

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Identificação de Fontes de Contaminação Microbiana em um Laticínio  
Durante Implantação de Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de  
Controle (APPCC)**

**Eduardo Cesar Tondo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação Em Bioquímica da UFRGS  
como requisito para obtenção do grau  
de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. João A. P. Henriques

Porto Alegre

2000

Este trabalho foi realizado principalmente nas instalações do Laboratório de Radiobiologia Molecular do Centro de Biotecnologia do Instituto de Biociências da UFRGS e no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS. Parte dele também foi desenvolvido na Cooperativa Agropecuária Petrópolis Ltda. - COAPEL em Nova Petrópolis. Os órgãos financiadores do referido Projeto foram: CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), PROPESQ (Pró-Reitoria de Pesquisa da UFRGS), COAPEL Ltda. e Laboratório GENOTOX do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques, pela orientação, confiança, pela honra de me chamar de "colega" e, principalmente, pelo exemplo de dinamismo e profissionalismo na ciência.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Zachia Ayub, pela co-orientação dessa Tese e pela orientação não só profissional que sempre me deu. Um agradecimento especial a esse Amigo.

Aos primeiros orientadores que me motivaram dentro da ciência, Regina Siegmann Borges e Manuel May Pereira.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos ICTA/UFRGS, em especial ao prof. Miguel M. Montaña pela compreensão e apoio na realização dessa Tese.

À todos amigos do ICTA/UFRGS pelo ótimo ambiente de trabalho.

À Cooperativa Agropecuária Petrópolis, em especial a José Mario Hansen, Paulo Hansen e Siglinde Wazlawik pela hospitalidade, apoio e suporte técnico.

Aos bolsistas que me ajudaram na realização desse Trabalho, Roger Drescht, Maria Felícia H. Bastos, Fernanda Oliveira e, em especial, à Maria Carolina Minardi Guimarães pela perseverança, apoio e amizade.

Aos amigos Carlos Henrique Hassman, Carlos Javier C. Sanches, Rogério Machado, Vivian Rodrigues e Cleidy Wallery Andretta pela amizade.

À Procópio Senna, pela ajuda nas análises com o PFGE e discussões científicas.

Ao Prof. Dr. Diógenes Santos, pela utilização de equipamentos em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Plinho Hertz, pela revisão dessa Tese.

À arte de escalar, pela disciplina e motivação.

Aos meus irmãos, Miriam Andréia da Graça Tondo Fernandes, Paulo Cesar Tondo, Cláudia Tatiana da Graça Tondo e cunhados, pelo Amor.

Aos meus pais, que nunca me empuseram, ao contrário, me orientaram e me ensinaram os caminhos da persistência, esforço e do estudo, simplesmente através do exemplo. Essa Tese é uma homenagem especial do Professor e, se Deus quiser futuro Doutor, Eduardo Cesar Tondo à Professora Venus Catharina Sobroza Tondo e ao Doutor Generino José Tondo, meus queridos pais.

À minha esposa Mercedes Passos Geimba que cuidou, cuidou muito bem do meu jardim de você e de mim. Meu respeito e todo meu Amor.

## ÍNDICE

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>1.1. O Aumento da Produtividade e a Qualidade dos Produtos alimentícios</b> .....	01
<b>1.2. O Setor Leiteiro e a Necessidade de Expansão</b> .....	02
<b>1.3. O Aumento da Produtividade de Leite</b> .....	03
<b>1.4. A Melhoria de Qualidade do Leite Produzido no Brasil</b> .....	04
<b>1.5. A Prevenção de Doenças Transmitidas por Alimentos</b> .....	06
<b>1.6. O Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC)</b> .....	08
<b>1.6.1. O Objetivo do APPCC</b> .....	09
<b>1.6.2. Princípios do APPCC</b> .....	09
<b>1.6.3. Métodos Auxiliares na Identificação de Perigos e Pontos Críticos de Controle em Laticínios</b> .....	10
<b>1.6.3.1. Métodos Químicos</b> .....	11
<b>1.6.3.2. Métodos Físicos</b> .....	11
<b>1.6.3.3. Métodos Bioquímicos</b> .....	12
<b>1.6.3.4. Análises Microbiológicas</b> .....	13
<b>1.6.3.5. Métodos Moleculares</b> .....	13
<b>1.7. O APPCC em Laticínios</b> .....	14
<b>1.8. Microrganismos e o Leite</b> .....	16
<b>1.9. O <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	17
<b>1.10. <i>S. aureus</i> e alimentos</b> .....	18
<b>1.11. O <i>S. aureus</i>, o Leite e a Mastite Bovina</b> .....	19
<b>1.12. O <i>S. aureus</i> e o APPCC em Laticínios</b> .....	21
<b>1.13. Estudo Epidemiológico e Identificação de Fontes de Contaminação como Parte de Sistema APPCC</b> .....	21
<b>1.14. Métodos de Estudo Epidemiológico</b> .....	22
<b>2. OBJETIVO GERAL</b> .....	26
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	26
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
<b>3.1. Descrição do Local</b> .....	27
<b>3.1.1. Setor de Laticínios e APPCC</b> .....	28
<b>3.2. Meios de Cultura</b> .....	28
<b>3.3. Soluções e Reagentes</b> .....	30
<b>3.4. Contagem de Microrganismos Mesófilos Totais em Leite Cru</b> .....	32
<b>3.5. Contagem de Coliformes Totais e Presença de <i>Escherichia coli</i> em Leite</b> .....	33

3.6. Contagem de Microrganismos Mesófilos Totais em Leite Cru Resfriado .....	33
3.7. Contagem de Coliformes Totais e Presença de <i>Escherichia coli</i> em Leite Cru Resfriado .....	34
3.8. Contagem de Microrganismos Psicotróficos Totais em Leite Cru Resfriado.....	34
3.9. Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> em Leite Cru .....	34
3.10. Avaliação da Multiplicação de Mesófilos Totais, Psicotróficos Totais e <i>Staphylococcus aureus</i> no Leite Cru Resfriado e a Temperatura Ambiente .....	35
3.11. Análise de Eficiência de Limpeza e Sanitização de Bancadas, Equipamentos e Utensílios .....	35
3.12. Isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> em Leite Cru Proveniente de Caminhões de Transporte .....	36
3.13. Isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> em Manipuladores de Alimentos .....	37
3.14. Isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> em equipamentos de Produção .....	37
3.15. Isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> em Produto Final do Laticínio .....	37
3.16. Armazenamento das Amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	38
3.17. Susceptibilidade a Antimicrobianos .....	38
3.18. Diferenciação de Linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i> Segundo Perfil de Susceptibilidade a Antimicrobianos .....	38
3.19. Diferenciação de Linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i> por Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE) .....	39
3.20. Determinação Numérica do Índice de Discriminação (D) .....	40
3.21. Análises Estatísticas .....	41
3.22. Determinação de Perigos e Pontos Críticos de Controle (PCC) e Verificação da Eficiência do Sistema APPCC .....	41
	43
<b>4. RESULTADOS .....</b>	
4.1. Contaminação de Leite Cru por Mesófilos Totais .....	43
4.2. Contaminação por Coliformes Totais e Presença de <i>Escherichia coli</i> no Leite Cru .....	44
4.3. Contaminação por Microrganismos Mesófilos Totais no Leite Cru Resfriado .....	46
4.4. Contaminação por Coliformes Totais e Presença de <i>Escherichia coli</i> no Leite Cru Resfriado .....	48
4.5. Contaminação por Microrganismos Psicotróficos Totais no Leite Cru Resfriado .....	49
4.6. Contaminação do Leite Cru por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	51
4.7. Avaliação da Multiplicação de Mesófilos Totais, Psicotróficos Totais e <i>Staphylococcus aureus</i> no Leite Cru Resfriado e à Temperatura Ambiente .....	52

4.7.1. Crescimento de microrganismos mesófilos totais no leite cru ....	52
4.7.2. Crescimento de microrganismos psicrotróficos totais no leite cru .....	54
4.7.3. Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> no leite cru .....	55
4.8. Verificação de Eficiência de Limpeza e Sanitização de Bancadas, Equipamentos e Utensílios .....	56
4.9. Verificação de Procedimentos de Limpeza de Superfícies Através da Produção de Luminescência .....	58
4.10. Isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> em Leite Cru Proveniente de Caminhões de Transporte, Manipuladores e Ambiente de Produção .....	59
4.11. Isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> em Produto Final .....	60
4.12. Susceptibilidade a Antimicrobianos .....	60
4.13. Diferenciação de Linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i> Através de Perfil de Susceptibilidade a Antimicrobianos .....	61
4.14. Genotipagem de <i>Staphylococcus aureus</i> por Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE) .....	63
4.14.1. Operadores .....	63
4.14.2. Leite Cru .....	65
4.14.3. Produtos Finais .....	66
4.14.4. Similaridade de DNAs Cromossomais de <i>S. aureus</i> Isolados de Operadores, Leite Cru e Produtos Finais de Laticínio .....	68
4.15. Similaridade de Perfis de Restrição e Procedência dos Isolados .....	70
4.16. Identificação das Prováveis Fontes de Contaminação dos Produtos Finais .....	71
4.17. Comparação Entre as Linhagens Isoladas e o MRSA-POA .....	72
4.18. Contaminação do Produto Final por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	72
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	74
5.1. Contaminação por Mesófilos Totais em Leite Cru e Leite Cru Resfriado .....	74
5.2. Contaminação por Coliformes Totais e Presença de <i>Escherichia coli</i> no Leite Cru e Leite Cru Resfriado .....	79
5.3. Contaminação por Microrganismos Psicrotróficos Totais no Leite Cru Resfriado .....	82
5.4. Contaminação do Leite Cru por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	84
5.5. Melhorias a Serem Implantadas a Partir das Análises Microbiológicas do Leite Cru .....	86
5.6. Avaliação da Multiplicação de Mesófilos Totais, Psicrotróficos Totais e <i>Staphylococcus aureus</i> no Leite Cru Resfriado e à Temperatura Ambiente .....	87
5.6.1. Crescimento de microrganismos mesófilos totais no leite cru ....	88
5.6.2. Crescimento de microrganismos psicrotróficos totais no leite cru .....	89
5.6.3. Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> no leite cru .....	90
5.7. Análise de Eficiência de Limpeza e Sanitização de Bancadas, Equipamentos e Utensílios .....	92

<b>5.8. Verificação de Procedimentos de Limpeza de Superfícies Através da Produção de Bioluminescência .....</b>	<b>94</b>
<b>5.9. Isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> Provenientes de Leite Cru em Caminhões de Transporte .....</b>	<b>95</b>
<b>5.10. Isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> em Manipuladores de Alimentos .....</b>	<b>95</b>
<b>5.11. Isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> em Equipamentos de Produção .....</b>	<b>97</b>
<b>5.12. Isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> em Produto Final.....</b>	<b>97</b>
<b>5.13. Susceptibilidade a Antimicrobianos .....</b>	<b>97</b>
<b>5.14. Diferenciação de Linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i> Através de Perfil de Susceptibilidade a Antimicrobianos .....</b>	<b>101</b>
<b>5.15. Genotipagem de <i>Staphylococcus aureus</i> por Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE) .....</b>	<b>102</b>
<b>5.15.1. Operadores .....</b>	<b>104</b>
<b>5.15.2. Leite cru .....</b>	<b>105</b>
<b>5.15.3. Produtos Finais Contaminados por <i>S. aureus</i> e a Diversidade de linhagens em Indústrias de Alimentos.....</b>	<b>105</b>
<b>5.16. Similaridade de Perfis de Restrição e Procedência dos Isolados .....</b>	<b>106</b>
<b>5.17. Identificação por PFGE das Fontes de Contaminação dos Produtos Finais .....</b>	<b>107</b>
<b>5.18. Comparação Entre a Capacidade de Diferenciação de Linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i> por PFGE e Perfil de Susceptibilidade a Antimicrobianos .....</b>	<b>110</b>
<b>5.19. Comparação Entre as Linhagens Isoladas e o MRSA-POA .....</b>	<b>111</b>
<b>5.20. Ações Corretivas .....</b>	<b>111</b>
<b>5.21. Contaminação do Produto Final por <i>Staphylococcus aureus</i> .....</b>	<b>112</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>113</b>
<b>7. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>116</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>118</b>
<b>9. RESUMO.....</b>	<b>128</b>
<b>10. ABSTRACT .....</b>	<b>129</b>
<b>ANEXO 1 - Análises Estatísticas .....</b>	<b>130</b>
<b>ANEXO 2 - Fluxogramas de Produção .....</b>	<b>135</b>
<b>ANEXO 3 – Produção Relacionada as BPF e APPCC .....</b>	<b>141</b>

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Contagens de mesófilos e psicrotróficos totais em leite cru antes da utilização de ordenhadeira, após utilização de ordenhadeira e dentro de resfriador em propriedades rurais .....	47
2. Presença e quantidade de <i>S. aureus</i> em manipuladores, leite cru em caminhões de transporte, ambiente de produção (utensílios e equipamentos) e produto final .....	59
3. Susceptibilidade a antibióticos de linhagens de <i>S. aureus</i> isolados em manipuladores, leite cru em caminhões de transporte e produto final.....	60
4. Perfis de susceptibilidade a antimicrobianos das amostras de <i>S. aureus</i> isoladas do Laticínio .....	62
5. Distribuição de linhagens de <i>S. aureus</i> isoladas de operadores, leite cru e produtos finais nos grupos de similaridade do dendograma gerado por PFGE .....	70
6. Prováveis fontes de contaminação de produtos finais por <i>S. aureus</i> segundo análise por PFGE .....	71

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Contaminação por microrganismos mesófilos totais no leite cru .....	43
2. Contaminação por coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> no leite cru .....	45
3. Contaminação por microrganismos mesófilos totais no leite cru resfriado.....	46
4. Contaminação por coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> no leite cru resfriado.....	49
5. Contaminação por microrganismos psicotróficos totais no leite cru resfriado.....	50
6. Contaminação por <i>Staphylococcus aureus</i> no leite cru .....	51
7. Crescimento de microrganismos mesófilos totais em leite cru à temperatura ambiente (■22°C) e temperatura de refrigeração (●7°C).....	53
8. Crescimento de microrganismos psicotróficos totais em leite cru à temperatura ambiente (■22°C) e temperatura de refrigeração (●7°C).....	54
9. Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> em leite cru à temperatura ambiente (■22°C) e temperatura de refrigeração (●7°C).....	55
10. Contaminação microbiológica de bancadas, equipamentos e utensílios da área de produção do Laticínio. MQ: mesa de aço inoxidável para preparação de queijo; TQ: tanque para preparação de queijo minas frescal; FQ: formas de queijo; UQ: utensílios para preparação de queijo; AC: ambiente de preparação do creme de leite .....	57
11. Contaminação proveniente de superfícies limpas analisadas pelo método de cultivo em placas (UFC/10cm <sup>2</sup> ) e bioluminescência (URL) quantificada pelo aparelho Hy-lite <sup>R</sup> (Merck) .....	58
12. Exemplos de perfis de bandas de DNA cromossomal de <i>Staphylococcus aureus</i> clivados com <i>Sma I</i> isolados em laticínio.....	63
13. Dendograma de comparação dos perfis de bandas de DNA cromossomal de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de operadores do Laticínio. MRSA-POA: <i>S. aureus</i> meticilina resistente isolado em hospitais de Porto Alegre. Coluna da direita: número de amostragens de cada isolado .....	64
14. Dendograma de comparação dos perfis de bandas de DNA cromossomal de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de leite cru. MRSA-POA: <i>S. aureus</i> meticilina	

resistente isolado em hospitais de Porto Alegre. Coluna da direita: número de amostragens de cada isolado .....	66
15. Dendograma de comparação dos perfis de bandas de DNA cromossomal de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de produtos finais do Laticínio. MRSA-POA: <i>S. aureus</i> metilina resistente isolado em hospitais de Porto Alegre. Padrão: DNA de <i>S. aureus</i> utilizado como padrão interno. Coluna da direita: número de amostragens de cada isolado .....	67
16. Dendograma de comparação dos perfis de bandas de DNA cromossomal de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de operadores, leite cru e produtos finais do Laticínio. MRSA-POA: <i>S. aureus</i> metilina resistente isolado em hospitais de Porto Alegre. Leite past.: leite pasteurizado. Padrão: DNA de <i>S. aureus</i> utilizado como padrão interno. Coluna da direita: número de amostragens de cada isolado .....	69
17. Contaminação de produto final por <i>Staphylococcus aureus</i> no período de 1996 a 1999 no Laticínio .....	73

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. O Aumento da Produtividade e a Qualidade dos Produtos alimentícios**

O setor produtivo de alimentos no Brasil vem demonstrando a necessidade de investimentos expressivos na qualidade de seus produtos, pré-requisito esse indispensável para a manutenção e expansão de mercados internos e externos.

O investimento em qualidade deixou de ser um atributo opcional empregado somente por algumas empresas, tornando-se uma imposição clara de mercado. Além disso, nas indústrias de alimentos a necessidade de qualidade é ainda maior, uma vez que problemas de saúde pública devem ser evitados prioritariamente às necessidades impostas por mercados competitivos.

Adicionado a isso, nos últimos anos, os casos de infecções e intoxicações alimentares vêm crescendo de forma expressiva (JAY, 1996). Esse aumento nas estatísticas oficiais acontece de forma semelhante para praticamente todos os agentes microbiológicos de enfermidades transmitidas por alimentos e pode ser justificado pelo desenvolvimento de melhores tecnologias de identificação de microrganismos, pelo incremento populacional mundial e pelo aumento da produção de alimentos.

Há alguns anos, houve um aumento importante de produção nas indústrias de alimentos no Brasil, contudo não houve equivalência semelhante no aumento do faturamento das mesmas. A industrialização de volumes cada vez maiores de alimentos, torna-se mais difícil, podendo resultar em perdas na qualidade.

## 1.2. O Setor Leiteiro e a Necessidade de Expansão

Dentre os diversos setores das indústrias de alimentação brasileiras, o de laticínios pode ser considerado um dos mais importantes. Só no ano de 1996, ele foi responsável pela movimentação de R\$ 10,2 bilhões, representando 16,3% do faturamento total da indústria de alimentação (LARANJA, 1997). O consumo "per capita" de leite (litros/habitante/ano) no Brasil aumentou 28% de 1990 para 1998, sendo que a produção formal cresceu 16% e a informal 52% no mesmo período. Só a produção de leite longa vida aumentou 895% (WILKINSON, 1999), evidenciando fortes tendências de expansão de mercado.

Como consequência do aumento do mercado laticinista houve também o incremento das importações de leite. Em 1995, o Brasil importou 461.193 toneladas de leite principalmente de países do Mercosul e União Européia. No período de 1990 a 1998, houve significativo crescimento das importações (146%), resultando em acentuada queda dos preços pagos aos produtores brasileiros (JANK et al., 1999). Só no período de janeiro a outubro de 1998, o país gastou cerca de US\$ 440 milhões correspondentes a importação de 2 bilhões de litros de leite (cerca de 10% da produção brasileira), com crescimento de 16,6% em relação ao ano de 1997. O mais grave é que o grande crescimento das compras externas ocorreu após a adoção de um conjunto de medidas do Governo Federal brasileiro para conter importações de produtos lácteos, (HEEMANN, 1998 comunicação pessoal). Em vista disso, atualmente uma das metas das indústrias de laticínios, assim como do Governo Federal é diminuir a taxa de importação, aumentando a produção interna do leite.

### 1.3. O Aumento da Produtividade de Leite

A projeção de importações feita pelo IBGE em 1997 para os anos de 1998, 1999 e 2000 foi de 812, 735 e 667 milhões de litros respectivamente, mesmo sendo o consumo aumentado de 20.194 para 22.588 milhões de litros para o mesmo período (LARANJA, 1997).

Ainda o mesmo autor considera ser possível um aumento médio anual da produção interna de leite de 7 a 8% e que a elevação no consumo de lácteos deve estabilizar na faixa de 3 a 4% ao ano, deduzindo que a auto-suficiência na produção e consumo de leite brasileiro deva ser atingida até o ano 2001.

Comparando-se perfis pecuários de diferentes países, nota-se que a produção anual de leite no Brasil situa-se em torno de 19 bilhões de litros provenientes de um rebanho de 20 milhões de animais, sendo que os Estados Unidos da América produzem 70,30 bilhões de litros com apenas 9,3 milhões de animais. A vizinha Argentina produz anualmente 8,76 bilhões de litros de leite por ano com um rebanho aproximado de 2,4 milhões de cabeças (JANK e GALAN, 1997). A produtividade (litros/vaca/ano) de leite do Brasil, Argentina e EUA pode ser expressa em 950, 3650 e 7559 respectivamente, evidenciando uma significativa diferença da capacidade de produção dos rebanhos de cada país.

Essa diferença de produtividade pode ser justificada principalmente pela falta de investimento no manejo do gado leiteiro, o qual no Brasil ainda é, em grande parte, gado criado para abate, produzindo o leite como subproduto. Para fins de comparação, a União Européia, a qual é hoje em dia o maior exportador de leite a nível mundial, investe cerca de US\$ 3,4 bilhões por ano nesse setor (JANK, 1999). Atualmente, o Brasil estuda o

investimento de R\$ 1 bilhão ao longo de três anos para a melhoria de equipamentos e instalações dos produtores de leite em todo o país (CONIL, 1999).

Além disso, em resposta as crises mundiais econômicas, as indústrias brasileiras foram forçadas a abaixar os preços pagos ao produtor, resultando em expressiva crise do setor produtivo leiteiro. Só no Rio Grande do Sul, cerca de 85.000 produtores atuam na pecuária de leite e são responsáveis pelo emprego de 400.000 pessoas (produtores e familiares) que dependem diretamente desse mercado (HEEMANN, 1998 - comunicação pessoal).

O significativo aumento da produtividade de leite, a fim de suprir o consumo interno brasileiro e reduzir as importações, tem acontecido sem estrutura apropriada para tanto. Como consequência, há o reflexo direto na qualidade da composição e conteúdo microbiológico do leite brasileiro e seus derivados, classificando-os como produtos de segunda linha, que não atendem as especificações sanitárias brasileiras ou internacionais, tornando-os insatisfatórios ao comércio interno ou exportações.

#### **1.4. A Melhoria de Qualidade do Leite Produzido no Brasil**

O aumento da qualidade do leite e seus derivados está condicionado a ações conjuntas de melhorias de manejo do rebanho e processamento adequado do leite durante a sua industrialização. Com o intuito de atingir esses propósitos foi criado o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite - PNQL, lançado pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) do Ministério da Agricultura e Abastecimento em 05 de maio de 1998. Tal programa foi formulado com a participação de diversas entidades representativas da cadeia leiteira e visa basicamente colocar o Brasil em condições de competitividade com os países produtores de leite de alto padrão. Um dos

objetivos desse programa é buscar para todo o leite brasileiro a qualidade de leite tipo A. Para tanto, diversos incentivos provenientes de Governo Federal objetivam reduzir gradativamente a contaminação microbiana do leite cru, sendo que em 01/07/2002, data em que começa a vigorar uma nova legislação, o leite deverá conter contagem global de mesófilos de no máximo  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL (BARROS et al., 1999). A fim de atingir essas contagens e, mais tarde contagens de leite tipo A, a contaminação microbiana do leite recebido no laticínio deve ser significativamente reduzida, ou seja as condições a nível de propriedade rural devem ser significativamente melhoradas.

Segundo a visão das indústrias de laticínios, as condições básicas que devem ser providas pelo Governo Federal para a melhoria da qualidade microbiológica do leite, seriam as seguintes: 1) adequação de estradas para a utilização de caminhões tanque na coleta a granel; 2) energia elétrica estável à disposição da propriedade leiteira; 3) defesa contra as importações desleais e disponibilidade de crédito para investimentos em máquinas e equipamentos necessários ao resfriamento do leite a nível de propriedade rural (CNA, 1998).

Na verdade, esse aumento da qualidade a nível de produtores depende de ações políticas, que ultrapassam em muito a simples aplicação do conhecimento técnico. É preciso, primeiro, dar condições ao produtor, melhorando a sua qualidade de vida e condições de trabalho, resultando em processo longo e oneroso.

Apesar dessas dificuldades, os laticínios não podem se eximir da responsabilidade de produzir alimentos seguros, livres de contaminações químicas, físicas ou biológicas prejudiciais à saúde humana. Em vista disso e paralelamente às ações governamentais, essas indústrias vêm procurando melhorias tecnológicas e sistemas de garantia de qualidade

os quais possam minimizar os problemas oriundos da má qualidade de matérias primas ou falhas no processamento de laticínios.

### **1.5. A Prevenção de Doenças Transmitidas por Alimentos**

A melhoria da qualidade microbiológica do leite cru certamente é um ponto primordial na qualidade final de derivados lácteos (GRUETZMECHER e BRADLEY JR., 1999). Sendo o leite cru um produto significativamente contaminado, muitas vezes, por microrganismos patogênicos (CLIVER, 1990; JAY, 1996; AHRABI et al., 1998; PIRTTIJARVI et al., 1998; YOSHIDA et al., 1998), severos cuidados no seu processamento devem ser empregados com o intuito de prevenir doenças de origem alimentar.

A prevenção de toxinfecções tem assumido papel de grande importância em qualquer indústria produtora de alimentos, uma vez que a sua ocorrência pode acarretar em expressivos gastos monetários e perda da confiabilidade por parte dos consumidores. Os impactos econômicos diretos gerados por tais doenças podem ser citados como custos de tratamento, perdas de produção e custos de recolhimento de produtos, enquanto os impactos indiretos incluiriam despesas legais, perdas de mercado, perda de confiança nos produtos e despesas com implantação de sistemas de controle ineficientes. Nos EUA tais custos são estimados em US\$ 5 a 6 bilhões, já no Canadá em US\$ 1 a 2 bilhões por ano (McNAB, 1998).

A incidência anual nos EUA de toxinfecções é estimada em 6,5 a 33 milhões de casos, dos quais aproximadamente 9000 resultam em morte (McNAB, 1998). Além disso, cerca de 1 a 5% dos casos agudos resultam em seqüelas graves (BAIRD-PARKER, 1994).

MORTLOCK et al. (1999) relatam que ocorreram 90.382 casos notificados de toxinfecções na Inglaterra e País de Gales em 1997, sendo que tais números, sem dúvida, subestimam os reais níveis de ocorrência dessas doenças entre a população.

No Brasil, só em 1997, foram notificados 507 surtos com 9287 casos e oito óbitos segundo os dados fornecidos pelas Secretarias Estaduais de Saúde, o que com certeza são dados muito aquém da realidade, em vista do precário sistema de monitorização de surtos que há na maioria dos estados brasileiros (ROBBS, 1999).

