1-9, 1994.

BRAMLEY, A.J. GODINHO, K. S.; GRINDAL, R.J. Evidence of penetration of the bovine teat duct by *Escherichia coli* in the interval between milkings. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 48, p. 379-386, 1981.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa, n.62 de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis>> Acesso em: 10 JAN.2013.

CHYE, F.Y; ABDULLAH A.; AYOB M.K. **Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia.** Food Microbiology 21 (2004) 535–541

CLOUGH H.E; CLANCY D.; FRENCH N.P.; Quantifying exposure to Verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in milk sold as pasteurized: A model-based approach. **International Journal of Food Microbiology** 131 (2009) 95–105.

DEAN-NYSTROM, E. A. et al. Vaccination of pregnant dams with intimin (O157) protects suckling piglets from *Escherichia coli* O157: H7 infection. *Infection and Immunity*, Washington, v. 70, 2414-2418, 2002.

EKICI K.; BOZKURT H.; ISLEYICI O. **Isolation of Some Pathogens from Raw Milk of Different Milch Animals.** *Pakistan Journal of Nutrition* 3 (3): 161-162, 2004.

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

HANCOCK, D.D. et al. Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy 70 farms in the Northwestern USA. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam, v. 35, p. 11-19, 1998.

HEUVELINK, A.E. et al. Occurrence and Survival of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* O157 in Raw Cow's Milk in the Netherlands. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 61, n. 12, p. 1597-1601, 1998.

HILL B.; SMYTHE B.; LINDSAY D.; SHEPHER J. Microbiology of raw milk in New Zealand. *International Journal of Food Microbiology* (2012).

HUSSEIN, H.S.; SAKUMA, T. Invited Review: Prevalence of Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* in Dairy Cattle and Their Products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 450–465, 2005.

JOHNSON, J. L.; BROOKE, C.L.; FRITSCHER, S.J. Comparison of the BAX for screening/ *E. coli* O157: H7 method with conventional methods for detection of extremely low levels of *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 11, p. 4390-4395, 1998.

KLIE, H. et al. Detection and occurrence of verotoxin-forming and/or Shiga toxin producing *Escherichia coli* (VTEC and/or STEC) in milk. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, Berlin, v. 110, p. 337–341, 1997.

KUDVA, I. T.; HATFIELD, P. G.; HOVDE, C. J. Effect of diet on the shedding of *Escherichia coli* O157: H7 in a sheep model. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 4, p. 1363-1370, 1995.

LAHTI, E. et al. Longitudinal Study of *Escherichia coli* O157 in a Cattle Finishing Unit. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 554-561, 2003.

MACIEL, J. F.; CARVALHO, E. A.; SANTOS, L. S.; ARAÚJO, Josy Barbosa de; NUNES, Vanessa Santos Qualidade microbiológica de leite cru comercializado em Itapetinga-BA. **Rev. Bras. Saúde Prod. AN**, v.9, N<sup>o</sup>3, p. 443-448, jul/set, 2008.

MATTHEWS, K. R.; MURDOUGH, P. A.; BRAMLEY, A. J. Invasion of bovine epithelial cells by verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157: H7. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v. 82, p. 197-203, 1997.

PETRUZZELLI A.; Giulia AMAGLIANI G; MICCIE.; FOGLINI M., RENZO E., BRANDI G., TONUCCI F. Prevalence assessment of *Coxiella burnetii* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in bovine raw milk through molecular identification. **Food Control** 32 (2013) 532e536.

PORTER, J. et al. Detection, distribution and probable fate of *Escherichia coli* O157 from asymptomatic cattle on a dairy farm. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v. 83, p. 297-306, 1997.

RAHN, K. et al. Persistence of *Escherichia coli* O157: H7 in dairy cattle and the dairy farm environment. *Epidemiology and Infection*, Cambridge, v. 119, p. 251-259, 1997.

RODRIGUE, D. C. et al. A University of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated with Roast Beef and an Unusually Benign Clinical Course. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.172, p. 1122-1125, 1995

STEVENS, M. P. et al. Options for the control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in ruminants. **Microbiology**, New York, v. 148, p. 3767-3778, 2002.

TUTENEL, A. V. et al. Isolation and molecular characterization of *Escherichia coli* O157 isolated from cattle, pigs and chickens at slaughter. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 2614, p. 1-7, 2002.

UPTON, P.; COIA, J. E. Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurized milk supply. **The Lancet, London**, v. 344, p. 1015, 1994.



VASAVADA, P.C. Pathogenic bacteria in milk—A review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, p. 2809-2816, 1988.

VICENTE H.I.G.; AMARAL L.A.; FIGUEIREDO A.M. Shiga-toxigenic *Escherichia coli* Serogroups O157, O111 And O113 In Feces, Water And Milk Samples From Dairy Farms. **Brazilian Journal of Microbiology** (2005) 36:217-222.

WAHLSTRÖM, H. Verotoxigenic *Escherichia coli* O157. In: Zoonoses in Sweden up to and including 1999. Uppsala: Reklam & Katalogtryck, 2001. p. 19-22.

**APÊNDICE A****Universidade Federal do Recôncavo Baiano****Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal****Linha de Pesquisa Produção de Ruminantes****Projeto:****Pesquisador:****Orientador:****IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE**

Nome da propriedade:

Nome do proprietário:

Endereço da propriedade:

Área total:

Número total de animais:

Número total de vacas em lactação:

Produção diária:

**INFORMAÇÕES SOBRE O LOCAL DA ORDENHA**

Curral é coberto S( ) N( )

Curral tem piso S( ) N( )

Existe curral de espera S( ) N( )

Fonte de água:

Caixa d'água:

Poço artesiano:

Onde fica a fossa:

Tem banheiro:

**INFORMAÇÕES SOBRE O LOCAL DA ORDENHA**

Número de ordenhas:

Horário:

Tipo de extração:

Quem é o responsável:

Quais os utensílios utilizados:

Como é feita a higienização dos utensílios:

Se é feita a limpeza das tetas antes da ordenha:

Se é feita pos-dipping

Qual o produto utilizado:

Existe tanque de expansão:

Controle de pragas e roedores:

## **INFORMAÇÕES SOBRE OS ANIMAIS**

Existe esquema de vacinação?Quais?

Existe controle de vermifugação:

Existe controle de carrapaticida:

Existe assistência Médica Veterinária? Qual a frequência da presença desse profissional na propriedade?

Existe controle de mastite? S ( ) N( )

Qual a frequência de mastite na propriedade?

Recebe informação sobre a qualidade do leite produzido?

O proprietário recebe pagamento empresa pg pela qualidade