A nível de Rio Grande do Sul, houve 1366 surtos registrados de enfermidades transmitidas por alimentos no período de 1987 a 1998, dos quais 34 deles (3,5%) foram proporcionados pela ingestão de leite ou derivados lácteos. Dentre os 1366 surtos registrados, em 316 deles (32,7%) os alimentos envolvidos não foram identificados (RIO GRANDE DO SUL, 1998).

No setor leiteiro brasileiro, a importância dos microrganismos patogênicos em relação ao impacto econômico situa-se em primeiro lugar sobre os prejuízos em decorrência de perdas por sanidade do gado e qualidade do leite, os quais em 1997, chegaram a R\$ 615,4 milhões (DIPOA/DAS/MAA, *apud* ROBBS, 1999). Cabe ressaltar que a falta de dados epidemiológicos não permite incluir os prejuízos decorrentes de doenças humanas provocadas pela ingestão de produtos lácteos contaminados (como os acima citados), os quais são bastante frequentes ( GELLI et al., 1992; WENDPAD e ROSA, 1993; SANTOS et al. 1996; JAY, 1996; CARMO et al., 1999).

Em vista da elevada importância de prevenção de toxinfecções e a fim de reduzir os riscos crescentes à saúde pública advindos de suprimentos alimentares contaminados, indústrias e órgãos legisladores estão adotando sistemas de gerenciamento baseados na

produção higiênica de alimentos. Um desses sistemas é o de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (MORTLOCK, 1999).

### **1.6. O Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC)**

Esse sistema conhecido como Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) do inglês "Hazard Analysis Critical Control Point" (HACCP) é recomendado por diversas organizações como a International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), a National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF), o Codex Alimentarius (KUAYE, 1995), a International Dairy Foods Association (IDFA, 1996), a World Health Organization (WHO) (LEITÃO, 1993), o Ministério da Saúde e o Ministério da Agricultura e do Abastecimento do Brasil a fim de garantir a produção de alimentos seguros e evitar a ocorrência de toxinfecções.

O APPCC é um sistema no qual a segurança alimentar é viabilizada através da análise e controle de perigos biológicos, químicos e físicos em cada passo da produção de alimentos, a partir da matéria prima até o consumo do produto final (NACMCF, 1998). Ele é reconhecido como um sistema simples, racional e muito eficiente na prevenção de enfermidades transmitidas por alimentos.

Embora já decorridos aproximadamente 40 anos dos trabalhos pioneiros que culminaram na disseminação do método APPCC (LEITÃO, 1997), ainda hoje ele não está implantado na maioria das indústrias de alimentação do Brasil. Mais agravante é o fato desse sistema ser necessário como instrumento de inspeção em todas as indústrias de alimentos brasileiras desde o início de 1994 através da portaria 1428/93 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1993).

### 1.6.1. O Objetivo do APPCC

Apesar do APPCC ter sido criado para garantir principalmente a segurança alimentar (IAMFES, 1991; LEITÃO, 1997; NACMCF, 1998) seus conceitos também podem ser estendidos de forma mais abrangente, com o objetivo de garantir a qualidade do produto (HAJDENWURCEL, 1997a; PANNETTA, 1997; BRASIL, 1998). Um exemplo disso é a aplicação desse sistema também nos processos produtivos de alimentos com baixa probabilidade de contaminação microbiológica patogênica (café, vinho, refrigerantes, entre outros). Fundamentalmente, o APPCC busca garantir a segurança alimentar, como um atributo da qualidade, através do controle e registro dos processos produtivos, assegurando assim os padrões de identidade e qualidade dos produtos.

### 1.6.2. Princípios do APPCC

Sendo o APPCC um sistema preventivo, ele busca evitar problemas antes que os mesmos ocorram, remediando-os com ações corretivas imediatas ou impedindo que se repitam.

Esse sistema é considerado racional, uma vez que é baseado em dados registrados sobre causas de doenças e de deterioração. Ele enfatiza a atenção em operações críticas, onde o controle é essencial, diferindo da inspeção tradicional, voltada para a avaliação de fatores de natureza estética ou para o atendimento de normas muitas vezes sem significado maior à saúde pública (LEITÃO, 1993).

Basicamente o APPCC está estruturado em sete passos principais: 1) análise de perigos (*Hazards*) em todas as etapas ou procedimentos da produção de alimentos; 2) identificação de pontos críticos de controle (PCC) nessas etapas ou procedimentos; 3)

estabelecimento de limites críticos aceitáveis para cada PCC identificado; 4) monitoramento desses PCCs; 5) estabelecimento de ações corretivas para os PCCs fora dos limites estabelecidos; 6) armazenamento de dados e registros de todo o sistema e 7) verificação do funcionamento do sistema conforme as expectativas da indústria.

### **1.6.3. Métodos Auxiliares na Identificação de Perigos e Pontos Críticos de Controle em Laticínios**

No sistema APPCC, talvez a etapa mais importante ou, no mínimo de grande relevância na sua implantação seja a identificação dos perigos e pontos críticos de controle (PCC). É com base nessas etapas que todo o sistema se sustentará e a não identificação ou a identificação errônea de PCCs pode resultar em excesso de trabalho, gastos desnecessários, fiscalização de procedimentos que não garantam a segurança ou qualidade do alimento, resultando, por conseguinte, em falha do sistema. Por esses motivos, análises críticas do processo devem ser realizadas, assim como devem ser escolhidos métodos analíticos eficientes e precisos. Tais metodologias devem ter respaldo oficial e/ou científico para que possam retratar com segurança a realidade da indústria em determinado procedimento ou etapa do processo. Ao contrário dos métodos de monitoramento, onde dá-se preferência pela adoção de análises rápidas (IAMFES, 1991; LEITÃO, 1993; NACMCF, 1998), simples e pouco onerosas, na identificação de perigos e PCCs também podem ser utilizadas metodologias mais complexas e laboriosas. Essas são adequadas a fim de executar com mais precisão a avaliação inicial do sistema, tornando o restante do mesmo mais acurado.

Alguns exemplos de metodologias que podem ser utilizadas em avaliações de laticínios são apresentadas abaixo:

### **1.6.3.1. Métodos Químicos**

Dentre os métodos químicos analíticos aplicáveis ao sistema APPCC em laticínios podem ser destacadas as medições de pH / acidez .

As medições de acidez são realizadas rotineiramente a nível de usina no recebimento do leite. O leite geralmente é analisado pelo método de Dornic, devendo estar dentro da faixa de 15 a 20° Dornic, correspondentes a pH entre 6,6 e 6,8 (FAGUNDES, 1997). Essa avaliação é essencial, uma vez que a acidez elevada geralmente é proveniente de altas contagens microbianas que podem acarretar em mudanças organolépticas do produto principalmente durante a pasteurização.

Em outros processos da produção de laticínios torna-se importante o controle do pH. Como exemplo disso, pode ser citada a produção de iogurte, onde o resfriamento é realizado uma vez tendo sido atingido o pH de 4,5 a 4,7, o qual indica a acidez correta para as características desejadas desse produto.

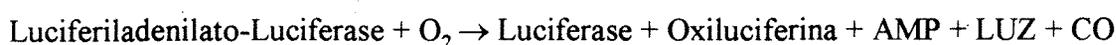
### **1.6.3.2. Métodos Físicos**

Dentre as avaliações físicas relevantes para sistemas APPCC em laticínios as medidas de temperatura são, provavelmente, as mais importantes. A temperatura de operação de pasteurizadores ou sistemas UHT (Ultra High Temperature) são de grande relevância e freqüentemente referidas como PCCs a serem monitorados. Medidas das temperaturas internas de câmaras frias, resfriadores, assim como dos caminhões de coleta a granel ou tanques de armazenamento são muito importantes na prevenção do crescimento microbiano. Além disso, a temperatura de processamento do leite varia de acordo com o

produto a ser produzido e o seu controle é indispensável na manutenção dos padrões de identidade e qualidade.

### 1.6.3.3. Métodos Bioquímicos

Atualmente, um método avançado empregado na avaliação da higiene de equipamentos e utensílios dentro de indústrias de alimentos é a utilização da tecnologia do ATP na produção da bioluminescência. Esse método baseia-se na propriedade de que toda matéria orgânica, seja de origem microbiana ou não, possui ATP. "Kits" de amostragem contêm a enzima luciferase e o substrato luciferina. A emissão de luz devido a reação da enzima com o substrato é dependente de ATP, o qual pode ser fornecido pela matéria orgânica presente em superfícies, equipamentos ou linhas de produção mal higienizadas. Quanto maior a quantidade de matéria orgânica maior a emissão de Unidades Relativas de Luz (URL) a qual é mensurada por um luminômetro (LABORATORY MERCK, 1997). A reação completa pode ser observada abaixo:



Além desse método, a pesquisa de diversas enzimas como a redutase (contaminação geral do leite cru), a peroxidase (abuso de temperatura na pasteurização) ou a fosfatase alcalina (temperatura insuficiente na pasteurização) podem fornecer dados importantes na investigação e monitoração de PCCs.

#### **1.6.3.4. Análises Microbiológicas**

Apesar de serem apontadas como de uso relativo no sistema APPCC devido a demora das análises e custo elevado, as análises microbiológicas são muito importantes na avaliação inicial de perigos e PCCs e também na verificação do sistema (HAJADENWURCEL apud SANTOS, 1996; NACMCF, 1998). Como exemplo disso, diversos pesquisadores vêm utilizando um grande número de análises microbiológicas com essas finalidades (JERMINI et al., 1997; SCHIMITT et al., 1997; SOARES et al., 1999).

O emprego da microbiologia clássica na avaliação das matérias primas é freqüentemente recomendado a fim de certificá-las ou simplesmente estabelecer correlação entre padrões microbiológicos e características sensoriais analisadas durante o recebimento.

Análises microbiológicas também são utilizadas na determinação da qualidade de águas de limpeza, na avaliação de portadores de microrganismos potencialmente patogênicos, na investigação da eficiência de desinfecção de mãos, equipamentos e utensílios, sendo dificilmente substituídas por outros métodos.

#### **1.6.3.5. Métodos Moleculares**

Apesar de ainda pouco utilizados devido aos custos elevados e a complexidade de realização, tais métodos podem ser aplicados com resultados muito eficientes em um sistema APPCC em laticínios. A verificação precisa de linhagens potencialmente patogênicas no processamento de alimentos, assim como a identificação de fontes de contaminação e o estudo da disseminação de microrganismos podem ser investigadas por métodos como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (RIJPENS et al., 1999), a análise do padrão plasmidial (DODD, 1994), a análise do polimorfismo do DNA por amplificação

aleatória (RAPD) (DESTRO et al., 1996), a ribotipagem (RALYEA et al. 1998) ou a eletroforese de campo pulsado (PFGE) (McCULLAGH et al., 1998). O emprego desses métodos certamente necessita de maior investimento inicial, mas pode trazer resultados que não seriam alcançados com metodologias tradicionais, mesmo empregando muito mais tempo ou mesmo recursos financeiros.

### **1.7. O APPCC em Laticínios**

A indústria de laticínios possui muitos anos de experiência com os princípios básicos do APPCC. O fato da brucelose, tuberculose e outras zoonoses poderem ser transmitidas através da ingestão do leite e seus derivados, foi reconhecido no século passado, sendo o processamento térmico do leite adotado como medida preventiva efetiva (HAJDENWURCEL, 1997b).

Contudo, sabe-se atualmente que a simples aplicação desse tratamento térmico não garante a total segurança desses produtos, principalmente se manipulados incorretamente ou se a qualidade inicial do leite estiver comprometida.

Baseando-se na trajetória de empresas alimentícias nos últimos anos, nas oportunidades de crescimento, sofisticação e ampliação de produtos novos e importados, nas evoluções da legislação vigente e postura do consumidor, as tendências de melhorias de processos e produtos caminham para o conceito de alimento assegurado. Isso significa que a condição básica para as empresas, nesse segmento, está fortemente relacionada com os princípios do APPCC, sendo ressaltada a importância desse sistema para o desenvolvimento da indústria de leite e derivados (OLIVEIRA, 1997).

Na indústria de laticínios, a presença de perigos microbiológicos, químicos e físicos devem ser sempre considerados. Perigos microbiológicos incluem os agentes clássicos de

zoonoses além daqueles microrganismos deteriorantes. Dentre os perigos químicos pode-se citar a presença de pesticidas, antibióticos, aflatoxina, nitratos, chumbo, entre outros, sendo os perigos físicos (pedaços de metal, vidro, madeira, etc.) considerados de menor importância, porém nunca descartados (HAJDENWURCEL, 1997b).

Quando comparados estatisticamente, os problemas causados por contaminações microbianas dentro de uma indústria de alimentos superam em muito as demais contaminações químicas ou físicas, numa proporção de 100.000/1, justificando assim o interesse na redução ou eliminação de microrganismos ou suas toxinas (SANTOS, 1996).

A contaminação microbiológica em um laticínio e, conseqüentemente os microrganismos contaminantes dos produtos lácteos, na grande maioria das vezes, tem como origem três fontes básicas: 1) a matéria prima ou leite cru; 2) os operadores ou manipuladores do alimento; 3) o ambiente de produção, equipamentos e utensílios. MANIE et al. (1999) destacam a qualidade microbiológica do leite cru como um dos principais fatores que podem afetar na qualidade dos produtos lácteos industrializados, mesmo sendo esses processados termicamente. SOARES et al. (1997) verificaram vários manipuladores de alimentos abrigando linhagens de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), as quais apresentaram multi-resistência a antimicrobianos e capacidade enterotoxigênica. Já GRUETZMECHER e BRADLEY JR. (1999) apontam a correta limpeza e sanitização dos equipamentos que processam o leite como uma das melhores formas de aumentar a vida de prateleira e a segurança desses produtos.

Como base nesses dados, a investigação e controle dessas fontes de contaminação devem ser prioridades na implantação de um sistema APPCC em um laticínio.

### 1.8. Microrganismos e o Leite

Os microrganismos que compõem a microbiota do leite cru são aqueles que estão no úbere da vaca, adicionados dos presentes em utensílios ou linhas de processamento.

Sob condições apropriadas de manipulação e armazenamento, a microbiota predominante do leite é Gram positiva, sendo que o leite resfriado por vários dias invariavelmente conterá representantes de alguns ou todos os seguintes gêneros: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Oerskovia*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Listeria*, assim como todos os gêneros ou pelo menos um dos coliformes (JAY, 1996).

O leite pode ser um veículo de doenças principalmente se ingerido cru. Dentre os diversos agentes etiológicos identificados como principais causadores de doenças veiculadas pelo leite pode-se citar o *Mycobacterium tuberculosis*, a *Brucella abortus*, o *Staphylococcus aureus*, a *Listeria monocytogenes*, o *Campylobacter jejuni*, as Salmonelas, o *Bacillus cereus* e as *Escherichia coli*, sendo alguns deles mais frequentes que outros.

O processo de pasteurização é capaz de inativar todos os microrganismos acima citados com exceção dos esporos de *Bacillus cereus* e da toxina responsável pela intoxicação alimentar do *Staphylococcus aureus*, a qual pode ser termoresistente.

A respeito desse último microrganismo, alguns fatores contribuem para maiores preocupações no que se refere à sua presença em laticínios.

### 1.9. O *Staphylococcus aureus*

Os *S. aureus* não só causam intoxicações alimentares severas como também são responsáveis por diversas complicações clínicas em seres humanos e animais (PRESCOTT, 1996). A prevenção e controle desse microrganismo a muito tempo vem sendo motivo de preocupação na área clínica, assim como em indústrias de alimentos. Após mais de 85 anos da descoberta do *S. aureus* como responsável por intoxicações alimentares (CLIVER, 1990), esse microrganismo continua sendo um dos principais agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos. Além disso, é sabido que o número de casos reais de intoxicações alimentares estafilocócicas é muitas vezes maior que aqueles divulgados pelas estatísticas oficiais, uma vez que, na maioria dos casos, os serviços de saúde não são notificados.

Nos últimos anos, as atenções sobre os *S. aureus* cresceram ainda mais devido ao aparecimento de linhagens multi-resistentes a antimicrobianos (BANNERMANN et al., 1995; DE LENCASTRE et al., 1996; NA'WAS et al., 1998). Os *S. aureus* meticilina resistentes (MRSA), como são conhecidos, têm sido isolados de diferentes tipos de infecções em muitos lugares do mundo e são hoje em dia um dos principais causadores de infecções hospitalares (KUMARI et al., 1997; NA'WAS et al., 1998).

Em 1996, quatro casos de infecções severas por linhagens de *S. aureus* intermediariamente resistente a vancomicina (VISA) foram registrados no Japão e nos EUA. Em um dos casos envolvendo uma criança de 4 meses no Japão, o tratamento com as drogas disponíveis não foi suficiente, sendo que a cavidade torácica teve que permanecer aberta por dois meses enquanto compressas contendo antisépticos foram aplicadas três vezes ao dia a fim de eliminar o microrganismo. Os outros três casos registrados nos EUA

resultaram em complicações severas, sendo que em um deles o paciente foi a óbito (JARET, 1998).

No Brasil, linhagens de VISA já foram isoladas em um hospital de São Paulo, ressaltando a gravidade do problema (OLIVEIRA et al., 1999b).

Se *S. aureus*, como os acima citados, passarem a colonizar matérias primas, operadores ou ambiente de produção de indústrias de alimentos e por elas forem distribuídos, problemas sérios de saúde pública podem ser causados, justificando a investigação desses microrganismos.

#### 1.10. *S. aureus* e alimentos

O *S. aureus* é considerado um dos principais, se não o mais freqüente, causador de intoxicações relacionadas com alimentos em diferentes países (PARDI, 1995). BUZBY e ROBERTS *apud* HAJDENWURCEL (1997a) apresentaram o *S. aureus* como o principal causador de casos de intoxicações alimentares e mortes estimadas nos EUA. Segundo esses autores, tal microrganismo foi responsável por 8.900.000 casos estimados e 7.120 mortes, enquanto as *Salmonellas* não tifóides seriam responsáveis por 800.000 a 4.000.000 de casos e por 800 a 4000 mortes.

No Rio Grande do Sul, 12,7% dos casos de toxinfecções alimentares relatados de 1987 a 1998 foram ocasionados pelo *S. aureus*. Tal bactéria só ficou atrás da *Salmonella* quando relevado o número de casos desenvolvidos (RIO GRANDE DO SUL, 1998).

O *S. aureus*, assim como a intoxicação alimentar por ele causada já foram diversas vezes relacionadas com o consumo de leite cru, leite pasteurizado ou desidratado, sorvete caseiro, queijos, entre outros tipos de produtos lácteos (GELLI et al., 1992; WENDPAD e

ROSA, 1993; SABIONI et al., 1994; JAY, 1996; SANTOS et al. 1996; CARMO et al., 1999).

A presença do *S. aureus* em laticínios é bastante acentuada e preocupante, haja visto que praticamente todo leite cru contém esse microrganismo (ADESIYUN, 1998) e cerca de 30 a 50% dos seres humanos são portadores assintomáticos (SCHAECHTER et al., 1993). Das linhagens isoladas de seres humanos, aproximadamente 30% delas são consideradas enterotoxigênicas (SOARES et al., 1997), sem falar das outras 11 espécies (diferentes do *S. aureus*) do gênero as quais também podem produzir enterotoxinas (JASSIM e DENYER, 1997). Além disso, a principal enterotoxina estafilocócica responsável por intoxicações alimentares (enterotoxina A) apresenta propriedades termoestáveis, não sendo inativada pela pasteurização (CLIVER, 1990; JAY, 1996; MANIE et al., 1999).

#### **1.11. O *S. aureus*, o Leite e a Mastite Bovina**

Grande parte do gado leiteiro do Brasil apresenta mastite clínica ou sub-clínica causada por diversas linhagens de *S. aureus*. A nível mundial, esse microrganismo é o principal causador de mastite (LANGE et al., 1997), sendo portanto facilmente encontrado no leite cru e o responsável por significativas perdas econômicas.

A mastite é também a causa mais importante das perdas econômicas relacionadas às indústrias de laticínios. As perdas anuais nos EUA estão estimadas em US\$ 2 bilhões, sendo que a redução da produtividade mundial de leite é estimada em 380 milhões de litros (GUILDRIY et al, 1998). A evolução dessa infecção ocasiona alterações organolépticas, diminuição do rendimento industrial de produção e contribui também na redução da vida de prateleira dos produtos lácteos (GALLINA et al., 1998; OLIVEIRA et al., 1999a).

O tratamento dessa infecção é a principal causa da presença de antibióticos no leite (GUTERBOCK, 1992), os quais podem persistir por períodos variados dependendo da droga selecionada, da dosagem aplicada, da via de aplicação ou do peso do animal (ZENG et al., 1998).

A presença de antibióticos no leite é um problema bastante grave a nível de saúde pública e processamento industrial, uma vez que tais drogas podem provocar reações alérgicas (principalmente a penicilina) em indivíduos sensíveis e inibir o crescimento de bactérias ácido-láticas necessárias à fabricação de queijos e leites fermentados. Além disso, os antibióticos induzem a resistência bacteriana e podem influenciar as contagens bacterianas do leite através da inibição do crescimento da flora contaminante (GALLINA et al., 1998).

Para o tratamento da mastite, os antibióticos mais difundidos são os  $\beta$ -lactâmicos por possuírem amplo espectro de ação, serem facilmente encontrados no comércio e apresentarem baixo custo (OLIVEIRA, 1998). Contudo, o tratamento da mastite estafilocócica é um pouco mais complicada pelo fato da baixa taxa de cura através de tratamento intra-mamário. Os *S. aureus* tem a capacidade de formar micro abscessos nos ductos dos tetos da vaca, onde as drogas não podem penetrar (GUTERBOCK, 1992). O tratamento parenteral (intramuscular) em conjugação com a terapia intra-mamária podem aumentar a probabilidade de cura, porém também a possibilidade de antibióticos no leite.

### **1.12. O *S. aureus* e o APPCC em Laticínios**

Com base na gravidade do problema da mastite no gado leiteiro, na alta ocorrência do *S. aureus* no leite, em operadores e em produtos finais e na virulência que certas linhagens podem apresentar, a prevenção de quantidades elevadas desse microrganismo ou suas toxinas certamente são um dos principais objetivos de sistemas APPCC em laticínios.

### **1.13. Estudo Epidemiológico e Identificação de Fontes de Contaminação como Parte do Sistema APPCC**

O estudo epidemiológico da contaminação do *S. aureus* em ambientes hospitalares já vem sendo realizado com bastante frequência (BANNERMANN et al. 1995; DE LENCASTRE et al. 1996; UDO et al., 1996; BELKUM et al., 1997; HOEFNAGELS-SCHURERMANS et al., 1997; KUMARI et al., 1997; LEMEITRE et al., 1998; WALKER et al., 1998). Se transferida para as indústrias de alimentos, essa prática pode ser muito útil para a identificação de reais fontes de contaminação, prevenção de intoxicações alimentares e, naturalmente, para o desenvolvimento de planos APPCC.

Se fontes reais de contaminação forem identificadas através desses estudos, esforços sobre procedimentos específicos da produção podem ser direcionados para prevenção dessa bactéria, evitando gastos desnecessários em outros setores ou operadores que não ofereçam problemas. Além disso, medidas de controle de bactérias potencialmente perigosas como o *S. aureus* podem levar à prevenção de outros grupos bacterianos importantes nas indústrias de laticínios como os coliformes fecais, *Salmonellas*, *Listerias*, entre outros.

#### 1.14. Métodos de Estudo Epidemiológico

A identificação das linhagens, entre os isolados de um surto infeccioso, é o passo mais importante para determinar a fonte de contaminação e designar subseqüentes medidas de controle (BANNERMAN et al., 1995; UDO et al., 1996). Com base nisso, métodos suficientemente acurados para a diferenciação de subgrupos dentro de uma mesma espécie são bastante necessários.

Durante a última década, os métodos tradicionais de diferenciação de linhagens, como fagotipagem e sorotipagem, têm sido substituídos por métodos moleculares, como por exemplo, análise de restrição plasmidial (Plasmid Fingerprint) (DODD, 1994), Ribotipagem (Robotyping) (RALYEA et al., 1998), Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, RAPD) (DESTRO et al., 1996; MATTHEWS et al., 1997) e análise cromossomal por Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) (TENOVER et al., 1995; McCULLAGH et al., 1998). Cada um deles certamente tem suas propriedades particulares, porém critérios como reprodutibilidade, poder de discriminação, facilidade de interpretação e realização devem ser considerados (FARBER, 1996).

Apesar da fagotipagem para *S. aureus* continuar sendo usada por diferentes laboratórios de referência por todo o mundo (SCHLICHTING et al., 1993 *apud* TENOVER et al., 1995) e a sorologia continuar sendo bastante utilizada para estudos epidemiológicos de *Salmonella*, o PFGE parece ser o método atual que mais satisfaz as necessidades dos estudos epidemiológicos (SWAMINATHAN e MATAR *apud* TENOVER et al., 1995; DE LENCASTRE et al., 1996).

O PFGE é uma ferramenta molecular bastante reprodutível e com alta capacidade de discriminação entre linhagens muito próximas dentro de uma mesma espécie

(MATUSHEK et al., 1996), fator esse que pode ser bastante necessário dentro de indústrias de laticínios em virtude da grande variedade de linhagens ali presentes. Nesse método, os microrganismos são colocados em pequenos cubos de agarose, lisados, sendo o seus cromossomos digeridos com enzimas de restrição de corte infrequente. Os cubos então são colocados em um gel de agarose e submetidos a campos elétricos com direções alternadas, gerando perfis de bandas de DNA cromossomal. Os perfis produzidos são comparados entre si a fim de identificar a correlação entre eles.

Diversos grupos de pesquisa vêm demonstrando as vantagens dessa técnica sobre outras metodologias de tipagem de *S. aureus*. DE LENCASTRE et al. (1994) diferenciaram 61 amostras de *S. aureus* meticilina resistentes (MRSA) isolados em um hospital em Lisboa. Nestes experimentos, o PFGE seguido de hibridização com sondas radioativas do gene *mecA* foram mais eficientes na diferenciação de linhagens que a ribotipagem, a restrição utilizando a enzima *Cla* I seguida de hibridização com sonda do gene *mecA* e hibridização com o transposon Tn554. BANNERMAN et al. (1995) demonstraram maior poder de discriminação do PFGE quando comparada a fagotipagem na diferenciação de 300 *S. aureus*. Os resultados apresentados foram tão satisfatórios que a fagotipagem, realizada a mais de 30 anos pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC), foi substituída pelo PFGE para diferenciar linhagens de *S. aureus*. HOEFNAGELS-SCHUERMANS et al. (1997) demonstraram que o PFGE foi mais eficiente que o antibiograma, a fagotipagem e a análise do polimorfismo de genes amplificados (PCR-RFLP) na diferenciação de 43 MRSA. No mesmo ano KUMARI et al. (1997) demonstraram que o PFGE apresentou maior poder de discriminação que o PCR na classificação de 180 amostras de MRSA.

Dentro de uma indústria de alimentos, o PFGE pode ser utilizado não só em uma situação específica na resolução de um problema pontual. Mais do que isso, essa técnica pode ser uma ferramenta muito útil ao longo do funcionamento na indústria, pois permite que perfis de bandas de DNA genômico sejam analisadas no início ou decorrer de um plano APPCC e sejam comparadas sempre que necessários, por exemplo, na identificação de fontes de contaminação emergentes de um referido alimento.

Além disso, tais estudos fornecem informação suficiente para levantamentos epidemiológicos, os quais poderão investigar a correlação entre surtos de intoxicações alimentares e infecções hospitalares até então pouco relacionados.

Em virtude de exigências legais e da necessidade de controle das contaminações químicas, físicas e, principalmente microbiológicas de produtos altamente perecíveis como os lácteos, torna-se bastante oportuno a implantação do APPCC na garantia da segurança alimentar. Para tanto, a análise de perigos e identificação de pontos críticos utilizando técnicas modernas, precisas e respaldadas em metodologias científicas confiáveis são bastante apropriadas, para não dizer indispensáveis.

Mais precisamente, um plano APPCC em laticínios deve, sem dúvida alguma, atentar na prevenção de fontes de contaminação dos microrganismos mais comumente encontrados nos laticínios e, sobretudo naqueles microrganismos de maior risco de causarem doenças relacionadas com alimentos como é o caso do *S. aureus*. Dessa forma, além de prevenir contaminações significativamente importantes para esses estabelecimentos, a prevenção do *S. aureus*, pode evitar a contaminação dos produtos finais por outros microrganismos potencialmente patogênicos ou deteriorantes, reduzindo assim a contaminação microbiana geral de uma indústria de alimentos.

Com base nos argumentos apresentados, o presente trabalho tem por objetivos os em seguida listados:

## 2. OBJETIVO GERAL

Identificação de fontes de contaminação microbiológica no processamento de produtos lácteos durante implantação de sistema APPCC em um laticínio.

### 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar falhas operacionais, Perigos e Pontos Críticos de Controle através de:

- 2.1.1) Avaliação da qualidade microbiológica do leite cru.
- 2.1.2) Identificação das prováveis fontes de contaminação do leite cru.
- 2.1.3) Investigação da eficiência dos processos de limpeza e sanitização de equipamentos e utensílios utilizados no processamento de produtos lácteos.
- 2.1.4) Avaliação da percentagem de contaminação do *S. aureus* na matéria prima, operadores, ambiente de produção e produtos finais elaborados pelo Laticínio.
- 2.1.5) Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos dos *S. aureus* isolados.
- 2.1.6) Estudo da dinâmica de disseminação do *S. aureus* no Laticínio em estudo.
- 2.1.7) Investigação das fontes específicas de contaminação de produtos finais pelo *S. aureus* através de fenotipagem e genotipagem.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Descrição do Local**

Situada na serra gaúcha, no município de Nova Petrópolis a cerca de 120 Km de Porto Alegre, a Cooperativa Agropecuária Petrópolis-Coapel (Piá) atua em diversos setores de produção de alimentos. Contando com mais de 3000 cooperativados, os principais produtos elaborados são os laticínios, os doces e rações animais, todos eles distribuídos em quatro supermercados próprios, ou em diversas localidades do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná.

Se considerados todos os setores, a Cooperativa Piá emprega aproximadamente 380 funcionários, sendo 67 no setor de laticínios, 24 no setor de doces, 152 nos supermercados, além de outros 137 em setores de transporte ou suporte de produção.

Desde sua instalação em Nova Petrópolis, a aproximadamente 28 anos atrás, o setor de laticínios tem sido o mais importante da Cooperativa, processando atualmente mais de 150.000 litros de leite por dia, os quais são recolhidos diariamente por 21 caminhões.

Ainda hoje, parte do leite é recolhido em tarros e então levado à usina, perfazendo cerca de 2000 Km diários de coletas. Apesar do sistema de coletas em tarros estar sendo substituído por caminhões para coleta a granel, a rede de coleta permanece grande e dispersa, resultando em tempo elevado a partir da ordenha até o processamento do leite. Interessante ressaltar que cerca de 75% dos fornecedores do leite são pequenos produtores (até 25 litros por dia), dos quais muitos não têm condições de resfriar o leite até o momento da entrega.

Dentro do Laticínio, os principais produtos elaborados são o leite tipo C pasteurizado, o creme de leite, a manteiga, os iogurtes, o doce de leite, o queijo

mussarela, queijo quark, queijo minas frescal e, mais recentemente, o leite esterilizado UHT (ultra high temperature). Em relação a esse último produto, a Cooperativa Piá, além de processar o próprio leite, também beneficia e embala o leite de outros laticínios da região.

### **3.1.1. Setor de Laticínios e o APPCC**

Dentre os diversos setores da Cooperativa Piá e visando a segurança alimentar dos produtos ali produzidos, o setor de laticínios foi o primeiro escolhido para implantação do sistema APPCC. Uma vez implantado no Laticínio, é objetivo da Cooperativa implantar o APPCC nos demais setores.

### **3.2. Meios de Cultura**

Todos meios de cultura utilizados neste trabalho foram das marcas Merck (Darmstadt, Germany), Difco (Detroit, USA) e Oxoid (Hampshire, England) e tem as suas composições descritas logo abaixo.

#### **Ágar Padrão para Contagem (PCA, Oxoid) g/L**

Peptona de caseína 5,0; extrato de levedura 2,5; glicose 1,0; ágar 14,0; pH 7,0 +/- 0,1.

#### **Ágar Cristal Violeta Vermelho Neutro Bile (VRBA, Merck) g/L**

Peptona de carne 7,0; extrato de levedura 3,0; cloreto de sódio 5,0; lactose 10,0; vermelho neutro 0,03; sais biliares 1,5; cristal violeta 0,002; ágar 13,0; pH 7,4 +/- 0,1.

**Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB, Merck) g/L**

Peptona 10,0; fosfato de hidrogênio dipotássico 2,0; lactose 5,0; sacarose 5,0; eosina 0,4; azul de metileno 0,07; ágar 13,5; pH 7,1 +/- 0,1.

**Ágar Baird-Parker (Oxoid) g/L**

Peptona de caseína 10,0; extrato de carne 5,0; extrato de levedura 1,0; piruvato de sódio 10,0; glicina 12,0; cloreto de lítio 5,0; emulsão de gema de ovo 5mL (50% solução salina 0,85%; 50% gema de ovo); ágar 15,0; pH 6,8 +/- 0,2.

**Caldo Cérebro-Coração (BHI, Merck) g/L**

Infusão de cérebro e coração; pH 7,4 +/- 0,2.

**Ágar Triptona de Soja (TSA, Merck) g/L**

Triptona 15,0; Peptona de soja 5,0; Cloreto de sódio 5,0; ágar 20,0; pH 7,0 +/- 0,1.

**Ágar DNase-Manitol (Merck) g/L**

Triptose 20,0; cloreto de sódio 5,0; ácido desoxiribonucleico 2,0; manitol 10,0; azul de bromotimol 0,025; pH 7,3 +/- 0,1.

**Ágar Citrato de Simmons (Merck) g/L**

Dihidrogênio fosfato de amônio 1,0; fosfato de hidrogênio dipotássico 1,0; cloreto de sódio 5,0; citrato de sódio 2,0; sulfato de magnésio 0,2; azul de bromotimol 0,08; ágar 13,0; pH 6,6 +/- 0,1.

**Caldo Vermelho de Metila, Voges-Proskauer (VM-VP, Merck) g/L**

Peptona de carne 7,0; glicose 5,0; tampão fosfato 5,0; pH 6,9 +/- 0,1.

**Caldo Triptona para produção de Indol (Merck) g/L**

Triptona 10,0; cloreto de sódio 5,0; pH 6,9 +/- 0,2.

**3.3. Soluções e Reagentes**

Os compostos químicos das soluções e os reagentes utilizados neste trabalho foram das marcas Sigma Co. (St. Louis, USA), Gibco-BRL Ltd. (Detroit, USA), Reagen (Rio de Janeiro, Brasil) e têm suas composições descritas a seguir. O coagoplasma foi proveniente da Laborclin (Paraná, Brasil). Os discos contendo antibióticos foram fornecidos pela Mast Diagnostics (Merseyside, UK).

**Água Peptonada 0,1%**

Peptona de caseína (Merck) 1,0g; água destilada 1000mL.

**Reativo de Kovacs (prova do indol)**

Paradimetilaminobenzaldeído (Sigma) 5,0g; álcool isoamílico (Merck) 75,0mL; ácido clorídrico concentrado (Merck) 25mL.

**Vermelho de metila (prova do VM)**

Vermelho de metila (Merck) 0,04g; 60mL de etanol absoluto (Merck).

**Solução de Alfa-naftol 5% (prova do VP)**

Alfa-naftol (Merck) 5g; 95mL de etanol absoluto (Merck).

**Solução de hidróxido de potássio (prova do VP)**

Hidróxido de potássio (Merck) 40g; 60mL de água destilada.

**Solução Tampão TE**

Tris-HCl (Sigma) 10mM, pH 8,0; EDTA (Sigma) 1mM, pH 8,0.

**Solução Tampão TBE 0,5X**

Tris-HCl (Sigma) 89mM, pH 8,0; ácido bórico (Sigma) 89mM; EDTA (Sigma) 2mM, pH 8,0.

**Solução de Lise**

EDTA (Sigma) 0,1M pH 8,0; NaCl (Reagen) 1M, sarkosil (Sigma) 0,5%, Tris-HCl (Sigma) 6mM pH 8,0.

**Solução de Lisozima**

Lisozima (Gibco-BRL) 110mg/mL de água destilada, desionizada.

**Solução de Lisoestafina**

Lisoestafina (Sigma) 1000U/mL de água destilada, desionizada.

### **Solução de Proteinase K**

Proteinase K (Gibco-BRL) 2,5g/mL; sarkosil (Sigma) 1%; EDTA (Sigma) 0,5M, pH 8,0.

### **Solução de PMSF**

Fluoreto de Fenil-metil-sulfonila (PMSF-Sigma) 0,8mg/mL de isopropanol (Merck).

### **3.4. Contagem de Microrganismos Mesófilos Totais em Leite Cru**

Utilizando frascos estéreis, foram coletadas 100 amostras de 10mL de leite cru recebido nas recepções 1 e 2 do Laticínio. As coletas foram realizadas no período de abril a dezembro de 1998, sendo que cada recepção foi amostrada em dias diferentes. Todos os experimentos realizados com leite cru nesse trabalho foram amostrados seguindo esse esquema de coleta alternada entre as recepções 1 e 2.

De cada amostra de leite, foram realizadas diluições decimais com água peptonada 0,1% estéril das quais 1mL foi colocado na superfície de uma placa de Petri. Em seguida, o inóculo foi coberto com cerca de 20mL de ágar Padrão para Contagem (PCA) pH 7,0 à temperatura de 50° C, segundo metodologia descrita por FDA (1992). As amostras foram incubadas por 24 horas a 37°C, sendo as colônias de microrganismos logo após quantificadas.

### 3.5. Contagem de Coliformes Totais e Presença de *Escherichia coli* em Leite

#### Cru

Com o propósito de quantificação de coliformes totais, foram coletadas 100 amostras de 10mL de leite as quais foram diluídas decimalmente em água peptonada 0,1% estéril. Aliquotas de 1mL de cada amostra foram colocadas em placas de Petri e então adicionadas de 15mL de ágar Cristal Violeta Vermelho Neutro Bile (VRBA) previamente fundido (45°C). Após solidificação, uma sobrecamada (5mL) do mesmo meio foi adicionada. As placas permaneceram em superfície plana até completa solidificação e foram incubadas por 24-48 horas a 37°C conforme metodologia descrita por SPECK (1976). Colônias roxo-avermelhadas com halo de precipitação da mesma cor foram quantificadas.

A presença de *E. coli* foi investigada semeando 1 a 3 colônias provenientes do ágar VRBA na superfície de ágar Eosina Azul de Metileno (EMB). As placas foram incubadas por 24-48 horas a 37°C. As colônias típicas de *E. coli* (centro escuro e brilho verde metálico com halo de precipitação) foram confirmadas pelos testes bioquímicos do indol, Voges-Proskauer, vermelho de metila e citrato, segundo recomendação da FDA (1992).

### 3.6. Contagem de Microrganismos Mesófilos Totais em Leite Cru Resfriado

A fim de quantificar os microrganismos mesófilos totais, foram coletadas 100 amostras de 10mL de leite cru resfriado recebido pelo Laticínio. O leite cru analisado nesse trabalho foi resfriado dentro da propriedade rural produtora de leite, logo após a ordenha, e transportado até o Laticínio sob refrigeração (7°C). A metodologia de análise microbiológica foi a mesma descrita para quantificação de microrganismos mesófilos totais em leite cru (item 3.4.).

### **3.7. Contagem de Coliformes Totais e Presença de *Escherichia coli* em Leite Cru Resfriado**

A fim de quantificar os coliformes totais e verificar a presença de *E. coli*, foram coletadas 100 amostras de 10mL de leite cru resfriado recebido pelo Laticínio. A metodologia de análise bacteriológica foi a mesma descrita para quantificação de coliformes totais e presença de *E. coli* em leite cru (item 3.5.).

### **3.8. Contagem de Microrganismos Psicotróficos Totais em Leite Cru Resfriado**

Para a quantificação de microrganismos psicotróficos totais, foram coletadas 100 amostras de 10mL de leite cru resfriado entregues ao Laticínio. As amostras coletadas foram diluídas decimalmente em água peptonada 0,1% estéril, sendo que aliquotas de 0,1mL foram plaqueadas na superfície de ágar Padrão para Contagem (PCA) e então incubadas a 21°C por 25 horas (SILVA et al., 1997), sendo o número de UFC quantificado.

### **3.9. Contagem de *Staphylococcus aureus* em Leite Cru**

Foram coletadas 50 amostras de 100mL de leite cru recebido no Laticínio. A partir de cada uma das amostras foram feitas diluições decimais sucessivas em água peptonada 0,1% estéril, das quais 0,1mL foram plaqueados em ágar Baird-Parker (SPECK, 1976). As placas foram incubadas a 37°C por 24-48 horas. De cada placa, 1 a 3 colônias típicas (pretas com 1 ou 2 halos ao redor) foram submetidas as provas bioquímicas da coagulase, catalase, DNase, oxidação e fermentação do manitol e coloração de Gram (FDA, 1992).

### **3.10. Avaliação da Multiplicação de Mesófilos Totais, Psicrotróficos Totais e *Staphylococcus aureus* no Leite Cru Resfriado e à Temperatura Ambiente**

Com o intuito de quantificar o desenvolvimento bacteriano, curvas de crescimento de mesófilos totais, psicrotróficos totais e *S. aureus* foram realizadas em leite cru resfriado (7°C) e a temperatura de 22°C considerada neste trabalho como temperatura ambiente. Duas amostras de 200mL de leite cru foram coletadas em frascos estéreis, logo após a ordenha, a partir de tarros de leite dentro da propriedade produtora. As amostras foram transportadas imediatamente da propriedade produtora até o laboratório de análises em condições isotérmicas, sendo então uma delas colocada a temperatura de 7°C e a outra incubada a temperatura de 22°C. A cada duas horas, alíquotas de 1mL de cada um dos frascos foram diluídas decimalmente em água peptonada 0,1% estéril, sendo 20µL de cada diluição plaqueados em triplicata pelo método da gota (MILLES e MISRA, 1938). As contagens de mesófilos totais e psicrotróficos totais foram realizadas em meio PCA incubados por 24 horas a 37°C e 21°C, respectivamente. A evolução do crescimento de *S. aureus* foi investigada em meio Baird-Parker incubado a 37°C por 48 horas, sendo as colônias típicas confirmadas pelo teste da coagulase. A média aritmética das triplicatas foi utilizada para a expressão dos resultados.

### **3.11. Análise de Eficiência de Limpeza e Sanitização de Bancadas, Equipamentos e Utensílios**

Foram analisadas 50 superfícies limpas (água e sabão clorado após utilização na produção de laticínios) e 25 superfícies sanitizadas (água, sabão clorado e água fervente antes de serem utilizadas na produção de laticínios) de bancadas, equipamentos e

utensílios da sala de produção de laticínios. As superfícies foram analisadas embebendo cotonete estéril em 1mL de água peptonada 0,1% estéril, suplementada de 0,5% (p/v) de tiosulfato de sódio e esfregando-o em 100cm<sup>2</sup> de cada superfície em três direções diferentes. Em seguida, o cotonete foi novamente introduzido na água peptonada 0,1% e então agitado dentro do frasco. Dessa suspensão, 0,1mL foram plaqueadas em meio ágar padrão para contagem (PCA) e então incubados por 72 horas a 37°C.

Com o intuito de comparação entre UFC/100cm<sup>2</sup> e Unidades Relativas de Luz (URL), 12 das 50 amostras de superfícies limpas foram também analisadas utilizando a tecnologia de quantificação de ATP por bioluminescência com o equipamento HY-LITE™ (Merck).

### **3.12. Isolamento de *Staphylococcus aureus* em Leite Cru Proveniente de Caminhões de Transporte**

As amostragens referentes ao isolamento de *S. aureus* a partir do leite cru, operadores e ambiente de produção foram realizadas no período de maio de 1997 a novembro de 1999.

Com o intuito de amostrar diferentes linhagens de *S. aureus* provenientes de diferentes regiões de abastecimento, foi coletada uma amostra de 100mL de leite cru de cada um dos 21 caminhões de transporte de leite da Cooperativa Piá. Destas amostras, 0,1mL de leite foram plaqueados em ágar Baird-Parker. As placas foram incubadas a 37°C por 24-48 horas. Colônias típicas de *S. aureus* foram coletadas e, para fins de identificação, foram submetidas a coloração de Gram e as provas bioquímicas da coagulase, Dnase, catalase e oxidação e fermentação do manitol (FDA,1992). As amostras positivas para *S. aureus* foram armazenadas para avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos e tipagem molecular.

### **3.13. Isolamento de *Staphylococcus aureus* em Manipuladores de Alimentos**

Amostras da nasofaringe de 51 manipuladores do setor de laticínios foram coletadas com suabe estéril e plaqueadas em ágar Baird-Parker, sendo então incubadas por 24-48 horas a 37°C. Para fins de identificação, as colônias típicas foram submetidas a coloração de Gram e as provas bioquímicas da coagulase, Dnase, catalase, e oxidação e fermentação do manitol (FDA, 1992).

### **3.14. Isolamento de *Staphylococcus aureus* em equipamentos de Produção**

Foram coletadas 145 amostras de diferentes locais (mesas aço inoxidável, formas de queijo, tanques de queijo, cortadeira, aventais de uso comum, entre outros) da área de produção do Laticínio em estudo. As amostras foram coletadas passando suabe estéril umidecido (5mL de água peptonada 0,1% suplementada com 0,5% de tiosulfato de sódio) na superfície (100cm<sup>2</sup>) de equipamentos e utensílios em três direções diferentes. Placas contendo ágar Baird-Parker foram semeadas com os suabes e então incubadas a 37°C por 24-48 horas. As colônias típicas foram submetidas aos mesmos testes bioquímicos de identificação citados no item anterior (3.13.).

### **3.15. Isolamento de *Staphylococcus aureus* em Produto Final do Laticínio**

Durante o processo de implantação do Sistema APPCC (maio de 1997 a novembro de 1999), toda amostra de *Staphylococcus* coagulase positiva, isolado pelo laboratório de microbiologia da Cooperativa Piá, foi submetida a demais provas bioquímicas para identificação. Todas bateladas produzidas de queijo quark, queijo lanche, queijo minas frescal, manteiga, creme de leite e dos leites pasteurizados suspeitos de falha de processamento foram analisadas, perfazendo mais de 3200

amostras.

### **3.16. Armazenamento das Amostras de *Staphylococcus aureus***

As amostras identificadas como *S. aureus* foram numeradas e identificadas quanto a procedência, sendo então armazenadas em geladeira em ágar triptona de soja (TSA) inclinado. Paralelamente 0,5mL de cultura em caldo cérebro coração (BHI) foram adicionados a 0,5mL de glicerol estéril em frascos Eppendorf, sendo então colocados em freezer a - 15°C.

### **3.17. Susceptibilidade a Antimicrobianos**

Amostras de *S. aureus* provenientes de operadores, leite cru dos caminhões de coleta e produto final do Laticínio foram analisadas quanto a susceptibilidade a antimicrobianos. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Hospital de Clínicas, segundo metodologia descrita pelo “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (2000). As drogas testadas foram: penicilina, eritromicina, oxacilina, cefalotina, clindamicina, gentamicina sulfametoxazol/trimetoprim e vancomicina.

### **3.18. Diferenciação de Linhagens de *Staphylococcus aureus* Segundo Perfil de Susceptibilidade a Antimicrobianos**

Com base no perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, determinaram-se códigos numéricos para cada *S. aureus* testado conforme metodologia descrita por KLUYTMANS et al. (1995) com algumas modificações. A resistência foi classificada como 1, a resistência intermediária foi classificada como 2, enquanto a susceptibilidade foi classificada como 3. Os microrganismos foram agrupados

conforme semelhança desses perfis a fim de diferenciar as linhagens.

### **3.19. Diferenciação de Linhagens de *Staphylococcus aureus* por Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE)**

Amostras de *S. aureus* provenientes de operadores, leite cru dos caminhões de coleta e produto final do Laticínio foram analisadas por Eletroforese de Campo Pulsado (Pulsed-Field Gel Electrophoresis-PFGE). A metodologia de extração de DNA e digestão com endonuclease de restrição foi adaptada de SENNA et al. (1996) e está descrita a seguir:

A partir de estoque refrigerado, semeou-se cada amostra de *S. aureus* em 5mL de caldo cérebro-coração (BHI) estéril o qual foi incubado a 37°C por 18 horas. Dessa cultura, aproximadamente  $10^7$  células (5mL de cultura DO 580nm=0,5) foram centrifugadas 3 vezes, por 5 minutos a 10.000g, em solução TE. As células foram ressuspendidas em 250µL de solução de lise e adicionadas de 26µL de solução de lisozima (110mg/mL) e 13µL de solução de lisoestafina 1000U/mL, sendo então misturadas com 375µL de agarose de baixo ponto de fusão a 2,5% a 45°C. A suspensão foi distribuída em moldes plásticos para elaboração de cubos de agarose. Os moldes plásticos foram colocados em refrigerador por 5 minutos e os cubos de agarose transferidos para placas de Petri (60mm) contendo 6mL de solução de lise onde permaneceram por 2 horas a 37°C. Após incubação, os cubos de agarose foram lavados com solução TE por 5 minutos, sob leve agitação. A solução TE foi desprezada, sendo então adicionados 6mL de solução EDTA 0,5M na qual os cubos de agarose foram incubados por 1 hora. Após incubação, 3mL da mesma solução foram retirados e antes de incubação por 24 horas a 55°C, 3mL de solução de Proteinase K foram adicionados. No dia seguinte, as placas com os cubos de agarose foram colocados em geladeira por 5

minutos, sendo logo após lavados 3 vezes com TE por 10 minutos. A cada placa, 120µL de solução de PMSF e 3mL de TE foram adicionados, sendo as mesmas incubadas por 2 horas a 55°C. Após resfriar as placas, os cubos de agarose foram estocados em solução EDTA 0,2M até digestão enzimática. Na manhã seguinte, os cubos de agarose foram lavados 3 vezes, por 10 minutos, em solução TE. A clivagem dos DNAs contidos nos cubos de agarose foi realizada utilizando-se 20 unidades de enzima *Sma* I à temperatura de 28°C por 3 horas. Após incubação, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 600µL de solução EDTA 0,5M. Os cubos de agarose foram resolvidos em gel de agarose 1,2%. As corridas eletroforéticas foram realizadas em aparelho CHEF-DR II (Bio-Rad, NY, USA), contendo tampão TBE 0,5X, sob as seguintes condições: impulso inicial de 5 segundos, impulso final de 60 segundos, tempo de corrida de 22 horas, 200 volts à temperatura de 12°C.

Após migração, o gel foi fotografado por câmara Kodak Digital Science DC-40 e o perfil de bandas comparado em Molecular Analyst Finger Printing (Bio-Rad) através do coeficiente de correlação DICE e método de agrupamento UPGMA (Bio-Rad). A interpretação dos perfis de bandas foi realizada conforme metodologia descrita por TENOVER et al. (1995). Perfis os quais apresentaram até três bandas diferentes (até 80% de similaridade) foram considerados similares. Perfis de bandas com diferença de 4 até 6 bandas de diferença foram considerados provavelmente relacionadas (79 até 60% de similaridade) e perfis com mais de sete bandas diferentes foram considerados linhagens não relacionadas (menos de 60% de similaridade).

### **3.20. Determinação Numérica do Índice de Discriminação (D)**

A capacidade de discriminação das tipagens por susceptibilidade a antimicrobianos e por PFGE foi avaliada pela determinação numérica do Índice de

Discriminação (D) segundo método descrito por HUNTER e GASTON (1988). Esse índice indica a probabilidade de duas amostras, selecionadas aleatoriamente na população analisada, serem realmente distintas. A seguinte fórmula foi utilizada para o cálculo do valor D:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{n=1}^s n_j(n_j-1)$$

Onde:

s = número total de linhagens diferentes

n<sub>j</sub> = número de isolados de cada linhagem

N = número total de isolados dentro da população

### 3.21. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com a acessoria do Departamento de Estatística da UFRGS e estão representadas no anexo 1. O tamanho das amostragens foi calculado segundo o método descrito por COSTA NETO (1997) com nível de significância ( $\alpha$ ) mínima de 95%. Por motivos de padronização todas as amostragens tiveram seus números mínimos de amostras aumentados. As médias de UFC/mL tomadas de leite cru à temperatura ambiente e temperatura de refrigeração foram comparadas pelo Teste de Hipóteses para diferença entre duas médias conforme o método de Aspin-Welch (COSTA NETO, 1997) e confirmado pelo MATLAB (versão 5.3).

### 3.22. Determinação de Perigos e Pontos Críticos de Controle (PCC) e Verificação da Eficiência do Sistema APPCC

As investigações das Boas Práticas de Fabricação (BPF), assim como a identificação de perigos e pontos críticos de controle (PCC) foram realizadas utilizando

os resultados das análises bioquímicas, microbiológicas e genotípicas. Durante a implantação do APPCC, as análises dos resultados obtidos foram discutidas em reuniões quinzenais envolvendo responsáveis por diferentes setores do Laticínio e coordenadas pelos executores desse trabalho. Ao todo, 17 pessoas participavam das reuniões, as quais foram encarregadas da implantação completa do sistema APPCC no Laticínio. Nessas reuniões, foram determinados os métodos de monitoramento e as planilhas de registro para cada um dos PCCs identificados.

Para a verificação da eficiência do Sistema APPCC, escolheu-se a avaliação da contaminação microbiológica do produto final.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Contaminação de Leite Cru por Mesófilos Totais

As contagens de microrganismos mesófilos totais em 100 amostras de leite cru apresentaram quantidades variando de  $1,60 \times 10^5$  (amostras 28 e 38) até  $4,54 \times 10^7$  UFC/mL (amostra 85 – FIGURA 1) com média aritmética de  $9,89 \times 10^6$  UFC/mL e desvio padrão de  $7,74 \times 10^6$  UFC/mL.

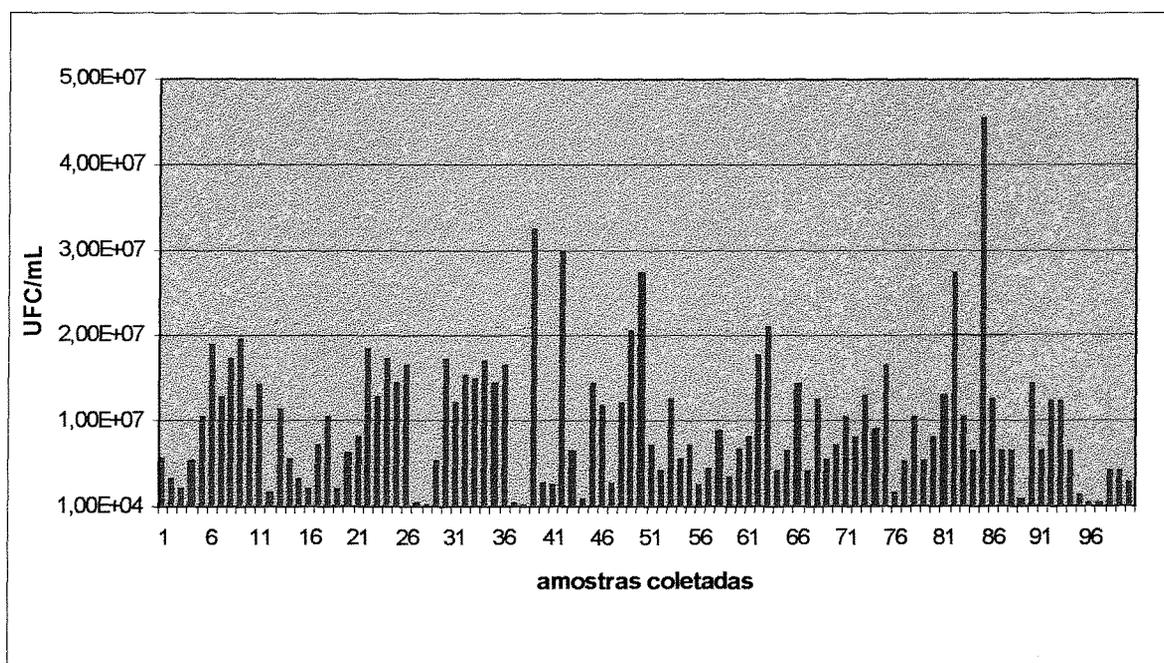


FIGURA 1. Contaminação por microrganismos mesófilos totais no leite cru.

Nenhuma das amostras analisadas demonstrou contagens inferiores a  $10^4$  UFC/mL (qualidade do leite tipo A no Brasil), enquanto que apenas 4 % delas (amostras 27, 28, 37 e 38) apresentaram contagens abaixo de  $5,0 \times 10^5$  UFC/mL (qualidade do leite tipo B).

Níveis de contaminação entre  $1,0 \times 10^5$  e  $9,9 \times 10^5$  UFC/mL só foram verificados em 6% das coletas (amostras 27, 28, 37, 38, 96 e 97). As demais amostras (94%)

mostraram estar contaminadas por mais de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL, sendo que 45% delas continham níveis de contaminação superiores a  $1 \times 10^7$  UFC/mL (amostras 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 18, 22, 23, 24, 25, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 39, 42, 45, 46, 48, 49, 50, 53, 62, 63, 66, 68, 71, 73, 75, 78, 81, 82, 83, 85, 86, 90, 92 e 93). Tais contagens elevadas foram verificadas ao longo de todos os meses de amostragem (abril a dezembro de 1998).

Apesar das contagens mais baixas (amostras 28 e 38 ambas com  $1,60 \times 10^5$  UFC/mL e amostras 28 e 38 com  $2,1 \times 10^5$  UFC/mL), terem sido amostradas nos meses mais frios de inverno (junho e julho), nos mesmos meses também foram coletadas três (amostras 39 com  $3,20 \times 10^7$ , amostra 42 com  $3,0 \times 10^7$  e amostra 50 com  $2,74 \times 10^7$ ) das cinco amostras com maiores contagens de mesófilos totais verificados nesse trabalho.

#### **4.2. Contaminação por Coliformes Totais e Presença de *Escherichia coli* no**

##### **Leite Cru**

A presença de coliformes totais foi verificada nas 100 amostras de leite cru analisadas, sendo que as quantidades oscilaram de  $1,0 \times 10^3$  (amostra 77) a  $3,69 \times 10^6$  UFC/mL (amostra 85 – FIGURA 2) com média aritmética de  $6,41 \times 10^5$  UFC/mL e desvio padrão de  $5,57 \times 10^5$  UFC/mL.

Apenas 10% das amostras apresentaram contaminação por coliformes totais abaixo de  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL (amostras 6, 14, 19, 20, 45, 66, 67, 76, 77 e 100), enquanto 16% (amostras 2, 10, 15, 17, 22, 24, 25, 53, 56, 59, 68, 70, 79, 83, 85 e 98) das mesmas demonstraram níveis desses microrganismos acima de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL. As demais amostras (74%) mostraram-se contaminadas por quantidades de coliformes totais entre  $1,0 \times 10^5$  e  $9,9 \times 10^5$  UFC/mL. Tal oscilação nas contagens foi demonstrada tanto em amostras coletadas nos meses frios quanto nos meses quentes. Ainda nesse sentido, a

contagem mais baixa de coliformes totais foi demonstrada pela amostra 77 ( $1,0 \times 10^3$  UFC/mL), enquanto a mais alta foi evidenciada pela amostra 85 ( $3,69 \times 10^6$  UFC/mL), ambas coletadas nos meses de outubro e novembro de 1998, respectivamente (meses considerados mais quentes).

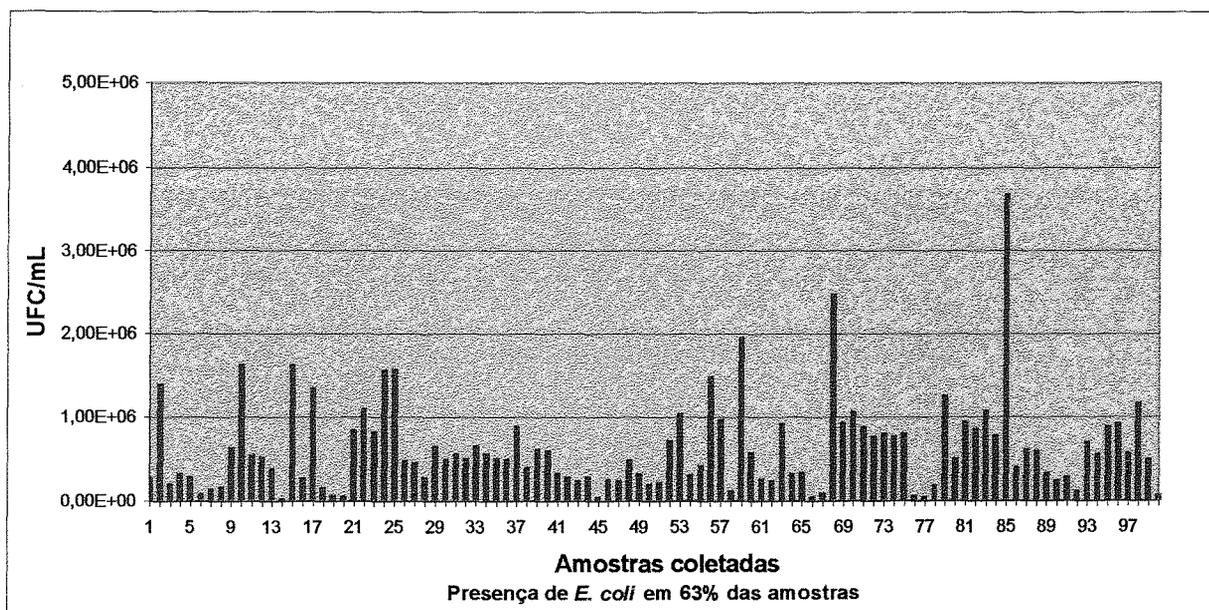


FIGURA 2. Contaminação por coliformes totais e *Escherichia coli* no leite cru.

Fato interessante a ser ressaltado é que se forem analisados apenas as médias das contagens microbiológicas do leite cru, pode-se observar que os coliformes compuseram menos de 10% da flora contaminante do leite (média de mesófilos totais  $9,89 \times 10^6$  UFC/mL, enquanto  $6,41 \times 10^5$  UFC/mL foi a média de coliformes totais no leite amostrado).

Apesar de 100% das amostras terem apresentado contaminação por coliformes totais, a presença de *E. coli* foi verificada em 63% das amostras.

### 4.3. Contaminação por Microrganismos Mesófilos Totais no Leite Cru Resfriado

Segundo as análises realizadas, os leites resfriados em nível de propriedade demonstraram contagens de mesófilos totais que oscilaram de  $9,4 \times 10^4$  (amostra 11) a  $2,58 \times 10^7$  UFC/mL (amostra 21 – FIGURA 3) com média aritmética de  $4,78 \times 10^6$  UFC/mL e desvio padrão de  $5,12 \times 10^6$  UFC/mL.

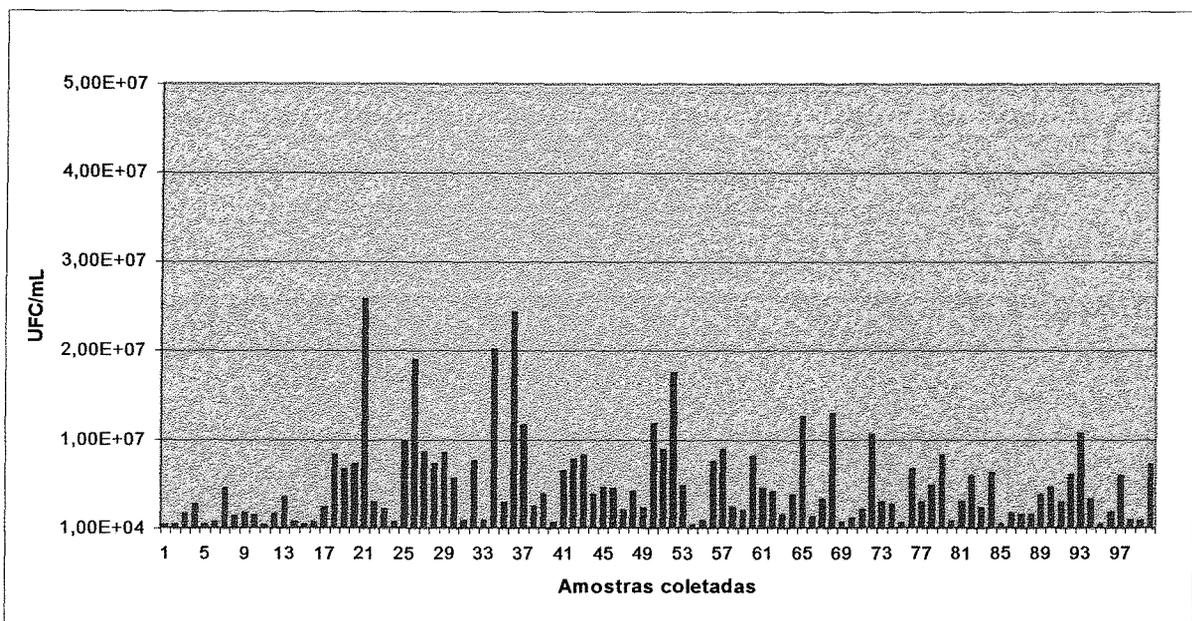


FIGURA 3. Contaminação por microrganismos mesófilos totais no leite cru resfriado.

Com base nas análises estatísticas (Método de Aspin-Welch) houve diferença significativa (confiança de 95%) entre as médias aritméticas da contaminação de mesófilos totais em leite cru resfriado e não resfriado (ANEXO 1).

Contudo, assim como no leite cru não resfriado, nenhuma das contagens microbianas do leite cru resfriado apresentou contaminação inferior a  $10^4$  UFC/mL. Dentre

as amostras do leite cru resfriado, 8% (1, 2, 5, 11, 15, 54, 85 e 95) apresentaram contagens inferiores a  $5,0 \times 10^5$  UFC/mL, enquanto no leite cru não resfriado elas foram apenas 4%.

A análise dos resultados revelou que apenas a amostra 11 apresentou contagem inferior a  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL, enquanto que 21% (1, 2, 5, 6, 8, 14, 15, 24, 31, 33, 40, 54, 55, 69, 70, 75, 80, 85, 95, 98 e 99) delas apresentaram contagens de mesófilos totais entre  $1,0 \times 10^5$  e  $9,9 \times 10^5$  UFC/mL. As demais amostras (79%) apresentaram contagens superiores a  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL, sendo que 11 das mesmas (21, 26, 34, 36, 37, 50, 52, 65, 68, 72 e 93) continham mais de  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL.

Assim como no leite cru não resfriado, os resultados das contagens microbianas no leite cru resfriado demonstraram ampla variação na quantidade de microrganismos ao longo de todo o período amostral, mesmo havendo variação de temperatura climática.

Com o intuito de investigar a origem da contaminação do leite cru, no presente trabalho, contagens microbianas foram realizadas em diferentes etapas da coleta do leite cru em seis propriedades rurais (produtores de leite) e estão demonstradas na TABELA 1.

TABELA 1. Contagens de mesófilos e psicrotróficos totais em leite cru antes da utilização de ordenhadeira, após utilização de ordenhadeira e dentro de resfriador em propriedades rurais.

Produtor	Controle*	Mesófilos totais (UFC/mL)			Psicrotróficos totais (UFC/mL)		
		Leite antes de ordenhadeira	Leite após ordenhadeira	Leite dentro de resfriador	Leite antes de ordenhadeira	Leite após ordenhadeira	Leite dentro de resfriador
1	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$>1,0 \times 10^{5a}$	$1,9 \times 10^5$	<1	ND	$2,6 \times 10^5$
2	$1,9 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	$>1,0 \times 10^{5a}$	$1,1 \times 10^6$	<1	$1,9 \times 10^3$	$6,4 \times 10^5$
3	$1,2 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	$>1,0 \times 10^{5a}$	$4,2 \times 10^5$	<1	$4,7 \times 10^2$	$3,4 \times 10^5$
4	$2,2 \times 10^3$	$5,5 \times 10^3$	$>1,0 \times 10^{5a}$	$5,6 \times 10^5$	<1	$2,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^5$
5	$3,4 \times 10^3$	$6,9 \times 10^3$	$>1,0 \times 10^{5a}$	$3,3 \times 10^5$	<1	$6,1 \times 10^1$	$1,2 \times 10^4$
6	$1,2 \times 10^3$	$9,6 \times 10^3$	$7,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^5$	<1	$5,6 \times 10^1$	$3,7 \times 10^5$

Controle\*: leite cru analisado após 12 horas de refrigeração para avaliar influência de crescimento de microrganismos do leite e não daqueles provenientes de ordenhadeira ou resfriadores. <sup>a</sup>: contagens superiores a 1000 UFC ou incontáveis na diluição  $10^{-2}$ . ND: não determinado.

Nessa tabela pode-se notar que, antes da utilização de ordenhadeiras, o leite apresentou contagens inferiores a  $10^4$  UFC/mL, sendo então substancialmente contaminado depois da sua passagem pelas ordenhadeiras e resfriadores. Tal incremento pode ser acompanhado tanto para microrganismos mesófilos totais como para psicrotróficos totais nos seis produtores investigados.

#### **4.4. Contaminação por Coliformes Totais e Presença de *Escherichia coli* em Leite Cru Resfriado**

As amostras analisadas de leite cru resfriado também apresentaram contaminação elevada por coliformes totais, variando de  $<1$ UFC/mL (amostras 71 e 80) até  $4,68 \times 10^6$  UFC/mL (amostra 21 – FIGURA 4) e média aritmética de  $5,54 \times 10^5$  UFC/mL com desvio padrão de  $8,78 \times 10^5$  UFC/mL.

A média aritmética das contagens de coliformes totais no leite cru resfriado não apresentou diferença estatística significativa (Método de Aspin-Welch) quando comparada a média de coliformes totais do leite cru não resfriado (ANEXO 1).

As análises realizadas mostraram que 47% das amostras de leite cru resfriado apresentaram contagens de coliformes totais abaixo de  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL (amostras 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 23, 24, 31, 33, 38, 39, 40, 41, 46, 47, 48, 49, 54, 55, 59, 61, 63, 66, 70, 71, 73, 75, 79, 80, 81, 83, 85, 86, 88, 90, 91, 95, 98 e 99). Enquanto, 19% do total de amostras (amostras 13, 20, 21, 25, 26, 27, 34, 37, 42, 45, 50, 56, 57, 64, 65, 72, 76, 82 e 93) apresentaram níveis de contaminação superiores a  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL. Os demais 34% das amostras (amostras 2, 6, 16, 18, 19, 22, 28, 29, 30, 32, 35, 36, 43, 44, 51, 52, 53, 8, 60, 62, 67, 68, 69, 74, 77, 78, 84, 87, 89, 92, 94, 96, 97 e 100) demonstraram níveis de contaminação que oscilaram de  $1,0 \times 10^5$  a  $9,9 \times 10^5$  UFC/mL.

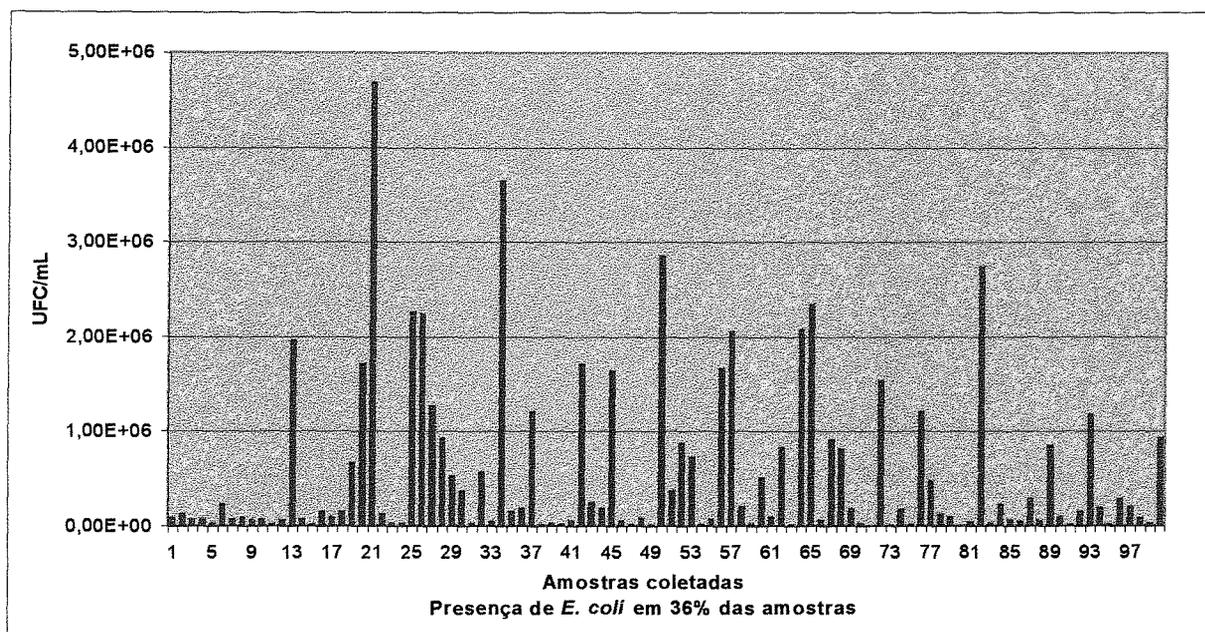


FIGURA 4. Contaminação por coliformes totais e *Escherichia coli* no leite cru resfriado.

Assim como as demais análises microbiológicas já apresentadas nesse trabalho, as contagens de coliformes totais no leite cru resfriado também demonstraram alta variabilidade nas quantidades desses microrganismos em amostras coletadas durante todos os meses (quentes ou frios) do plano de amostragem.

Entre as 100 amostras analisadas, 98% delas apresentaram contaminação por coliformes totais, sendo que a presença de *E. coli* no leite cru resfriado foi evidenciada em 36% das amostras.

#### 4.5. Contaminação por Microrganismos Psicotróficos Totais no Leite Cru Resfriado

As análises realizadas em leite cru resfriado também demonstraram elevada contaminação por microrganismos psicotróficos totais. Os valores das contagens variaram

do não detectado (amostras 8, 9, 15 e 31) até  $1,78 \times 10^7$  UFC/mL (amostra 34 – FIGURA 5), sendo a média das contagens de  $2,38 \times 10^6$  UFC/mL e desvio padrão de  $3,39 \times 10^6$  UFC/mL.

Comparando as médias das contagens de mesófilos totais ( $9,89 \times 10^6$  UFC/mL) e psicrotróficos totais ( $2,38 \times 10^6$  UFC/mL) encontradas no leite cru amostrado, pode-se verificar que cerca de 24% da contaminação microbiana total do leite apresentou comportamento de psicrotróficos.

As maiores contagens de microrganismos psicrotróficos no leite cru resfriado (amostras 25, 26, 29, 34, 36, 37, 42, 50 e 52) foram verificadas justamente nos meses mais frios de coleta (maio a agosto).

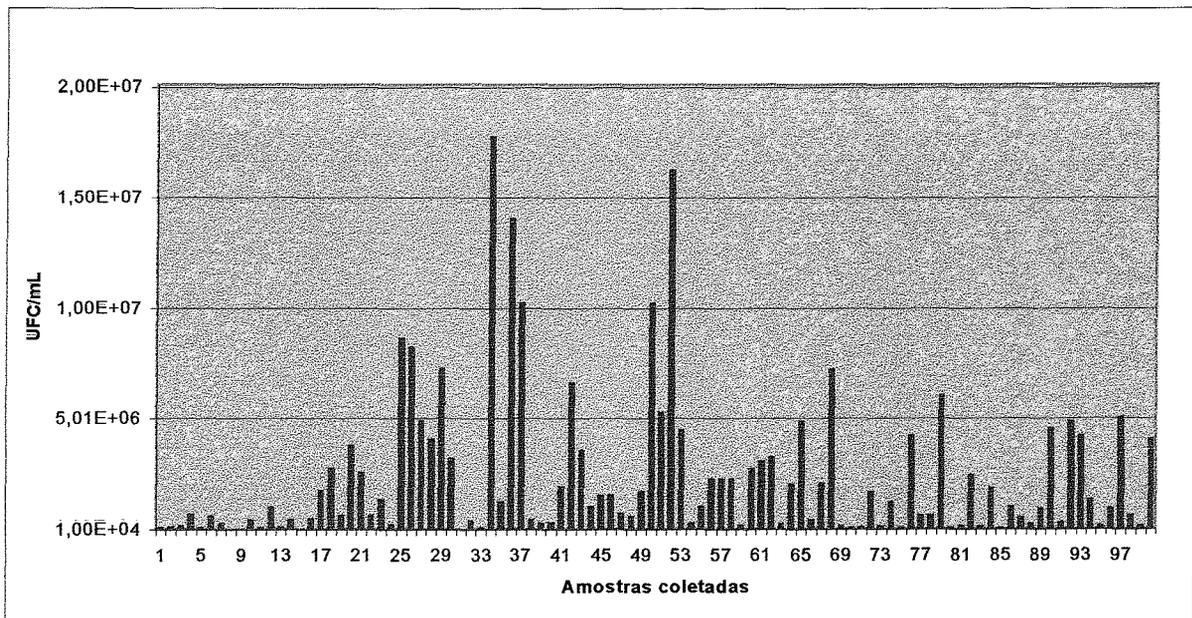


FIGURA 5. Contaminação por microrganismos psicrotróficos totais no leite cru resfriado.

Na mesma figura, também pode-se verificar que 14% das amostras (1, 2, 5, 8, 9, 11, 13, 15, 31, 33, 70, 75, 80 e 85) apresentaram menos que  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL, enquanto 51%

(amostras 12, 17, 18, 20, 21, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 34, 35, 36, 37, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 49, 50, 51, 52, 53, 55, 56, 57, 58, 60, 61, 62, 64, 65, 67, 68, 72, 74, 76, 79, 82, 84, 86, 90, 92, 93, 94, 97 e 100) delas demonstraram níveis de contaminação superiores a  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL. As demais amostras (3, 4, 6, 7, 10, 14, 16, 19, 22, 24, 32, 38, 39, 40, 47, 48, 54, 59, 63, 66, 69, 71, 73, 77, 78, 81, 83, 87, 88, 89, 91, 95, 96, 98 e 99) compuseram 35% do total analisado, apresentando contaminação entre  $1,0 \times 10^5$  e  $9,9 \times 10^5$  UFC/mL de psicrotróficos totais.

#### 4.6. Contaminação do Leite Cru por *Staphylococcus aureus*

O leite cru recebido pelo Laticínio em estudo demonstrou estar significativamente contaminado por *S. aureus* (FIGURA 6).

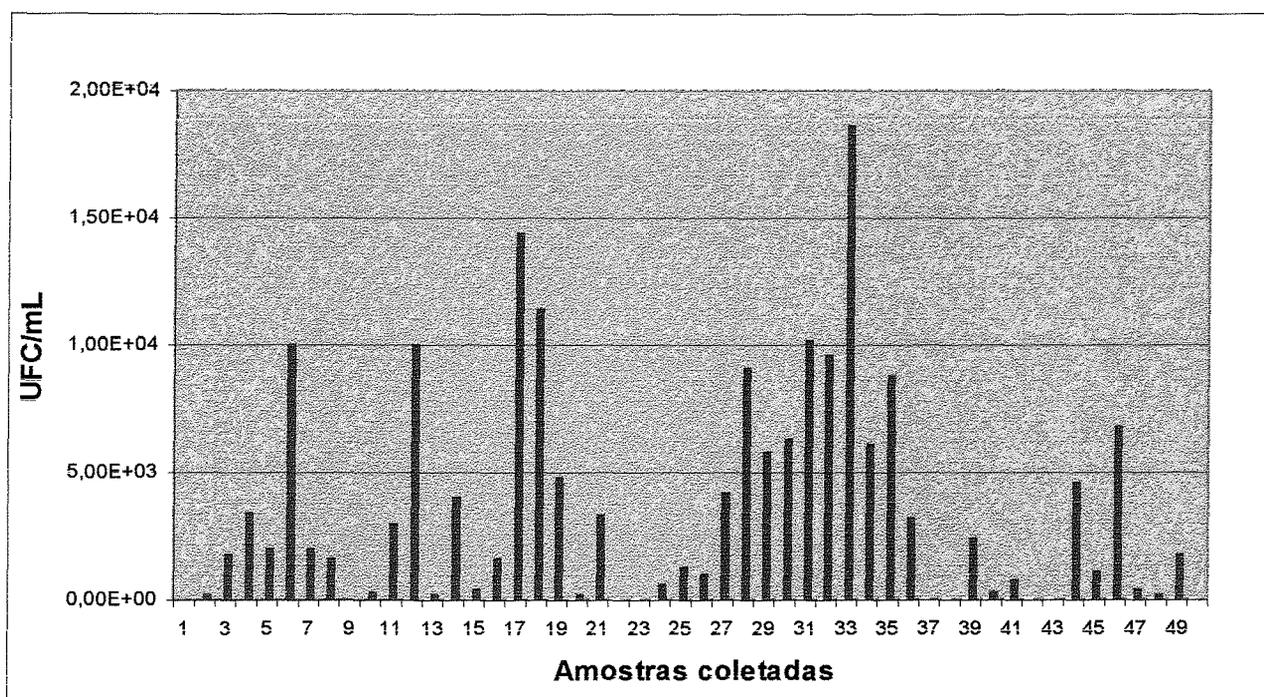


FIGURA 6. Contaminação por *Staphylococcus aureus* no leite cru.

Nas 50 amostras coletadas, 82% (41 amostras) apresentaram contaminação por esse microrganismo (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 39, 40, 41, 44, 45, 46, 47, 48 e 49). As análises realizadas mostraram quantidades de *S. aureus* variando de 0 (amostras 1, 9, 22, 23, 37, 38, 42, 43 e 50) até  $1,86 \times 10^4$  UFC/mL (amostra 33) com média aritmética de  $3,56 \times 10^3$  UFC/mL e desvio padrão de  $4,32 \times 10^3$  UFC/mL.

#### **4.7. Avaliação da Multiplicação de Mesófilos Totais, Psicrotróficos Totais e *Staphylococcus aureus* no Leite Cru Resfriado e à Temperatura Ambiente**

As curvas de crescimento de microrganismos mesófilos totais, psicrotróficos totais e *S. aureus* cultivados em leite cru sob temperatura considerada ambiente (22°C) e refrigeração (7°C) estão representadas, respectivamente, nas figuras 7, 8 e 9.

##### **4.7.1) Crescimento de microrganismos mesófilos totais no leite cru**

Os microrganismos mesófilos totais cultivados em leite cru à temperatura de 22°C demonstraram crescimento vigoroso após fase de adaptação (lag) de aproximadamente duas horas. A fase exponencial, onde a população bacteriana atingiu mais de  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL, ocorreu dentro do período das duas horas até 10 horas de incubação (FIGURA 7), sendo então seguida por fase estacionária que se estendeu até o final do experimento (24 horas de incubação). Ainda na fase exponencial de crescimento, a quantidade de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL foi atingida em aproximadamente 6 horas.

A contaminação microbiana inicial do leite cru analisado foi de  $4,83 \times 10^3$  UFC/mL, a qual atingiu quantidades máximas microbianas de  $3,80 \times 10^8$  UFC/mL em 24 horas de incubação.

A FIGURA 7 demonstra que o mesmo leite, ao ser refrigerado a  $7^\circ\text{C}$ , apresentou pequeno incremento (de  $3,1 \times 10^4$  UFC/mL para  $4,83 \times 10^4$  UFC/mL em 24 horas de incubação) na contagem total de microrganismos mesófilos, permanecendo com níveis de contaminação praticamente estáveis até 24 horas depois da ordenha.

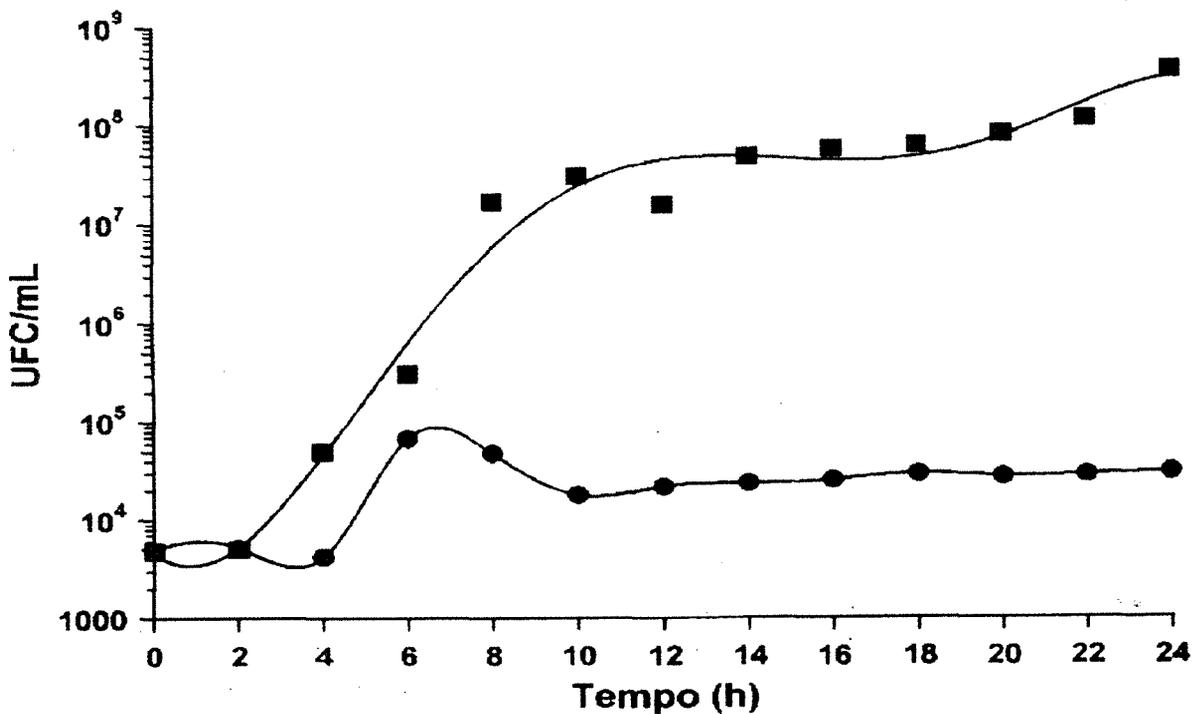


FIGURA 7. Crescimento de microrganismos mesófilos totais em leite cru à temperatura ambiente (■  $22^\circ\text{C}$ ) e temperatura de refrigeração (●  $7^\circ\text{C}$ ).

#### 4.7.2) Crescimento de microrganismos psicrotróficos totais no leite cru

Os microrganismos psicrotróficos totais demonstraram fase de adaptação (lag) de aproximadamente 5 horas quando foram cultivados em leite cru à temperatura de 22°C. A contaminação inicial de psicrotróficos totais foi  $1,60 \times 10^5$  UFC/mL, a qual, após fase de adaptação, cresceu exponencialmente até atingir contagens de  $8,10 \times 10^8$  UFC/mL em 24 horas de cultivo (FIGURA 8).

A contagem de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL foi atingida em aproximadamente 6 horas de cultivo a 22°C, sendo que a 7°C, a população de psicrotróficos necessitou de 24 horas para superar a mesma quantidade microbiana ( $1,30 \times 10^6$  UFC/mL em 24 horas de cultivo).

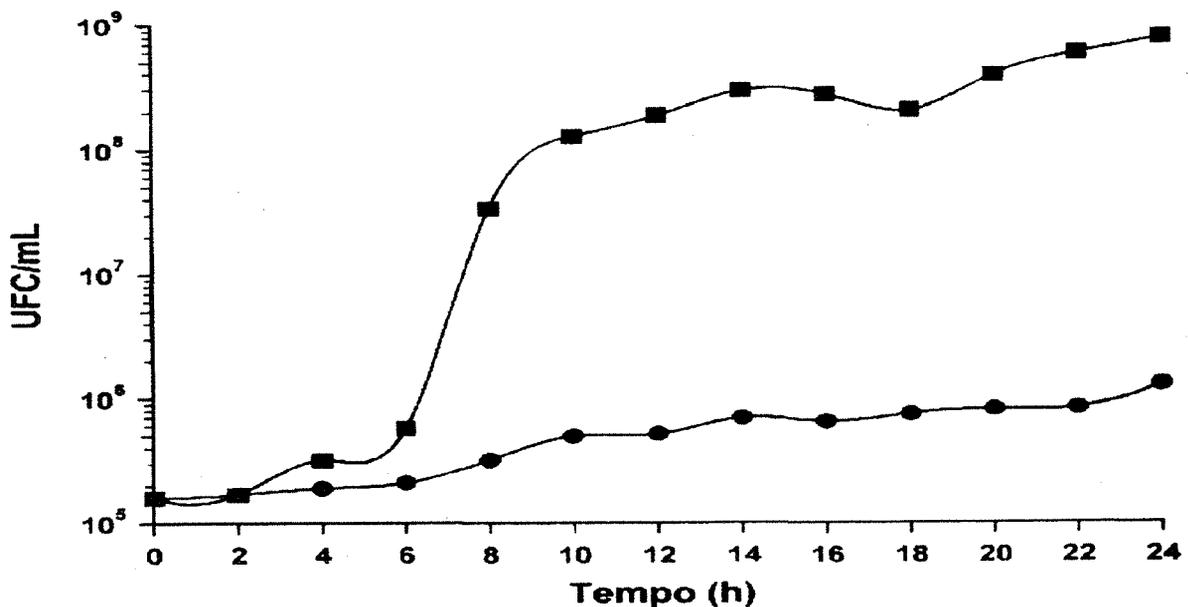


FIGURA 8. Crescimento de microrganismos psicrotróficos totais no leite cru à temperatura ambiente (■ 22°C) e temperatura de refrigeração (● 7°C).

A fase estacionária da população foi atingida em cerca de 9 horas, estendendo-se até o final do experimento.

Quando o leite cru foi mantido resfriado a 7°C, a curva de crescimento dos microrganismos psicrotróficos demonstrou visível inibição se comparada a incubação à temperatura ambiente (22°C). Mesmo assim, as contagens de microrganismos psicrotróficos apresentaram pequeno aumento do número celular (inicial de  $1,60 \times 10^5$  UFC/mL e final de  $1,30 \times 10^6$  UFC/mL) depois de 24 horas.

#### 4.7.3) Crescimento de *Staphylococcus aureus* no leite cru

A quantidade inicial de *S. aureus* verificada no leite cru analisado foi de  $7,0 \times 10^2$  UFC/mL, sendo que o seu desenvolvimento à temperatura ambiente (22°C) ocorreu sem fase de adaptação (fase lag), atingindo níveis máximos de  $1,2 \times 10^5$  UFC/mL após 18 horas de crescimento (FIGURA 9).

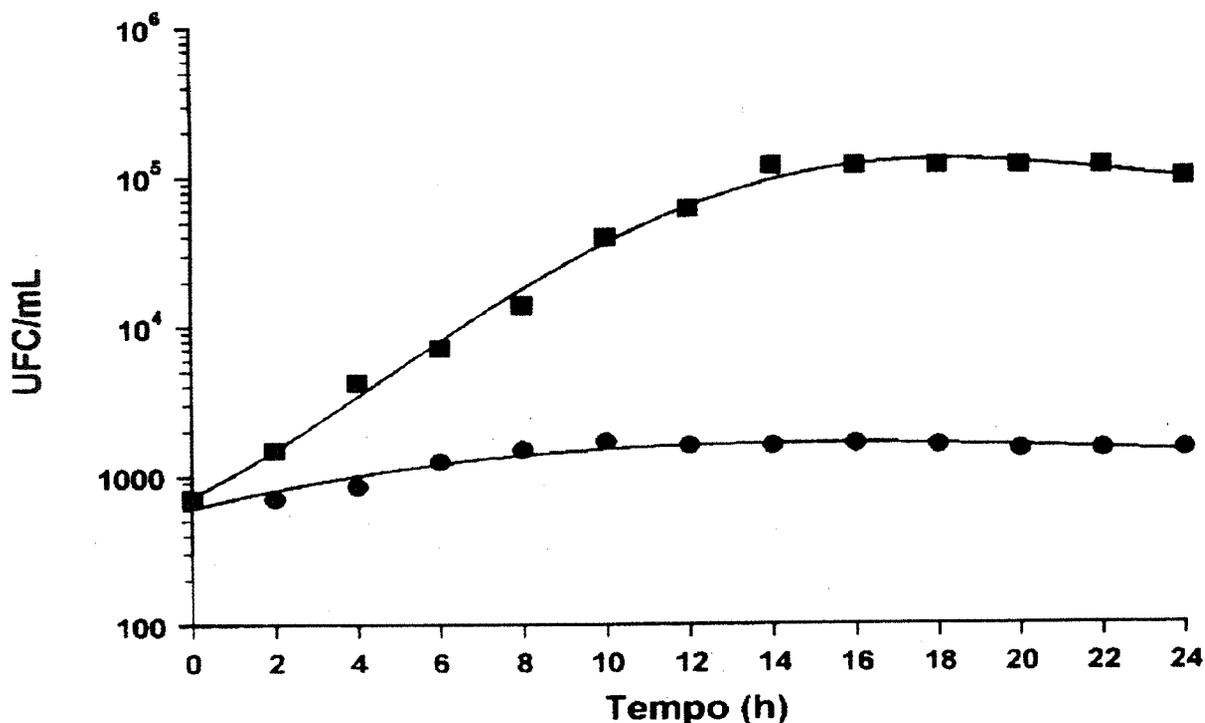


FIGURA 9. Crescimento de *Staphylococcus aureus* em leite cru à temperatura ambiente (■ 22°C) e temperatura de refrigeração (● 7°C).

No presente experimento, a fase exponencial de crescimento demonstrou duração de aproximadamente 14 horas, nas quais o número de  $10^5$  UFC/mL (quantidade celular necessária à produção de enterotoxina suficiente para causar intoxicação alimentar) foi atingido em cerca de 13 horas após a ordenha.

A quantidade de *S. aureus* no leite cru analisado permaneceu em média com  $10^5$  UFC/mL a partir de 13 horas de incubação até o final do experimento (24 horas de incubação), caracterizando assim a fase estacionária.

A FIGURA 9 demonstra que quando o leite cru foi incubado sob refrigeração ( $7^{\circ}\text{C}$ ), o número de *S. aureus* manteve-se praticamente inalterado (inicial de  $7,0 \times 10^2$  UFC/mL e final de  $1,5 \times 10^3$  UFC/mL) durante as 24 horas avaliadas.

#### **4.8. Verificação de Eficiência de Limpeza e Sanitização de Bancadas, Equipamentos e Utensílios**

Os níveis de contaminação de bancadas, equipamentos e utensílios após limpeza estão representados na FIGURA 10. Nessa figura, pode-se perceber que as contaminações residuais nas 50 superfícies testadas foram baixas, com exceção de equipamentos presentes na área de fabricação de creme de leite.

Os equipamentos utilizados na preparação de queijo (mesas de aço inoxidável - MQ e tanques queijo - TQ) apresentaram contagens variando de  $<0,1$  a  $4,17 \times 10^2$  UFC/100cm<sup>2</sup> com média de  $2,06 \times 10^2$  UFC/100cm<sup>2</sup>, enquanto os utensílios utilizados para o mesmo fim (forma do queijo - FQ e utensílios em geral da preparação do queijo - UQ) mostraram contaminação microbiana variando de  $<0,1$  a  $5,90 \times 10^2$  UFC/100cm<sup>2</sup>



#### 4.9. Verificação de Procedimentos de Limpeza de Superfícies Através da Produção de Luminescência

A eficiência de procedimentos de limpeza foi testada pela contagem em placas e verificada pela produção de luminescência (aparelho Hy-Lite<sup>R</sup> - Merck) de 12 amostras de superfícies analisadas em paralelo pelos dois métodos.

A FIGURA 11 mostra a correlação entre UFC/100cm<sup>2</sup> proveniente de cultivo em placas, e Unidades Relativas de Luz (URL) produzidas pelo aparelho Hy-lite<sup>R</sup> (Merck).

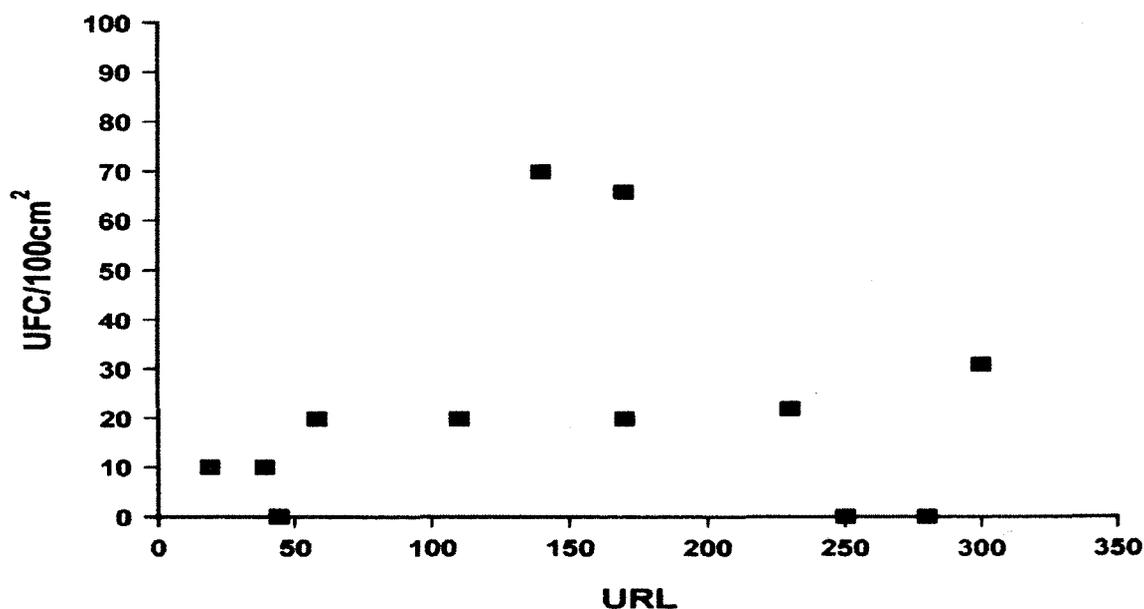


FIGURA 11. Contaminação proveniente de superfícies limpas analisadas pelo método de cultivo em placas (UFC/100cm<sup>2</sup>) e bioluminescência (URL) quantificada pelo aparelho Hy-lite<sup>R</sup> (Merck).

Pode-se notar que o valor máximo em URL (300 URL) foi resultante de uma amostra com 31 UFC/100cm<sup>2</sup>, enquanto o valor mínimo de URL (19 URL) foi encontrado em outra amostra a qual continha 10 UFC/100cm<sup>2</sup>. Por outro lado, o valor

máximo de 70 UFC/100cm<sup>2</sup> foi encontrado em uma amostra que apresentou apenas 140 URL.

O valor de 250 URL (estipulado pelos fabricantes do aparelho Hy-lite<sup>R</sup> como limite de aceitação para tanques de leite higienizados) foi alcançado por uma amostra e ultrapassado por mais duas (280 e 300 URL) amostras, as quais continham 0, 0 e 31 UFC/100cm<sup>2</sup>.

#### 4.10. Isolamento de *Staphylococcus aureus* em Leite Cru Proveniente de Caminhões de Transporte, Manipuladores e Ambiente de Produção

A presença do *S. aureus* foi verificada em 35,29% dos 51 manipuladores investigados. Dentre as amostras de leite cru provenientes de todos os 21 caminhões de transporte do Laticínio, 19 delas (90,48%) permitiram o isolamento desse mesmo microrganismo com quantidades que variaram da não detecção (diluição 10<sup>-1</sup>) até 1,8 x 10<sup>4</sup> UFC/mL (TABELA 2) com média de 3,56 x 10<sup>3</sup>UFC/mL.

TABELA 2. Presença e quantidade de *S. aureus* em manipuladores, leite cru em caminhões de transporte, ambiente de produção (utensílios e equipamentos) e produto final.

Origem (Nº de amostras)	Amostras Positivas para <i>S. aureus</i> (%)	Média (amplitude) (UFC/mL ou g)
Manipuladores (51)	19 (35,29)	ND
Leite cru (21)	19 (90,48)	3,56 x 10 <sup>3</sup> (< 10 até 1,0 x 10 <sup>4</sup> )
Ambiente de produção (145)	0	0
Produto final (>3200 <sup>a</sup> )	10 (< 0,31)	6,1 x 10 <sup>1</sup> (10 <sup>1</sup> até 9,0 x 10 <sup>1</sup> )

a: 2,5 anos de amostragens. ND: não determinado.

A presença de *S. aureus* não foi evidenciada nas 145 amostras coletadas a partir de superfícies de equipamentos ou utensílios utilizados na produção (TABELA 2).

#### 4.11. Isolamento de *Staphylococcus aureus* em Produto Final

Depois de dois anos e seis meses de amostragens, período no qual foram realizadas mais de 3200 análises, apenas 10 amostras de produto final apresentaram contaminação por *S. aureus* com quantidades variando entre  $10^1$  até  $9,0 \times 10^1$  UFC/mL ou grama e média de  $6,1 \times 10^1$  UFC/mL ou grama (TABELA 2).

#### 4.12. Susceptibilidade a Antimicrobianos

Os resultados da susceptibilidade a antimicrobianos dos *S. aureus* isolados neste trabalho podem ser visualizados na TABELA 3.

TABELA 3. Susceptibilidade a antibióticos de linhagens de *S. aureus* isolados em manipuladores, leite cru em caminhões de transporte e produto final.

Origem das amostras	Amostras positivas <i>S. aureus</i>	Resistência (%)							
		PN	ERI <sup>1</sup>	OXA	CEF	CLI <sup>1</sup>	GEN	SUT	VAN
Manipuladores	19	94,44	63,13	0	0	15,78	0	0	0
Leite cru (caminhões)	19	47,30	63,13	0	0	21	0	0	0
Produto final	10	50	50	0	0	20	0	0	0

PN: penicilina; ERI<sup>1</sup>: eritromicina (resistência intermediária) OXA: oxacilina; CEF: cefalotina; CLI<sup>1</sup>: clindamicina (resistência intermediária); GEN: gentamicina; SUT: sulfametaxazol/trimetoprim; VAN: vancomicina.

Dentre os *S. aureus* isolados de manipuladores, leite cru e produtos finais, 94,44%, 47,30% e 50% respectivamente foram resistentes à penicilina.

A resistência intermediária à eritromicina foi verificada em 63,13%, 63,13% e 50% dos isolados de manipuladores, isolados do leite cru e isolados de produtos finais, respectivamente.

Quanto à clindamicina, 15,78% dos isolados de manipuladores, 21% dos isolados do leite cru e 20% dos isolados de produtos finais foram intermediariamente resistentes a esse antibiótico.

Todos os isolados testados foram sensíveis à oxacilina, cefalotina, gentamicina, sulfametoxazol/trimetoprim e vancomicina.

#### **4.13. Diferenciação de Linhagens de *Staphylococcus aureus* Através de Perfil de Susceptibilidade a Antimicrobianos**

A análise dos resultados dos antibiogramas demonstrou a diferenciação de 7 perfis fenotípicos diferentes (A até G) (TABELA 4) e Índice de Discriminação (D) de 0,81 (ANEXO 1).

Dentre todas as amostras analisadas, 56,25% foram agrupadas nos perfis A e B.

Os *S. aureus* provenientes de operadores foram classificados em 4 perfis diferentes (A, B, C e D), sendo que entre os 19 operadores amostrados, 15 deles (78,94%) pertenciam aos mesmos perfis A e B.

Os isolados do leite cru (n=19) foram classificados em todos os 7 perfis, enquanto as 10 amostras de produtos finais foram diferenciadas em 5 perfis diferentes (A, B, C, D e E) (TABELA 4).

As amostras de produto final 197, 198, 199, 212, 213, 214 e 216 foram classificadas nos perfis A, B, C e D, assim como amostras provenientes de operadores e leite cru, não demonstrando correlação com apenas uma provável fonte de contaminação (manipuladores ou leite cru). As amostras 200, 201 e 215 foram agrupadas no perfil E, juntamente com mais duas amostras de leite cru (93 e 99).

Nenhuma amostra de produto final apresentou perfil igual a apenas um operador ou leite cru amostrado nesse trabalho.

TABELA 4. Perfis de susceptibilidade a antimicrobianos das amostras de *S. aureus* isoladas do Laticínio.

Nº da amostra e origem	Perfil de usceptibilidade a antimicrobianos	Perfil fenotípico
1 <sup>O</sup> , 9 <sup>O</sup> , 12 <sup>O</sup> , 20 <sup>O</sup> , 26 <sup>O</sup> , 27 <sup>O</sup> , 34 <sup>O</sup> , 36 <sup>O</sup> , 101 <sup>L</sup> , 107 <sup>L</sup> , 117 <sup>L</sup> , 118 <sup>L</sup> , 213 <sup>P</sup> , 214 <sup>P</sup> .	12333333	A
6 <sup>O</sup> , 17 <sup>O</sup> , 21 <sup>O</sup> , 23 <sup>O</sup> , 32 <sup>O</sup> , 48 <sup>O</sup> , 53 <sup>O</sup> , 94 <sup>L</sup> , 95 <sup>L</sup> , 110 <sup>L</sup> , 113 <sup>L</sup> , 197 <sup>P</sup> , 212 <sup>P</sup> .	13333333	B
24 <sup>O</sup> , 35 <sup>O</sup> , 50 <sup>O</sup> , 98 <sup>L</sup> , 198 <sup>P</sup> , 199 <sup>P</sup> .	12332333	C
15 <sup>O</sup> , 103 <sup>L</sup> , 105 <sup>L</sup> , 111 <sup>L</sup> , 114 <sup>L</sup> , 216 <sup>P</sup> .	32333333	D
93 <sup>L</sup> , 99 <sup>L</sup> , 200 <sup>P</sup> , 201 <sup>P</sup> , 215 <sup>P</sup> .	33333333	E
102 <sup>L</sup> , 109 <sup>L</sup> , 116 <sup>L</sup> .	32332333	F
115 <sup>L</sup> .	31332333	G

1: Resistente; 2: Intermediário; 3: Sensível; <sup>O</sup>: operadores; <sup>L</sup>: leite cru; <sup>P</sup>: produto final.  
Antibióticos testados: penicilina, eritromicina, oxacilina, cefalotina, clindamicina, gentamicina, sulfametoxazol-trimetoprim e vancomicina.

#### 4.14. Genotipagem de *Staphylococcus aureus* por Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE)

As análises dos DNAs cromossomais clivados com *Sma* I e resolvidos por PFGE demonstraram perfis contendo de seis (amostra 24) a 15 bandas (amostras 101 e 114), sendo que das 48 amostras examinadas 36 delas apresentaram 10 bandas ou mais com pesos moleculares variando de 60kb até 1018,5kb (FIGURA 12).

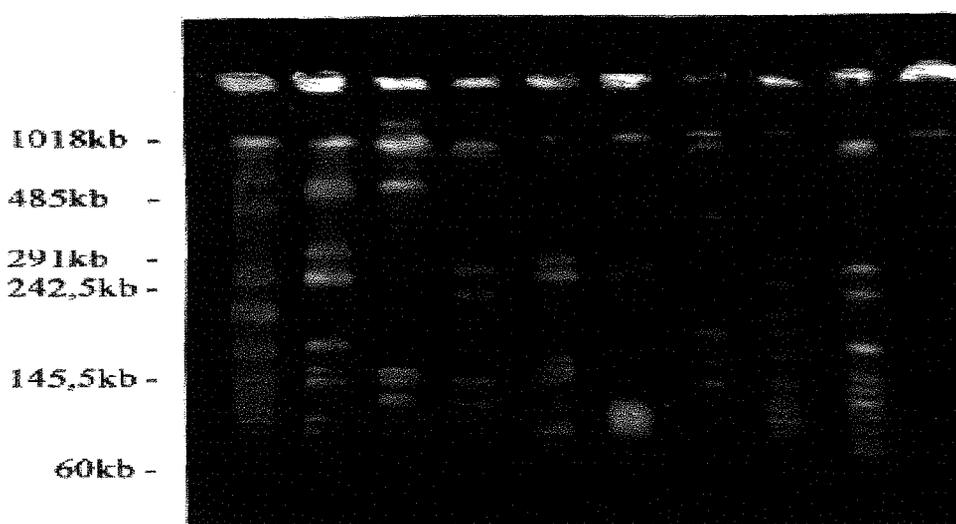


FIGURA 12. Exemplos de perfis de bandas de DNA cromossomal de *Staphylococcus aureus* clivados com *Sma* I isolados no Laticínio.

##### 4.14.1. Operadores

A FIGURA 13 mostra o dendograma de comparação dos perfis de bandas de DNAs cromossomais extraídos de *S. aureus* provenientes dos operadores do Laticínio em estudo.

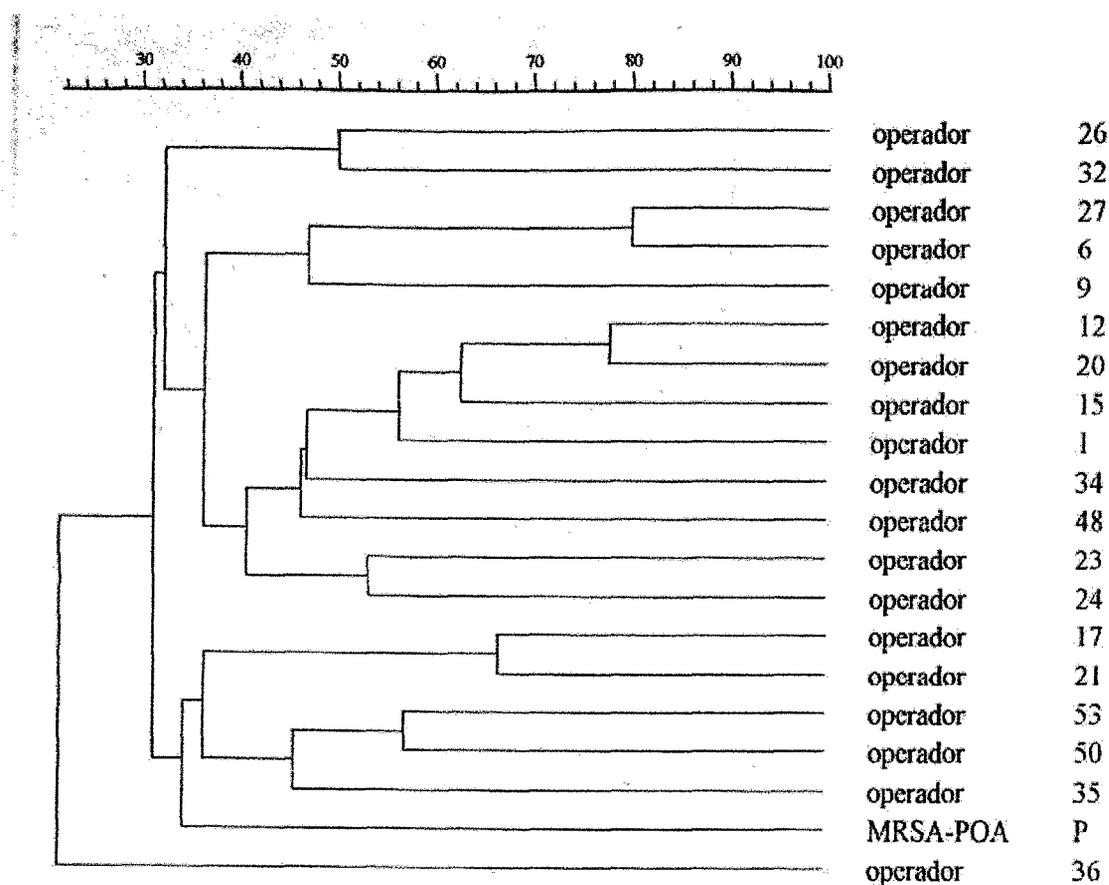


FIGURA 13. Dendrograma de comparação dos perfis de bandas de DNA cromossomal de *Staphylococcus aureus* isolados de operadores do Laticínio. MRSA-POA: *S. aureus* meticilina resistente isolado em hospitais de Porto Alegre. Coluna da direita: número de amostragem de cada isolado.

As análises indicam a ausência de uma única linhagem endêmica de *S. aureus* contaminando os 19 operadores investigados, sendo que 18 deles apresentaram linhagens com perfis distintos (similaridades menores que 80%). Apenas os operadores 6 e 27 demonstraram abrigar linhagens similares (80% de similaridade). Os microrganismos isolados dos operadores 12 e 20 apresentaram similaridade de 78%, demonstrando serem provavelmente relacionados.

As linhagens 15 e 20 (ou 12), 17 e 21 apresentaram similaridades de 61% e 66% respectivamente, sendo portanto também consideradas provavelmente relacionadas. As demais amostras (1, 9, 23, 24, 26, 32, 34, 35, 36, 48, 50 e 53) foram consideradas não relacionadas, uma vez que mostraram similaridades menores que 60%.

#### 4.14.2. Leite Cru

O dendograma apresentado na FIGURA 14 demonstra a comparação dos perfis de bandas dos DNAs cromossômicos de 19 *S. aureus* isolados a partir de amostras de leite cru.

A análise dessa figura demonstra acentuada diversidade de linhagens de *S. aureus* presentes no leite cru, uma vez que todas as 19 amostras investigadas apresentaram similaridades menores que 80%. As maiores percentagens de similaridade (70%) foram registradas para as amostras 94 e 98, sendo estas portanto provavelmente relacionadas. Ainda foram consideradas provavelmente relacionadas, porém com similaridades menores, as amostras 93 e 103 (67%), 101 e 115 (62%) e 105 e 109 com 63% de similaridade. As demais amostras (95, 99, 102, 107, 110, 111, 113, 114, 116, 117 e 118) foram classificadas como não relacionadas por mostrarem similaridades menores que 60%.

Nenhuma das amostras coletadas de operadores (FIGURA 13) ou leite cru (FIGURA 14) apresentou similaridade maior que 50% com o MRSA isolado de hospitais de Porto Alegre, demonstrando serem linhagens não relacionadas.

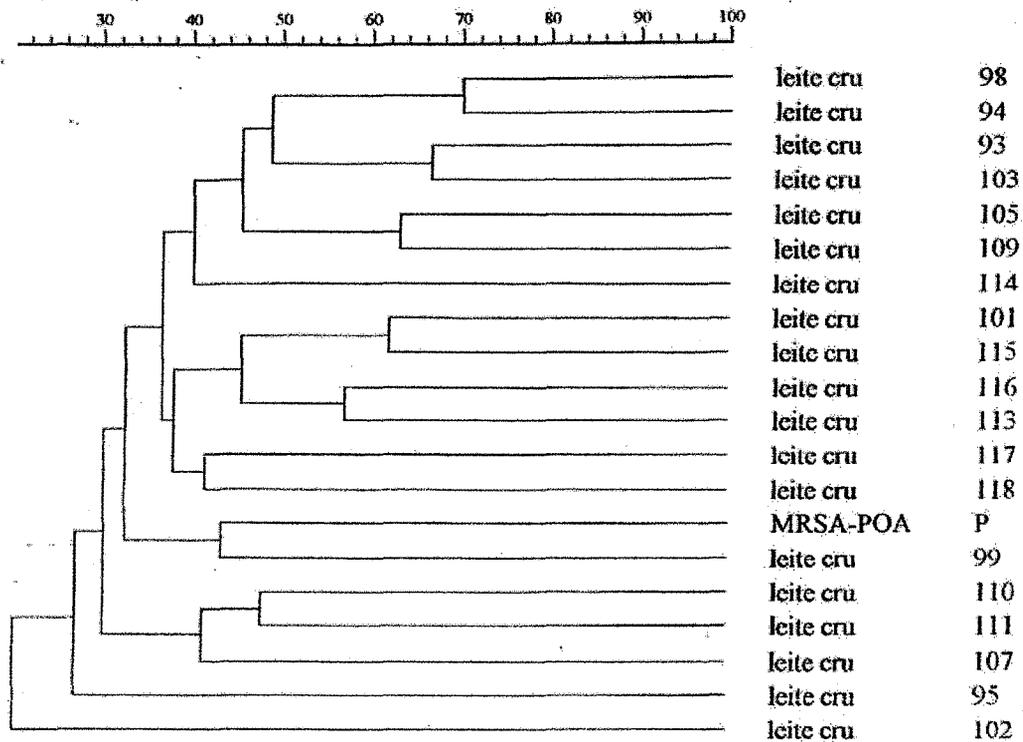


FIGURA 14. Dendrograma de comparação dos perfis de bandas de DNA cromossomal de *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru. MRSA-POA: *S. aureus* meticilina resistente isolado em hospitais de Porto Alegre. Coluna da direita: número de amostragem de cada isolado.

#### 4.14.3. Produtos Finais

A FIGURA 15 demonstra os perfis de bandas de DNAs cromossomais de *S. aureus* isolados dos 10 produtos finais produzidos pelo Laticínio.

A análise do dendrograma demonstra 9 perfis de bandas (similaridade < 80%) entre as amostras isoladas. As amostras 214 e 216, ambas isoladas de queijo minas frescal, apresentaram 95% de similaridade entre elas, sugerindo serem similares e provenientes da mesma fonte de contaminação.

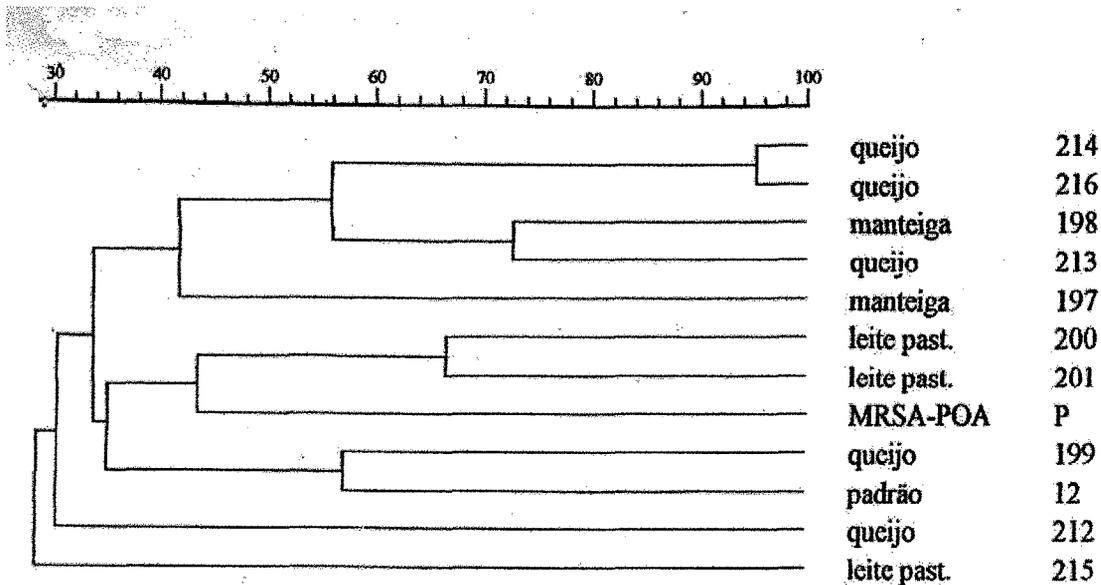


FIGURA 15. Dendrograma de comparação dos perfis de bandas de DNA cromossomal de *Staphylococcus aureus* isolados de produtos finais do Laticínio. MRSA-POA: *S. aureus* metilicina resistente isolado em hospitais de Porto Alegre. Padrão: DNA de *S. aureus* utilizado como padrão interno. Coluna da direita: número de amostragem de cada isolado.

A amostra 198 (manteiga) apresentou 73% de similaridade com a amostra 213 (queijo prato), enquanto a amostra 200 e a amostra 201, ambas provenientes de leite pasteurizado, apresentaram 66% de similaridade, sendo todas elas classificadas como provavelmente relacionadas.

As demais amostras (197, 199, 212 e 215) mostraram similaridades menores que 60%, demonstrando serem linhagens diferentes, as quais, conseqüentemente, vieram de origens distintas.

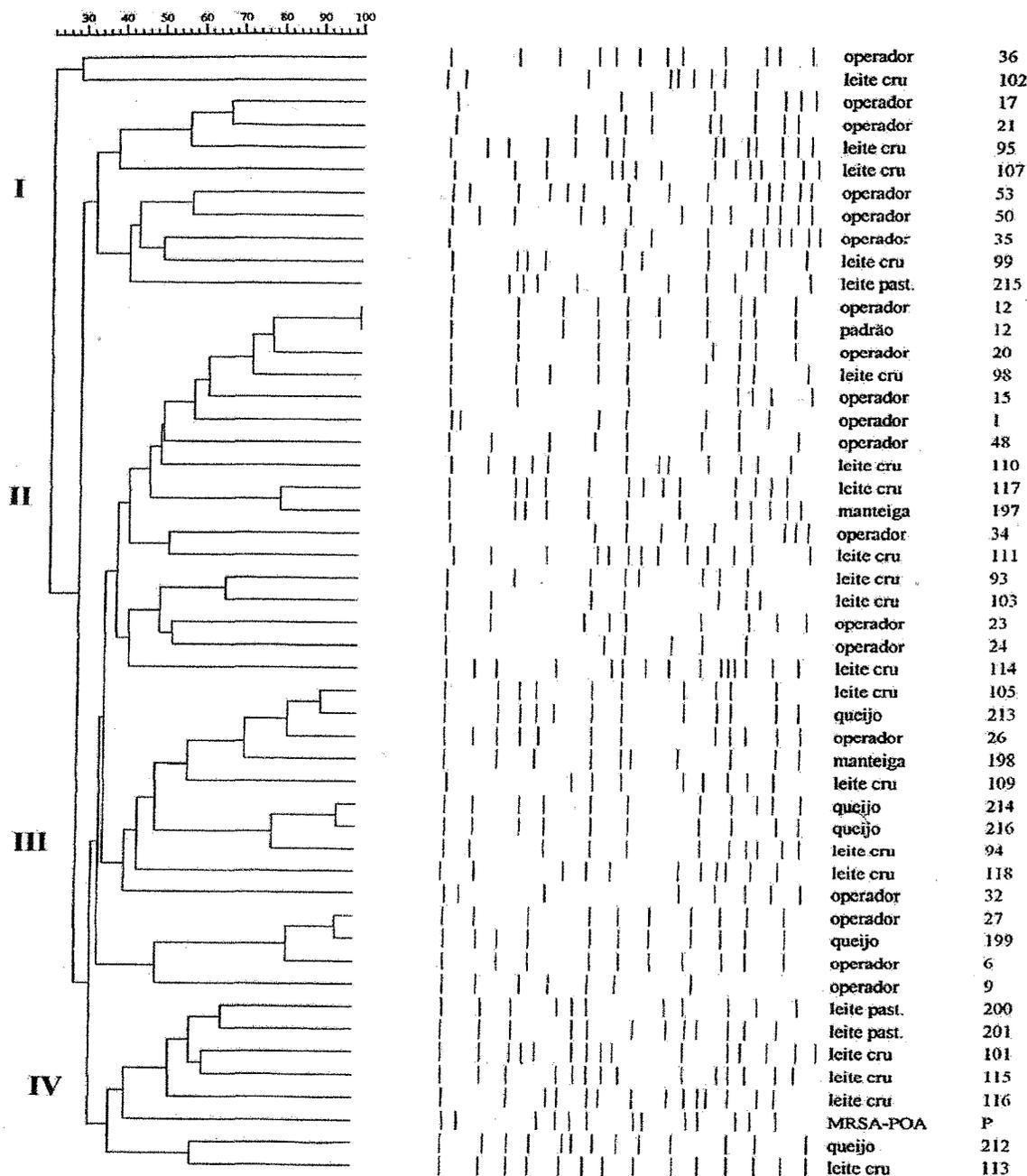
#### 4.14.4. Similaridade de DNAs Cromossomais de *S. aureus* Isolados de Operadores, Leite Cru e Produtos Finais de Laticínio

A FIGURA 16 apresenta o dendograma de comparação dos DNAs cromossomais extraídos de *S. aureus* isolados de operadores, leite cru e produtos finais do Laticínio em estudo.

A análise comparativa de todas as amostras de *S. aureus* isoladas no presente trabalho demonstrou padrão multi variado de perfis de bandas.

Dentre as 48 amostras analisadas em conjunto, foram identificados 42 perfis de bandas diferentes (similaridade < 80%), os quais formaram 4 grupos distintos (1, 2, 3 e 4). O Índice de Discriminação (D) para a tipagem por PFGE foi de 0,99 como pode ser acompanhado no ANEXO 1.

A quantificação do número de linhagens geradas em separado pelos operadores (FIGURA 13), leite cru (FIGURA 14) e produtos finais (FIGURA 15) resultou em 46 linhagens diferentes, porém quando comparadas em conjunto (FIGURA 16), resultaram em 42 linhagens distintas, uma vez que amostras de operadores, leite cru e produtos finais foram similares entre si (similaridade  $\geq$  80%).



**FIGURA 16.** Dendrograma de comparação dos perfis de bandas de DNA cromossomal de *Staphylococcus aureus* isolados de operadores, leite cru e produtos finais do Laticínio. MRSA-POA: *S. aureus* meticilina resistente isolado em hospitais de Porto Alegre. Leite past.: leite pasteurizado. Padrão: DNA de *S. aureus* utilizado como padrão interno. Coluna da direita: número de amostragem de cada isolado.

#### 4.15. Similaridade de Perfis de Restrição e Procedência dos Isolados

Uma vez que o dendograma apresentado na FIGURA 16 agrupou os isolados de *S. aureus* em quatro grupos distintos, a procedência das amostras de cada grupo foi investigada, com o intuito de verificar semelhanças entre perfis genéticos e origem de amostras.

O grupo 1 foi composto por 11 amostras (17, 21, 35, 36, 50, 53, 95, 99, 102, 107 e 215), o grupo 2 apresentou 16 amostras (1, 12, 15, 20, 23, 24, 34, 48, 93, 98, 103, 110, 111, 114, 117 e 197) mais o padrão interno de alinhamento de géis (amostra 12) o qual não foi considerado para cálculos de percentagens. O grupo 3 reuniu 14 linhagens (6, 9, 26, 27, 32, 94, 105, 109, 118, 198, 199, 213, 214, e 216) enquanto o grupo 4 foi formado por 7 amostras (101, 113, 115, 116, 200, 201 e 212) (TABELA 5) mais o MRSA-POA que também não entrou nos cálculos de percentagem por não ser proveniente do Laticínio.

TABELA 5. Distribuições de linhagens de *S. aureus* isoladas de operadores, leite cru e produtos finais nos grupos de similaridade do dendograma gerado por PFGE.

Origem da linhagem	Agrupamento de perfis segundo similaridade por PFGE (%)			
	Grupo 1 (n*= 11)	Grupo 2 (n= 16)	Grupo 3 (n= 14)	Grupo 4 (n= 7)
Operadores	54,54	50,00	35,71	0
Leite cru	36,36	43,75	28,57	57,14
Produto final	9,09	6,25	35,71	42,85
Total (%)	100	100	100	100

\*: número de linhagens agrupadas.

Como pode ser acompanhado na TABELA 5, a presença de linhagens provenientes de operadores foi verificada nos grupos 1, 2 e 3, nas seguintes percentagens: 54,54% no grupo 1; 50,00% no grupo 2; 35,71% no grupo 3. No grupo 4, não houve nenhuma amostra proveniente de operadores.

Linhas oriundas do leite cru perfizeram 36,36% dos isolados do grupo 1; 43,75% do grupo 2; 28,57% do grupo 3 e 57,14% do grupo 4, enquanto as linhagens provenientes de produtos finais compuseram 9,09% do grupo 1; 6,25% do grupo 2; 35,71% do grupo 3 e 42,85% do grupo 4.

Nenhum dos grupos foi formado exclusivamente por amostras provenientes da mesma origem.

#### 4.16. Identificação das Prováveis Fontes de Contaminação dos Produtos

##### Finais

Dentre os 10 *S. aureus* isolados de produtos finais, quatro amostras (197, 213, 214 e 216) (TABELA 6) foram classificadas como similares a linhagens isoladas do leite cru. A amostra 197 (manteiga) apresentou similaridade de 80% com a amostra 117 (leite cru). A amostra 213 (queijo prato) demonstrou 90% de similaridade com a amostra 105 (leite cru). Enquanto as amostras 214 e 216 (queijos minas frescal) mostraram similaridade de 95% entre elas e 80% de similaridade com a amostra 94 (leite cru).

TABELA 6. Prováveis fontes de contaminação de produtos finais por *S. aureus* segundo análise por PFGE.

Produto final	Data da amostragem dos produtos finais	Provável fonte de contaminação segundo PFGE
Manteiga (197)	12/07/97	Leite cru (117)
Queijo prato (213)	14/05/98	Leite cru (105)
Queijo minas frescal (214)	14/11/98	Leite cru (94)
Queijo minas frescal (216)	07/12/98	Leite cru (94)
Queijo quark (199)	29/07/97	Manipulador (27)
Manteiga (198)	12/06/97	ND
Leite pasteurizado (200)	16/07/97	ND
Leite pasteurizado (201)	17/07/97	ND
Queijo minas frescal (212)	20/05/98	ND
Leite pasteurizado (215)	20/10/98	ND

ND: não determinado. Números entre parênteses correspondem ao número das amostras.

Um *S. aureus* isolado de um queijo quark (amostra 199) demonstrou similaridade de 95% com uma linhagem isolada de um manipulador (amostra 27).

As amostras 198, 200, 201, 212 e 215 demonstraram linhagens de *S. aureus* não similares a nenhum outro microrganismo analisado (TABELA 6).

#### **4.17. Comparação Entre as Linhagens Isoladas e o MRSA-POA**

A presença de linhagens similares ao MRSA-POA não foi verificada no Laticínio em estudo, sendo portanto os *S. aureus* isolados não relacionados a esse microrganismo.

#### **4.18. Contaminação do Produto Final por *Staphylococcus aureus***

A percentagem de contaminação por *S. aureus* de produtos finais, durante o período de 1996 a 1999, está representada na FIGURA 17. Nessa figura, pode-se acompanhar a diminuição da contaminação dos produtos lácteos produzidos, paralelamente a evolução da implantação do sistema APPCC.

No ano de 1996, (sem o plano APPCC) houve isolamento de *S. aureus* de 2,41% (n=22) das amostras analisadas (n=912). Em 1997, com o início do plano APPCC em maio, o *S. aureus* foi isolado de 1,05% (n=17) das amostras analisadas (n=1615), sendo que 5 delas foram isoladas após o mês de maio e então analisadas neste trabalho. Já em 1998, apenas 0,31% (n=5) dos produtos finais investigados (n=1608) apresentaram contaminação por esse microrganismo, sendo que no ano de 1999 nenhum *S. aureus* foi isolado em mais de 1600 amostras analisadas.

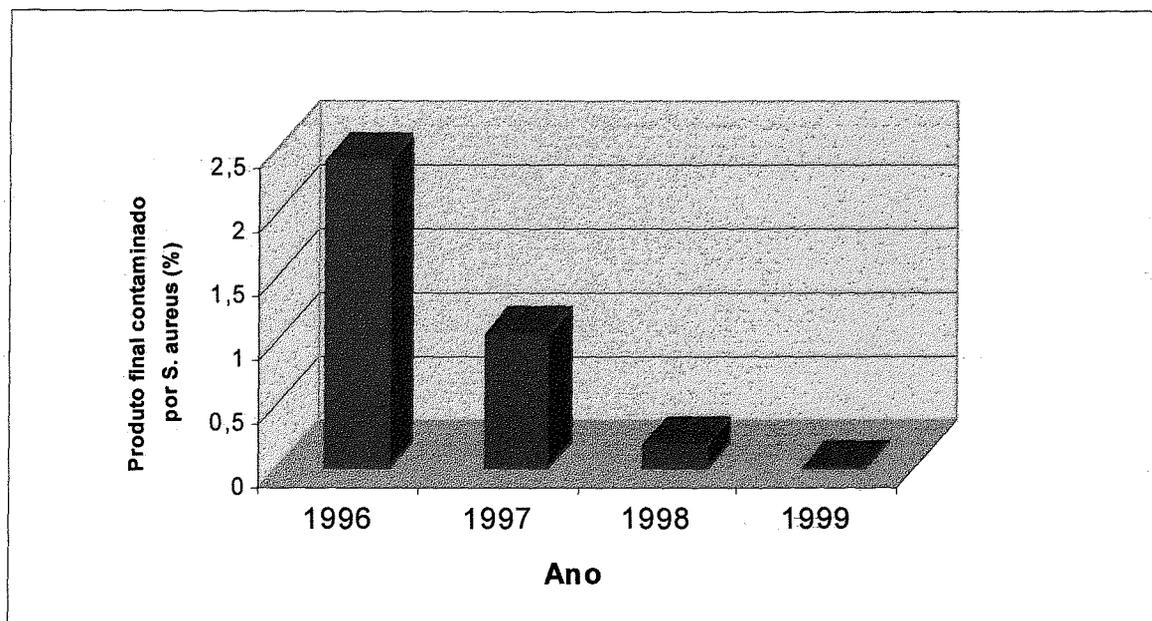


FIGURA 17. Contaminação de produto final por *Staphylococcus aureus* no período de 1996 a 1999 no Laticínio.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Contaminação por Mesófilos Totais em Leite Cru e Leite Cru Resfriado

A contagem de microrganismos mesófilos totais é realizada a fim de avaliar a contaminação geral de um alimento (FRANCO e LANDGRAF, 1996), não especificando a origem desta contaminação.

Quando produzido na glândula mamária o leite é estéril. Ele entra em contato com os microrganismos no interior do úbere e ao deixar a glândula mamária pelo orifício do teto (RUIZ, 1992). Adicionados a esses microrganismos podem ser encontrados microrganismos de origem ambiental, de manipuladores e demais fontes de contaminação externas, os quais indicam as condições microbiológicas do leite (NUSSINOVITCH et al., 2000).

No presente trabalho, as contagens de microrganismos mesófilos totais no leite cru demonstraram níveis preocupantes de contaminação microbiana, mesmo sendo essa matéria prima investigada quanto a sua acidez no momento da recepção na usina. Para tanto, cada amostra foi aprovada pelo teste do alizarol (FAGUNDES, 1997) realizado em nível de plataforma, apresentando acidez entre de 16 e 20° Dornic, seguindo especificações da própria empresa.

A média aritmética das 100 amostras de leite cru revelou quantidades de microrganismos ( $9,89 \times 10^6$  UFC/mL) muito superiores a aquelas relatadas por BRANDÃO (1998). Esse autor relata que o leite cru tipo C, produzido atualmente no Brasil, encontra-se com contagens em torno de  $2,0 \times 10^6$  UFC/mL, enquanto o leite tipo B apresenta aproximadamente  $3,5 \times 10^5$  UFC/mL e o leite tipo A  $2,0 \times 10^3$  UFC/mL. Apenas para fins de comparação, nos Estados Unidos, o leite cru em média apresenta de  $2,0$  a  $5,0 \times 10^3$

UFC/mL, evidenciando condições higiênico-sanitárias de ordenha, transporte e armazenamento bastante superiores. Confirmando esses dados, em um levantamento recente, contagens um pouco superiores a esses números foram demonstradas por BOOR et al. (1998) que analisaram 855 amostras de leite cru do estado de Nova York e demonstraram contagens de mesófilos totais com média aritmética de  $1,14 \times 10^4$  UFC/mL. Dessas amostras, apenas 5,5% excederam o limite regional de  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL.

A nível de legislação brasileira, o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) do Ministério de Agricultura e do Abastecimento estabelece que o leite tipo A, antes da pasteurização, deve apresentar até  $10^4$  UFC/mL, o leite tipo B pode ter até  $5,0 \times 10^5$  UFC/mL, sendo que para o leite cru tipo C não há limite estabelecido nesse regulamento (BRASIL 1997b).

Neste trabalho, nenhuma das amostras de leite cru sem resfriamento apresentou qualidade de leite tipo A, sendo que apenas 4% delas demonstraram níveis de contaminação microbiana adequada para a classificação do leite como tipo B.

Se o número de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL (contaminação máxima permitida pela nova legislação do Ministério da Agricultura e Abastecimento que vigorará a partir de 2002 no Brasil) fosse tomado como limite atual de aceitação do leite C ao chegar na usina, 94% das amostras de leite não resfriado encontrariam-se acima desse limite. Além disso, 40% das amostras apresentaram contagens, no mínimo, dez vezes superiores a esse parâmetro, demonstrando que leites em condições microbiológicas insatisfatórias foram freqüentemente processados pelo Laticínio em estudo. GRUETZMACHER e BRADLEY JR (1999) salientaram que a qualidade do leite cru pode influenciar na duração da vida de prateleira do leite pasteurizado. Esses autores trabalharam com amostras de leite cru com contaminação média de  $7,2 \times 10^3$  UFC/mL e, controlando a pasteurização e evitando

contaminações pós-pasteurização, alcançaram leites pasteurizados com vidas de prateleira de até 33,9 dias. No Brasil, o prazo de validade do leite tipo C pasteurizado é de dois dias, evidenciando a baixa qualidade desse leite mesmo depois de tratamento térmico.

Cabe salientar que a elevada contaminação microbiana, além de diminuir a qualidade do leite para fins de processamento, sugere a presença potencial de microrganismos patogênicos. Diversos autores demonstraram a presença desses microrganismos no leite cru (CLIVER, 1990; AHRABI et al., 1998; LIN et al., 1998; PIRTTIJARVI et al., 1998; YOSHIDA et al., 1998), os quais, sob condições de crescimento apropriadas, podem resultar em problemas de saúde pública. Como exemplo disso, ALTEKRUSE et al. (1998) constataram que a utilização de leite cru na elaboração de queijo, a pasteurização inapropriada e a contaminação pós-pasteurização foram os principais responsáveis por 11 surtos de toxinfecções com 58 mortes registrados no Center for Diseases Control (CDC) no período de 1973 a 1992 nos Estados Unidos.

Em relação a contaminação do leite cru resfriado dentro da propriedade rural, pôde-se perceber que o nível de contaminação por mesófilos totais permaneceu bastante elevado. Apesar da análise estatística ter demonstrado diferença significativa (95% de significância) entre as médias aritméticas das contagens de mesófilos do leite cru resfriado e não resfriado, o emprego de temperaturas mais baixas não foi suficiente para a desejada redução do número de microrganismos no leite cru.

Segundo BRANDÃO (1998), somente com o resfriamento imediato do leite na propriedade, a contaminação do leite C cairia de cerca de  $2,0 \times 10^6$  UFC/mL para aproximadamente  $5,0 \times 10^5$  UFC/mL, sem qualquer outra medida.

Se forem consideradas somente as médias aritméticas das contagens de leite cru resfriado e não resfriado, essa redução de 4 vezes acima citada não foi verificada no presente trabalho.

Ainda assim, diversos resultados parciais demonstraram efeito positivo do controle da temperatura sobre o crescimento de microrganismos. Por exemplo, enquanto o leite cru não resfriado apresentou 40% de amostras com contagens superiores à  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL, no leite cru resfriado apenas 11% das amostras apresentaram esse nível de contaminação. No leite cru não resfriado, 94% das amostras mostraram mais de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL de mesófilos totais, enquanto 72% das amostras do leite cru resfriado apresentaram números maiores que esse parâmetro. Mais ainda, 8% das amostras de leite cru resfriado demonstraram quantidades microbianas menores que  $5,0 \times 10^5$  UFC/mL (padrão do leite tipo B segundo RIISPOA) (BRASIL 1997b), enquanto que 4% ficaram abaixo desse número no leite sem resfriamento. Tais resultados sugerem que o controle da temperatura apresentou efeito parcial sobre a contaminação microbiana total do leite cru, porém outros fatores, como por exemplo a limpeza precária de utensílios e equipamentos de ordenha, foram mais significativos para a elevada contaminação do leite cru.

EVERSON (1984 *apud* OLIVEIRA, 1999a) estimou que mais de 95% das causas das altas contagens de microrganismos no leite cru são originárias de deficiências na lavagem e sanitização de equipamentos e utensílios de ordenha.

Os resultados apresentados na TABELA 1 demonstraram que a contaminação do leite cru aumentou substancialmente devido a utilização de ordenhadeiras ou resfriadores mal higienizados. Pôde-se observar que o leite cru antes de passar pelas ordenhadeiras (coleta manual) apresentou aproximadamente  $10^3$  UFC/mL de mesófilos totais nas amostras provenientes das seis propriedades analisadas, podendo ser classificado como leite tipo A

(BRASIL, 1997b). Os mesmos leites, coletados logo após a utilização de ordenhadeiras, apresentaram contagens microbianas superiores a  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL, sugerindo que essa contaminação foi proveniente dos equipamentos utilizados na ordenha mecânica.

Quando o leite foi coletado de dentro de resfriadores (temperatura média abaixo de  $7^\circ\text{C}$ ), as contagens de mesófilos totais foram variáveis entre  $1,4 \times 10^5$  UFC/mL (produtor 6) até  $1,1 \times 10^6$  UFC/mL (produtor 2), demonstrando incremento do número de microrganismos devido a contaminação presente nesses equipamentos.

A possibilidade de multiplicação dos microrganismos durante o processo de refrigeração nos resfriadores foi avaliada através da quantificação de microrganismos presentes nos controles (leite cru antes das ordenhadeiras) conservados 12 horas sob refrigeração ( $7^\circ\text{C}$ ) e então quantificados. Os resultados dessas amostras demonstraram não ter havido desenvolvimento microbiano expressivo sob tais condições, reforçando o fato de que o aumento das contagens de mesófilos totais foi proveniente da má higienização de equipamentos e utensílios.

As contagens referentes a psicotróficos totais (TABELA 1) também confirmaram esses resultados, uma vez que os leites crus logo após a ordenha apresentaram contaminação inicial inferior a  $10^1$  UFC/mL e logo após a utilização de ordenhadeiras as contagens variaram de  $5,6 \times 10^1$  UFC/mL (produtor 6) até  $1,9 \times 10^3$  UFC/mL (produtor 2).

O número de psicotróficos foi ainda maior quando o leite cru foi coletado diretamente de dentro dos resfriadores, atingindo contagens que variaram de  $1,2 \times 10^4$  UFC/mL (produtor 5) até  $6,4 \times 10^5$  UFC/mL (produtor 2). Tais resultados indicam que a população psicotrófica inicial do leite foi bastante baixa, aumentando principalmente após a utilização dos resfriadores, onde sugere-se que a população microbiana contaminante seja significativamente psicotrófica devido a constante manutenção das baixas temperaturas.

Além disso, o sistema de duas ordenhas diárias (manhã e tarde) propicia a também constante reposição de leite cru sem prévia higienização desses equipamentos, possibilitando a constante permanência de microrganismos.

## **5.2. Contaminação por Coliformes Totais e Presença de *E. coli* no Leite Cru e Leite cru Resfriado**

Fazem parte do grupo dos coliformes totais, predominantemente as bactérias dos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Destes, apenas a *Escherichia* tem como habitat primário o trato intestinal do homem e animais. Os demais gêneros, além de serem encontrados nas fezes, também estão presentes em outros ambientes como superfície de vegetais, solo e água (FRANCO e LANDGRAF, 1996), sendo os coliformes, portanto utilizados na verificação da contaminação proveniente de fontes externas ao leite e outros alimentos.

As amostras analisadas neste trabalho demonstraram elevadas quantidades de coliformes totais nos leites crus investigados (média de  $6,41 \times 10^5$  UFC/mL para leite cru e média de  $5,54 \times 10^5$  UFC/mL para leite cru resfriado). A análise estatística das médias das amostras de leite cru resfriado e não resfriado não evidenciou diferença significativa entre elas, demonstrando que o resfriamento a nível de propriedade e de transporte não acarretou na redução global desejada dos microrganismos.

Assim como os resultados das contagens de mesófilos totais, o efeito do resfriamento só foi evidenciado quando as amostras foram analisadas em grupos conforme o nível da contaminação. Por exemplo, no leite cru não resfriado 100% das amostras apresentaram coliformes (73% delas com contagens superiores a  $10^5$  UFC/mL), porém duas

amostras de leite cru resfriado demonstraram ausência desses microrganismos. Enquanto que 47% das amostras sob refrigeração demonstraram contaminação inferior a  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL, apenas 10% das amostras de leite cru não resfriado mostraram semelhante resultado. Além disso, no leite sob refrigeração 73% das amostras mostraram contaminação entre  $1,0 \times 10^5$  e  $9,9 \times 10^5$  UFC/mL, enquanto no leite cru resfriado foram apenas 34% das amostras.

Corroborando a idéia de que a origem da contaminação do leite analisado foi decorrente de falhas na higienização de equipamentos e utensílios utilizados na ordenha do mesmo, a análise das FIGURA 2 e 4 demonstrou que contagens elevadas de coliformes totais foram evidenciadas tanto nos meses frios quanto nos meses quentes de amostragem, sugerindo que outros fatores além dos climáticos influenciaram nas altas contagens dos leites crus resfriados ou não.

Fato interessante a ser ressaltado é que a maior contagem (amostra 21 – FIGURA 4) de coliformes no leite cru resfriado ( $4,68 \times 10^6$  UFC/mL) foi superior a maior contagem do leite cru não resfriado ( $3,69 \times 10^6$  UFC/mL amostra 85 – FIGURA 2), demonstrando a possibilidade de números bastante altos de coliformes totais mesmo sob armazenamento e transporte refrigerado.

As altas contagens de coliformes totais, além de diminuírem a qualidade do leite podem resultar em problemas de saúde pública. MOSSEL e GARCIA (1993) relataram que diversas linhagens de *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter* já foram confirmadas como responsáveis por enfermidades transmitidas por alimentos. Estas bactérias teriam adquirido a patogenicidade por transferência de material genético a partir de *Enterobacteriaceae* patogênicas, justificando a necessidade do controle desses microrganismos no leite.

A nível de legislação brasileira, a presença de bactérias do grupo coliforme em leite pasteurizado fluido, apesar de indesejável, é tolerada (BRASIL, 1997a). Segundo a portaria 451/97 do Ministério da Saúde, o leite pasteurizado tipo A pode conter 1 coliforme por mL, o leite pasteurizado tipo B pode apresentar 4 coliformes por mL, enquanto o leite pasteurizado tipo C pode ter até 10 coliformes totais por mL. Mesmo que tais bactérias sejam facilmente eliminadas pelos processos de pasteurização, a contaminação do produto final pode acontecer por falha deste processo ou após a pasteurização, logo o controle da quantidade desses microrganismos no leite cru é recomendável.

Além da contaminação por coliformes totais, a presença de *E. coli* no leite cru analisado neste trabalho foi evidenciada em 63,26% das amostras, sugerindo contato dessa matéria prima com resíduos, provavelmente das fezes do gado.

A pesquisa de coliformes fecais, ou mais especificamente da *E. coli*, fornece informações mais precisas sobre as condições higiênicas do produto e melhor indicação sobre a provável presença de enteropatógenos (FRANCO e LANDGRAF, 1996). De acordo com o Serviço de Inspeção e Segurança Alimentar dos Estados Unidos (FSIS), a *E. coli* é o microrganismo mais apropriado para indicar contaminação de origem fecal, sendo que tal fonte de contaminação é considerada a principal rota de acesso para outras bactérias patogênicas como a *Salmonella*, o *Campylobacter* e a *E. coli* O157:H7 (EDMISTON e RUSSELL, 1999).

Outros pesquisadores também demonstraram a presença elevada de coliformes totais e fecais no leite cru brasileiro, porém em percentagens diferentes das apresentadas pelo presente trabalho.

ALVES e CORRÊA (1997) constataram que 90,32% e 87,10% das 31 amostras de leite cru coletadas no comércio de São Luis (MA) apresentavam coliformes totais e fecais,

respectivamente. Do mesmo modo, DIAS et al. (1999) analisaram 42 amostras de leite cru comercializados em municípios de Minas Gerais e verificaram que 90,50% delas continham coliformes totais, enquanto 80,90% foram positivas para coliformes de origem fecal. Já LOGUERCIO e ALEIXO (1999) demonstraram que todas as 87 amostras de leite cru coletadas de diversos fornecedores da periferia da cidade de Cuiabá (MT) foram positivas para coliformes totais e fecais, sendo que 64 e 38 delas apresentaram número mais provável (NMP) de coliformes totais e fecais, respectivamente, superiores a 50/mL.

Fato interessante a ser comentado é que a *E.coli* foi isolada de 63,26% das amostras de leite cru não resfriado, enquanto que nas amostras de leite cru resfriado apenas 36% delas demonstraram sua presença. Tais resultados sugerem efeito positivo da refrigeração do leite cru na prevenção da presença da *E. coli* neste produto.

### **5.3. Contaminação por Microrganismos Psicotróficos Totais no Leite Cru Resfriado**

São considerados psicotróficos aqueles microrganismos capazes de crescer relativamente rápido sob temperatura de refrigeração (7°C). Apesar desse termo implicar em crescimento em baixas temperaturas, poucos microrganismos psicotróficos isolados de alimentos têm temperaturas ótimas de crescimento abaixo de 20°C (SPECK, 1976).

Geralmente os gêneros *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* e certos coliformes fazem parte dos psicotróficos, além de fungos que crescem sob refrigeração. Tais microrganismos quando colocados à temperatura acima de 20 a 30°C crescem de maneira mais abundante, justificando seu isolamento tanto como mesófilos quanto psicotróficos.

A análise da FIGURA 5 demonstra que as maiores contagens de microrganismos psicrotróficos no leite cru resfriado foram verificadas justamente nos meses mais frios de coleta (maio a agosto), sugerindo que, além da presença elevada desses microrganismos no leite cru ao longo do ano, as baixas temperaturas climáticas podem favorecer a proliferação dos mesmos.

Comparando as médias das contagens de mesófilos totais ( $9,89 \times 10^6$  UFC/mL) e psicrotróficos totais ( $2,38 \times 10^6$  UFC/mL) encontradas no leite cru amostrado, pode-se verificar que cerca de 24% da contaminação microbiana total do leite apresentou comportamento de psicrotróficos, sugerindo elevada potencialidade de degradação do leite mesmo sob refrigeração. Proporções entre mesófilos totais e psicrotróficos totais semelhantes às encontradas nesse trabalho foram demonstradas por BOOR et al. (1998) ao analisarem 855 amostras de leite cru coletadas no estado de Nova York. Tais pesquisadores demonstraram que a média dos mesófilos totais foi de  $1,14 \times 10^4$  UFC/mL, enquanto os psicrotróficos mostraram quantidades médias de  $2,30 \times 10^3$  UFC/mL (20,17%), sugerindo potencial de degradação desse leite se armazenado por períodos prolongados sob refrigeração.

A redução da qualidade do leite cru ou pasteurizado é geralmente consequência do crescimento e atividade metabólica de bactérias psicrotróficas. Apesar da maioria desses microrganismos serem inativados pela pasteurização, alguns deles têm o potencial de produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas que podem resistir a esse processamento térmico e, as vezes, à esterilização. Essas enzimas podem degradar proteínas ou gorduras nos produtos finais, reduzindo a vida de prateleira mesmo sem a presença desses microrganismos (CARVALHO et al., 1997; BOOR et al., 1998). Particularmente em Laticínios, a contagem de psicrotróficos é importante pela prática de coleta a cada 48 horas

ou pelo armazenamento prolongado desse produto. Nessas situações, as temperaturas de refrigeração e o tempo de armazenamento possibilitam a proliferação de microrganismos psicrotróficos, assim como seus metabólitos, resultando em problemas relacionados a perda de qualidade do leite (GRUETZMACHER e BRADLEY JR, 1999).

OLIVEIRA et al. (1999a) destacam que o leite deve ser armazenado abaixo de 4°C dentro de no máximo duas horas após a ordenha, a fim de não propiciar a proliferação de microrganismos psicrotróficos. Na coleta em tarros, geralmente a flora inicialmente contaminante é, na sua maioria, composta por mesófilos. Esses microrganismos podem apresentar comportamento de psicrotróficos no leite cru coletado pela tarde e mantido resfriado até o dia seguinte. Desta forma, o resfriamento do leite em latões imersos em água gelada (como ainda é feito em grande parte dos produtores do Laticínio estudado) não consegue atingir a temperatura de 4°C nas duas primeiras horas após a ordenha (resultados informados pelo Laticínio), propiciando o desenvolvimento de microrganismos potencialmente degradadores (CARVALHO et al., 1997).

#### **5.4. Contaminação do Leite cru Por *Staphylococcus aureus***

Dentre os microrganismos potencialmente enteropatogênicos, o *S. aureus* é um dos mais abundantes, se não o mais freqüente, encontrado no leite cru. Essa característica associada a capacidade de produção de enterotoxinas termo-resistentes capazes de resistir à pasteurização, contribuem para que esse microrganismo seja um dos mais importantes a serem prevenidos na produção de laticínios. Além disso, cerca de 30% das linhagens de *S. aureus* são enterotoxigênicas (SOARES et al, 1997), as quais são passíveis de serem encontradas no leite e derivados, haja visto a grande diversidade de animais de onde o leite

é coletado. No presente trabalho, 82% das amostras de leite cru apresentaram contaminação por *S. aureus*, sendo que as maiores contagens atingiram  $1,86 \times 10^4$  UFC/mL.

Quantidades mais elevadas desse microrganismo foram encontrados por ADESIYUN et al. (1998) que demonstraram a presença de *S. aureus* em 100% das 175 amostras de leite cru coletadas em tarros de fazendas em Trinidad na América Central. As contagens desse microrganismo no leite amostrado variaram de  $2,4 \times 10^3$  a  $1,2 \times 10^5$  UFC/mL.

Já percentagens menores de leite contaminado, porém com maiores quantidades por mililitro foram encontradas por DIAS et al. (1999) que, ao estudarem 42 amostras de leite cru comercializados em alguns municípios mineiros, demonstraram que 54,8% continham *S. aureus*, sendo que 12 delas apresentavam contagens superiores a  $10^5$  UFC/mL. Dentre as amostras positivas para *S. aureus* 41,7% apresentaram capacidade de produção de enterotoxina (SEC e SED). Do mesmo modo, LOGUERCIO e ALEIXO (1999) demonstraram contagens de *S. aureus* superiores a  $10^4$  UFC/mL em 66,67% das 87 amostras de leite cru comercializados em Cuiabá - MT. Contagens ainda maiores (superiores a  $10^6$  UFC/mL) foram encontradas em 16,0% das amostras analisadas, demonstrando potencial perigo à saúde pública.

São preocupantes as quantidades de *S. aureus* encontradas no leite cru, uma vez que é comumente aceito que  $10^5$  células por grama ou mililitro de alimento podem produzir quantidade suficiente de enterotoxina para provocar intoxicação alimentar (CLIVER, 1990).

As contaminações do leite cru verificadas no presente trabalho foram relativamente baixas (média de  $3,56 \times 10^3$  UFC/mL) se comparadas as quantidades acima citadas,

contudo, o frequente isolamento do *S. aureus* sugere cuidados severos quanto à saúde do rebanho e controle de tempo e temperatura de transporte do leite.

### **5.5. Melhorias a Serem Implantadas a Partir das Análises Microbiológicas do Leite Cru**

Os resultados das análises do leite cru (550 análises) demonstraram a necessidade de controle do leite a nível de campo e não simplesmente a partir da recepção na usina. Com base nas altas contagens de microrganismos mesófilos totais, coliformes totais e fecais, *E. coli*, psicrotróficos e *S. aureus* em leites crus resfriados e não resfriados, pôde-se concluir que a produção do leite que abastece o Laticínio em estudo necessita de cuidados especiais quanto a procedimentos de higiene de equipamentos e utensílios utilizados na ordenha e refrigeração do leite. A pouca conscientização a respeito da necessidade de procedimentos rigorosos de limpeza de equipamentos e recipientes ainda é bastante grande a nível de campo, mesmo sendo esse assunto a muito tempo discutido. Os treinamentos que muitas vezes acontecem nas indústrias de laticínios (como parte desse trabalho foram realizados 4 treinamentos de Boas Práticas de Fabricação - BPF e APPCC para todo pessoal do Laticínio) são raros ou inexistentes a nível de campo, propiciando que a produção leiteira continue com deficiências básicas de higiene.

FONSECA (1998) destaca a conscientização dos produtores quanto a limpeza e operação de resfriadores como um fator de extrema importância, uma vez que sem ela o sistema a granel pode se tornar bastante problemático, principalmente com coletas a cada 48 horas e a ação de bactérias psicrotróficas. A fim de evitar esses problemas, o processo de treinamento dos produtores foi colocado sob responsabilidade dos médicos veterinários do Laticínio estudado.

Os resultados apresentados neste trabalho contribuíram para que o Laticínio estudado buscasse o financiamento e instalação de resfriadores a nível de propriedade e a substituição da coleta de tarros por coleta a granel como medida corretiva do problema das altas contaminações do leite cru.

Em dezembro de 1999, 80% dos produtores possuíam resfriadores nas propriedades e a coleta a granel ocorria em 45% da produção. Atualmente (2000), praticamente toda a coleta é realizada à granel por caminhões tanque, gerando um segundo problema: a mistura de leite de boa qualidade microbiológica com leite com altas contagens microbianas proveniente, principalmente, de pequenas propriedades.

Os lucros arrecadados com a produção leiteira, especialmente dos pequenos produtores, não permitem nem incentivam o investimento em qualidade. Em visto disso, o Laticínio analisado estudou o pagamento diferenciado por qualidade microbiológica do leite (verificação através da acidez), além do pagamento por produtividade como já era realizado.

#### **5.6. Avaliação da Multiplicação de Mesófilos Totais, Psicrotróficos Totais e *Staphylococcus aureus* no Leite Cru Resfriado e à Temperatura Ambiente**

As curvas de crescimento apresentadas no item 4.7. foram realizadas com o intuito de avaliar o tempo disponível entre ordenha e recebimento do leite na usina antes que microrganismos mesófilos totais, psicrotróficos totais e *S. aureus* alcançassem quantidades inaceitáveis.

Apesar de diversos autores (NOVA, 1998; OLIVEIRA et al. 1999a) sugerirem o resfriamento do leite cru à temperaturas não superiores a 5°C, as mínimas temperaturas atingidas nos processos de resfriamento após ordenha e transporte do leite

cru analisado foram de aproximadamente 7°C, sendo portanto essa a mínima temperatura testada nos experimentos discutidos a seguir.

#### **5.6.1) Crescimento de microrganismos mesófilos totais no leite cru**

Assim como os leites coletados de seis propriedades analisadas (TABELA 1) por esse trabalho, a contaminação inicial por mesófilos totais do leite utilizado no presente experimento (FIGURA 7) permitiria a classificação do mesmo como tipo A, segundo os padrões estabelecidos pelo Ministério de Agricultura e Abastecimento (BRASIL, 1997b).

Se a quantidade microbiana de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL, for estabelecida pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento através do PNQL (Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite) como limite para a contagem total de microrganismos na recepção do leite, dentro de aproximadamente 7 horas de transporte à temperatura de 22°C o leite não estaria mais dentro do limite preconizado. É necessário também lembrar, que esse tempo foi estipulado unicamente com base no crescimento microbiano, partindo-se da suposição de higiene adequada dos equipamentos de coleta e transporte do leite.

O tempo real de transporte do leite de algumas propriedades até o Laticínio, ou o tempo de espera pelo caminhão refrigerado é de aproximadamente 8 horas, nas quais esse produto, muitas vezes, permanece à temperatura ambiente (nem sempre abaixo de 22 °C) durante todo esse período. Além disso, os leites provenientes dessas propriedades são misturados com leites de boa qualidade microbiológica, resultando em aumento das contagens microbianas como um todo. Um dos graves problemas desse

fato é que tais propriedades geralmente são as mais remotas e onde, muitas vezes, os recursos não permitem o investimento em equipamentos de refrigeração adequados.

A refrigeração do leite a 7 °C demonstrou ser suficiente para o controle de crescimento dos mesófilos totais, sugerindo ser essa temperatura adequada para o armazenamento de leite de um dia para o outro, como ocorre na coleta à granel a cada 48 horas.

#### **5.6.2) Crescimento de microrganismos psicrotróficos totais no leite cru**

A contaminação inicial de psicrotróficos totais foi  $1,60 \times 10^5$  UFC/mL, sendo que os mesófilos totais apresentaram contaminação inicial mais baixa ( $4,8 \times 10^3$  UFC/mL). Tais resultados mostram que a contaminação inicial do leite analisado estava, na sua maioria, adaptada a baixas temperaturas, sugerindo contaminação externa ao leite proveniente, provavelmente, dos tarros utilizados para refrigeração.

Considerando o parâmetro de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL, o leite analisado atingiu tais níveis em aproximadamente seis horas após a ordenha, sugerindo ser esse o tempo máximo de transporte com temperatura de até 22°C e se equipamentos utilizados na ordenha forem bem higienizados.

Quando comparados, os psicrotróficos atingiram  $10^8$  UFC/mL no tempo médio de nove horas, enquanto os mesófilos totais precisaram de 20 horas para alcançarem as mesmas quantidades celulares. Ao final de 24 horas, a população de psicrotróficos alcançou  $8,1 \times 10^8$  UFC/mL, enquanto os mesófilos atingiram  $3,8 \times 10^8$  UFC/mL, demonstrando melhor desenvolvimento dos microrganismos psicrotróficos em temperatura de 22°C.

A temperatura de 7°C demonstrou maior capacidade de inibição do crescimento de psicotróficos que a temperatura de 22°C, demonstrando ser uma temperatura adequada para o transporte a conservação do leite por até 24 horas.

Sob temperatura de refrigeração, as contagens desses microrganismos apresentaram pequeno aumento, fato esse que pode ser preocupante para os pouco frequentes armazenamentos prolongados por mais de 24 horas. Esses dados vão ao encontro dos resultados observados por CARVALHO et al. (1997) que demonstraram incremento populacional de psicotróficos em leite cru armazenado a 7°C por até 4 dias. Os mesmos autores sugerem como medida para controlar tal crescimento, a conservação do leite cru abaixo de 4°C.

### 5.6.3) Crescimento de *Staphylococcus aureus* no leite cru

A quantidade inicial de *S. aureus* verificada no leite cru analisado foi de  $7,0 \times 10^2$  UFC/mL (FIGURA 9), sendo que o seu desenvolvimento a temperatura de 22°C ocorreu sem fase de adaptação (fase lag). A não ocorrência de fase lag sugere adaptação do microrganismo ao leite e ausência do efeito de inibidores naturais desse produto sobre as células de *S. aureus*.

No caso de *S. aureus*, a quantidade de  $10^5$  UFC/mL pode produzir enterotoxina suficiente para causar intoxicação alimentar. No presente experimento, tal número de células foi atingido em cerca de 13 horas após a ordenha à temperatura de 22°C, tempo esse superior ao que acontece de fato entre a ordenha e a refrigeração no Laticínio em estudo. Cabe salientar que as quantidades médias de *S. aureus* no leite cru a nível de plataforma são bastante variáveis (FIGURA 6), sugerindo que números iniciais desse microrganismo no leite variam amplamente conforme a saúde do rebanho. Sendo assim,

os tempos necessários para atingir a quantidade de  $10^5$  UFC/mL podem ser em muito reduzidos.

A quantidade de *S. aureus* no leite cru analisado permaneceu em média com  $10^5$  UFC/mL a partir de 13 horas de incubação até o final do experimento (24 horas de incubação), caracterizando assim a fase estacionária. A falta de incremento do número de *S. aureus* pode ser explicada pelo fato desse microrganismo ser considerado um fraco competidor frente a flora acompanhante de alguns alimentos (CLIVER, 1990).

A FIGURA 9 mostra que quando o leite cru foi incubado sob refrigeração ( $7^\circ\text{C}$ ), o número de *S. aureus* manteve-se baixo (inicial de  $7,0 \times 10^2$  UFC/mL e final de  $1,5 \times 10^3$  UFC/mL) durante as 24 horas avaliadas, demonstrando ser essa temperatura eficiente na contenção da multiplicação desse microrganismo durante o período avaliado.

Apesar de temperaturas abaixo de  $4^\circ\text{C}$  serem amplamente recomendadas para o transporte e armazenamento de leite, os experimentos acima citados demonstram que a temperatura de  $7^\circ\text{C}$  (utilizada pelo Laticínio) parece ser apropriada para o transporte do leite por períodos menores que 24 horas.

De modo geral, com base nas análises das três curvas de crescimento pôde-se verificar que se o leite com qualidade microbiológica de leite tipo A for conservado à temperatura de  $22^\circ\text{C}$  por aproximadamente sete horas, há o desenvolvimento de quantidades microbianas suficientes para classificá-lo como leite tipo C. Além disso, o período de sete horas à temperatura de  $22^\circ\text{C}$  demonstrou ser o limite máximo de tempo de transporte a fim de garantir a adequação do leite cru a nova legislação que entrará em vigor em breve, demonstrando o importante papel do controle da temperatura a partir da ordenha até a pasteurização.

### **5.7. Análise de Eficiência de Limpeza e Sanitização de Bancadas, Equipamentos e Utensílios**

A importância dos procedimentos de limpeza e sanitização de bancadas, equipamentos e utensílios deve ser destacada, pois se os mesmos forem realizados de forma inadequada podem resultar em contaminação dos produtos finais por microrganismos patogênicos ou na diminuição dos prazos de validade. Em 1985, um surto de salmonelose com aproximadamente 200.000 casos aconteceu nos Estados Unidos devido ao consumo de leite pasteurizado. Nesse caso, as prováveis fontes de contaminação foram espaços nas tubulações do pasteurizador, os quais protegiam células de *Salmonella* Typhimurium dos processos de limpeza e sanitização (JAY, 1996). GRUETZMACHER e BRADLEY JR. (1999) demonstraram que, eliminando fontes de contaminação pós pasteurização e seguindo procedimentos corretos de sanitização dos equipamentos com cloro, a vida de prateleira do leite pasteurizado foi aumentada de 9 para 20,4 dias.

No Laticínio estudado, a limpeza de mesas de aço inoxidável, tanques para preparação do queijo e utensílios para preparo do queijo são limpos rotineiramente após cada utilização. Para tanto utiliza-se água corrente e sabão em pó clorado (Diversey-Lever), os quais são removidos com água corrente potável. A sanitização desses equipamentos e utensílios é realizada sempre antes do uso dos mesmos, repetindo a mesma metodologia de limpeza e acrescentando um enxague com água fervente.

O American Public Health Association (APHA) estabelece que superfícies limpas e sanitizadas podem conter até  $2,0 \times 10^2$  UFC/100cm<sup>2</sup> para serem consideradas satisfatórias, acima desses números as mesmas superfícies são classificadas como

insatisfatórias. A Organização Panamericana de Saúde (OPAS) classifica como excelentes as superfícies que apresentem menos de  $1,0 \times 10^3$  UFC/100cm<sup>2</sup>, boas as superfícies com contaminação entre  $1,1 \times 10^3$  e  $2,9 \times 10^3$  UFC/100cm<sup>2</sup>, regulares as superfícies com  $3,0 \times 10^3$  a  $4,9 \times 10^3$  UFC/100cm<sup>2</sup> e mal higienizadas aquelas com mais de  $5,0 \times 10^3$  UFC/100cm<sup>2</sup> (MORENO In SILVA Jr., 1995).

Já SILVA Jr. (1995), analisando as superfícies de equipamentos e utensílios de cozinhas industriais, sugere que a higienização seja considerada satisfatória até  $5,0 \times 10^3$  UFC/100cm<sup>2</sup>, não sendo satisfatória acima desses números ou pela presença de microrganismos patogênicos.

Os resultados apresentados nesse trabalho demonstraram que apenas os procedimentos de limpeza de bancadas, equipamentos e utensílios realizados pelo Laticínio estudado já foram suficientes para a adequação segundo parâmetros estipulados pela OPAS e por SILVA Jr. (1995) (exceto na área do creme de leite). A adição dos procedimentos de sanitização permitiram também a adequação aos parâmetros estipulados pela APHA. Com base nos resultados obtidos, os procedimentos de limpeza e sanitização de bancadas, equipamentos e utensílios utilizados na produção de laticínios foram considerados adequados para a remoção de microrganismos dessas superfícies.

Apenas amostras recolhidas de superfícies de equipamentos da área de produção do creme de leite demonstraram níveis elevados de contaminação microbiana, as quais também contribuíram para a contaminação do creme de leite produzido pelo Laticínio estudado.

Como uma das causas das contaminações acima citadas pôde-se responsabilizar uma centrífuga de leite cru localizada dentro da área de fabricação do creme de leite. Esse

equipamento projetava dejetos, assim como microrganismos provenientes do leite para dentro do ambiente de produção, tornando-o bastante contaminado. Uma vez constatada tal fonte de contaminação, o respiro da centrífuga foi canalizado para fora da área de produção, diminuindo a contaminação do ambiente e do produto final.

### **5.8. Verificação de Procedimentos de Limpeza de Superfícies Através da Produção de Bioluminescência**

Os procedimentos de limpeza de superfícies também foram verificados através da produção de luminescência pelo aparelho Hy-Lite<sup>R</sup> (Merck), uma vez que a eficiência da sanitização é dependente da quantidade residual de matéria orgânica (não verificada pela contagem em placas) ou microrganismos sobre uma superfície qualquer.

Apesar de todas as doze amostras analisadas terem apresentado níveis reduzidos de crescimento microbiano (FIGURA 11), em três delas o aparelho Hy-Lite<sup>R</sup> verificou níveis inaceitáveis (segundo padrão estipulado pela própria Merck) de Unidades Relativas de Luz (250, 280 e 300 URL). Interessante ainda que dentre essas amostras, duas delas apresentaram 280 e 300 URL, porém não foi detectado crescimento microbiano. Tal ocorrido pode ser justificado pela presença de matéria orgânica de origem não microbiana sobre estas superfícies, as quais proveram os ATPs necessários para a reação entre luciferina e luciferase, gerando conseqüentemente luminescência. Em termos de limpeza, esse resultado sugere que matéria orgânica residual permaneceu sobre as superfícies limpas, podendo, mais tarde servir de substrato para o desenvolvimento microbiano. Desta forma, os procedimentos de sanitização, utilizando água fervente ou vapor quente, principalmente antes do uso, são recomendáveis àquelas superfícies que entrarão em contato direto com os produtos lácteos.

### **5.9. Isolamento de *Staphylococcus aureus* Provenientes de Leite cru em Caminhões de Transporte**

Dentre as amostras de leite cru coletadas dos 21 caminhões de transporte, 90,48% permitiram o isolamento do *S. aureus* (TABELA 2). Esses resultados vão ao encontro daqueles mostrados nas coletas de leite cru na recepção do Laticínio (item 4.6.), onde 82% das amostras continham o *S. aureus* (FIGURA 6), demonstrando a presença freqüente desse microrganismo na maior parte das amostras analisadas.

A estratégia de coletar uma amostra de cada caminhão de transporte de leite foi adotada com o intuito de isolar linhagens diferentes provenientes de regiões distintas, uma vez que cada caminhão coletava leite de produtores de uma região em particular.

Procedimento semelhante foi realizado por SILVA (1998) o qual analisou 134 *S. aureus* provenientes de 25 propriedades produtoras de leite situadas em sete municípios gaúchos diferentes. Em ambos trabalhos, os procedimentos de coleta foram assim realizados, a fim de estudar em nível molecular a correlação entre os *S. aureus* isolados.

### **5.10. Isolamento de *Staphylococcus aureus* em Manipuladores de Alimentos**

A presença de *S. aureus* foi verificada em 35,29% dos manipuladores do Laticínio em estudo, demonstrando níveis de contaminação dentro do esperado.

Segundo SCHAECHTER (1993), 30 a 50% dos seres humanos são portadores assintomáticos desse microrganismo, sendo facilmente encontrado nas mãos, nasofaringe, axilas, orelhas e superfícies corporais. A quantidade de *S. aureus* pode

oscilar muito de acordo com a parte do corpo colonizada, variando de 10 até  $10^6$ UFC/cm<sup>2</sup>.

Altas percentagens de contaminação por *S. aureus*, também foram encontradas por SOARES et al. (1997) que demonstraram que a incidência desse microrganismo foi de 49,5 e 43,3% em operadores de cozinhas hospitalares e cozinhas comunitárias, respectivamente. Esses autores investigaram a produção de enterotoxina por essas linhagens e detectaram que 28,6% delas eram enterotoxigênicas.

A responsabilidade dos manipuladores nas contaminações de alimentos tem sido destacada a muito tempo, mesmo assim falhas nos cuidados higiênicos e na manipulação continuam sendo responsáveis por intoxicações estafilocócicas.

SOUZA et al. (1999) descreveram um surto no Município de Santana do Manhuaçu - MG o qual envolveu 2000 pessoas em um almoço comemorativo. Após 30 minutos os sintomas característicos de intoxicação estafilocócica apareceram e foram responsáveis pela hospitalização de 370 pessoas, sendo que mais tarde foram registrados 17 óbitos. Os resultados das análises microbiológicas revelaram quantidades de *S. aureus* superiores a  $10^8$  UFC/g nos alimentos investigados. A presença de linhagens enterotoxigênicas nos manipuladores foi detectada, sendo que 65,2% delas produziram toxina A, 76,9% toxina B, 46,2% toxina C e 7,7% enterotoxina D.

No Rio Grande do Sul, o serviço de Vigilância Sanitária aponta que o *S. aureus* foi responsável por 5,9% dos surtos de Enfermidades Transmitidas por Alimentos ocorridos em 1998, sendo que os fatores causais relacionados a manipulação inadequada de alimentos e manipuladores infectados foram responsáveis por 15% dos casos (RIO GRANDE DO SUL, 1998).

### **5.11. Isolamento de *Staphylococcus aureus* em Equipamentos de Produção**

A presença de *S. aureus* não foi evidenciada em nenhuma das 145 amostras coletadas a partir de superfícies de equipamentos, sugerindo Boas Práticas de Fabricação e bons procedimentos de higienização dos equipamentos amostrados (TABELA 2). Esses dados são coerentes com aqueles apresentados no item 4.8. (Eficiência de Limpeza e Sanitização de Bancadas, Equipamentos e Utensílios) desse trabalho.

### **5.12. Isolamento de *Staphylococcus aureus* em Produto Final**

A eliminação de *S. aureus* do produto final foi um dos principais objetivos dos treinamentos em Boas Práticas de Fabricação (BPF) e da implantação do sistema APPCC no Laticínio investigado.

A partir dessa data (maio de 1997), com o intuito de prevenir e controlar o *S. aureus*, foram melhoradas as Boas Práticas de Fabricação, as quais contribuíram em grande parte para a diminuição da incidência de isolamento desse microrganismo dos produtos finais. Porém, falhas nesses procedimentos resultaram em 10 produtos contaminados por *S. aureus*, os quais foram investigados por métodos de fenotipagem e genotipagem a fim de identificar as origens desses microrganismos e então evitá-las.

### **5.13. Susceptibilidade a Antimicrobianos**

As percentagens mais altas de resistência a antibióticos foram encontradas para a penicilina, sendo que os *S. aureus* isolados de manipuladores demonstraram maior

número de linhagens resistentes a esse antimicrobiano (94,44%) que os *S. aureus* isolados do leite cru (42,86%). Se forem analisadas somente as susceptibilidades dos isolados do leite cru, resultados semelhantes foram relatados por LANGE et al. (1999) que obtiveram 43,9% dos 66 *S. aureus* isolados de vacas mastíticas resistentes à penicilina e ampicilina. Do mesmo modo, BAYNES et al. (1999), demonstraram que 64% de todas as bactérias isoladas do leite cru analisado em Trinidad e Jamaica foram resistentes à penicilina. Altas percentagens de resistência à penicilina também foram encontradas por SOARES et al. (1997) que, avaliando a resistência de 130 linhagens de *S. aureus* provenientes de manipuladores de alimentos de cozinhas hospitalares, encontraram que 81% mostravam resistência a esse antibiótico.

A diferença entre a percentagem de resistência de linhagens provenientes de manipuladores e do leite cru pode ser explicada pelo longo tempo de utilização clínica de antibióticos contra, principalmente, *S. aureus* isolados de seres humanos (SCHAECHTER et al., 1993), os quais parecem ser diferentes daqueles encontrados no leite cru.

SILVA (1998) salienta que apenas um dos *S. aureus* coletados de mãos de ordenhadores de leite demonstrou perfil molecular semelhante a aqueles microrganismos isolados do leite em 25 propriedades rurais, a maioria das linhagens provenientes dessas duas fontes demonstraram ser diferentes nos seus respectivos perfis genéticos.

Outro fator a ser ressaltado é o aparecimento de resistência intermediária (eritromicina e clindamicina), além da resistência à penicilina, verificada por algumas linhagens isoladas nesse trabalho. Tais resultados demonstram a evolução gradativa de

resistência à diferentes antibióticos por parte de linhagens consideradas menos virulentas (provenientes de indústrias de alimentos).

A administração de doses sub-terapêuticas de antibióticos à animais destinados a alimentação humana têm sido amplamente utilizada com o intuito de aumentar o peso do animal e prevenir doenças. Tal prática vêm introduzindo pressão seletiva sobre os microrganismos da flora desses animais, podendo resultar no aparecimento de linhagens resistentes (MANIE et al., 1999). Além dos antibióticos adicionados as rações animais, doses bem maiores dessas drogas são administradas para o tratamento de doenças veterinárias, também contribuindo no aparecimento de linhagens resistentes. BAYNES et al. (1999) comentam que um dos principais fatores que colaboram com os resíduos de antibióticos no leite é o fácil acesso dos produtores a essas drogas e a administração das mesmas sem a supervisão de veterinários.

A sensibilidade (100%) a oxacilina, cefalotina, gentamicina, sulfametaxazol/trimetoprim e vancomicina demonstrada por todos os *S. aureus* avaliados nesse trabalho, demonstra a grande diferença entre estas linhagens e aquelas isoladas de ambientes hospitalares, as quais são consideradas preocupantes devido a patogenicidade e multi-resistência a antimicrobianos (KLUYTMANS et al., 1995; DE LENCASTRE et al., 1996; HOEFNAGELS-SCHUERMANS et al., 1997).

Nos últimos anos, muita atenção tem sido direcionada a multi-resistência de certos *S. aureus*, principalmente daquelas linhagens altamente virulentas conhecidas por *S. aureus* meticilina resistentes (MRSA). Estes microrganismos vêm apresentando resistência a praticamente todos os antimicrobianos testados, com exceção da vancomicina. O problema fica ainda maior com o aparecimento, no Japão, Estados Unidos e agora no Brasil (OLIVEIRA et al., 1999b), de linhagens intermediariamente

resistentes também a essa droga em ambientes hospitalares. DOMINGUEZ et al. (1994) comentam que esses microrganismos, uma vez presentes em um hospital, são muito difíceis de serem erradicados o que também pode ocorrer em indústrias de alimentos. Nesse sentido, o aparecimento, na carne ou no leite, de linhagens de *Staphylococcus* resistentes à vancomicina pode ser um resultado do uso de avoparcina injetável, a qual é utilizada para proporcionar ganho de peso em animais confinados. Essa droga pertence ao mesmo grupo e tem a mesma forma de ação da vancomicina, logo é de se esperar que bactérias resistentes a essa droga possam vir a ser resistentes também a vancomicina (MANIE et al., 1999).

Com base nesses dados, a investigação da resistência a antimicrobianos de linhagens bacterianas nas indústrias de alimentos também é recomendada, haja visto que a transmissão horizontal desse microrganismo pode facilmente acontecer via alimentos.

Por exemplo, SOARES et al. (1997) relataram a presença de MRSA em três manipuladores de alimentos de cozinhas hospitalares, enquanto KLUYTMANS et al. (1995) descreveram um surto de intoxicação alimentar causado por um MRSA, envolvendo 27 pacientes e 14 atendentes de uma unidade de tratamento intensivo (UTI), resultando em 5 mortes.

No presente trabalho, não foram encontradas linhagens de *S. aureus* resistentes à vancomicina, no entanto atenção deve ser direcionada ao fato de alguns isolados estudados apresentarem resistência a mais de um antibiótico.

#### 5.14. Diferenciação de Linhagens de *Staphylococcus aureus* Através de Perfil de Susceptibilidade a Antimicrobianos

A utilização do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos para a diferenciação de linhagens de *S. aureus* já foi bastante utilizada na área clínica (DE LENCASTRE et al., 1996; HOEFNAGELS-SCHUERMANS et al., 1997; SMELTZER et al. 1997), porém a sensibilidade desse método compromete a sua aplicação na identificação correta de fontes de contaminação, como demonstram os resultados mais tarde discutidos.

Segundo os resultados da susceptibilidade a antimicrobianos, os *S. aureus* provenientes de operadores foram classificados em 4 perfis diferentes, dos quais 78,94% dos isolados pertenciam aos perfis A e B, sugerindo a presença de linhagens fenotipicamente semelhantes entre os operadores. Contudo, os resultados apresentados pelo PFGE demonstraram que a grande maioria das linhagens foram diferentes.

As amostras provenientes de leite cru demonstraram estar distribuídas de forma mais homogênea entre os 7 perfis diferentes, sugerindo diversidade de linhagens, como era de se esperar, de leites coletados de regiões geograficamente distintas. A distribuição dos isolados entre os perfis não demonstrou predominância acentuada de nenhuma linhagem, reforçando o resultado que sugere alta diversidade entre as amostras investigadas.

As amostras provenientes de produtos finais mostraram 5 perfis de susceptibilidade a antimicrobianos. O pequeno número de amostras (n=10), apresentando-se distribuído em 5 perfis diferentes, sugere ampla variedade entre os isolados coletados e, conseqüentemente, diferentes origens de contaminação.

Se fossem considerados apenas os resultados da susceptibilidade a antimicrobianos e desconsiderados os do PFGE, poderia-se assumir erroneamente a ocorrência das mesmas linhagens de *S. aureus* em diferentes pontos do processo produtivo do Laticínio. Além disso, uma vez que o mesmo perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foi encontrado em diferentes origens e produtos finais, não foi possível sugerir a fonte de contaminação (entre operadores e leite cru) dos produtos finais das amostras 197, 198, 199, 212, 213, 214 e 216.

Apenas o perfil E agrupou somente amostras de produtos finais (200, 201 e 215) e isolados vindos do leite cru, sugerindo esse último como fonte de contaminação dos referidos produtos finais.

Nenhuma das amostras de produtos finais apresentou perfil de susceptibilidade a antimicrobianos igual a apenas um isolado proveniente de operador ou do leite cru, impossibilitando a correção pontual de uma falha em procedimentos higiênicos ou processuais.

#### **5.15. Genotipagem de *Staphylococcus aureus* por Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE)**

A genotipagem dos *S. aureus* através de PFGE demonstrou perfis contendo de 6 a 15 bandas, das quais 73,46% (36 isolados) apresentaram dez ou mais bandas de DNA cromossomal.

Quantidades maiores de bandas claras e reprodutíveis aumentam o poder de discriminação dos métodos de genotipagem, porém diversos trabalhos apontam análises por PFGE ou RAPD com linhagens que apresentam números reduzidos de bandas. Tal fato pode ser justificado pelo estabelecimento dos padrões de análise ou corrida

eletroforética (impulso inicial e final, tempo de corrida, voltagem, temperatura, tempo e temperatura de ciclos em termocicladores) anteriores a tipagem de uma dessas linhagens.

DESTRO et al. (1996) utilizando a técnica do PFGE em 115 amostras de *Listeria monocytogenes* provenientes de indústria de processamento de camarões encontraram padrões de restrição variando de 16 até 25 bandas. Entretanto, as mesmas amostras analisadas por RAPD apresentaram de 7 a 17 bandas. Esses mesmos autores salientam que os números de perfis gerados por RAPD ou PFGE para *L. monocytogenes* em diferentes grupos de pesquisa, têm sido bastante variados, os quais são dependentes das sequências de "primers" escolhidas, reagentes e equipamentos utilizados, enzimas de restrição ou condições de corrida nos géis de agarose.

O número de bandas apresentados nas diferentes linhagens do presente trabalho, apesar de variado, foi semelhante aqueles encontrados por outros pesquisadores que investigaram o *S. aureus* através do PFGE.

DOMINGUEZ et al. (1994) analisaram por PFGE 189 amostras de MRSA coletados em um hospital de Barcelona e obtiveram linhagens com 6 a 12 bandas, sendo que as linhagens predominantes apresentaram cerca de 12 bandas. KUMARI et al. (1997) analisaram 180 amostras de MRSA coletados em hospitais da Inglaterra e demonstraram perfis eletroforéticos compostos por 8 a 13 bandas. Já McCULLAGH et al. (1998), investigando a epidemiologia do *S. aureus* no processamento de frangos, obtiveram amostras com 12 bandas em média.

### 5.15.1. Operadores

Devido a alta diversidade de perfis encontrados entre os operadores do Laticínio (18 perfis com menos de 80% de similaridade entre 19 operadores), os resultados sugerem a ausência de uma única linhagem endêmica, ou mesmo uma linhagem predominante, de *S. aureus* contaminando os operadores investigados. Durante as coletas, suspeitou-se que mais de um operador pudesse estar colonizado pela mesma linhagem, uma vez que tais pessoas trabalhavam em um mesmo ambiente, as vezes, por muitos anos. Contudo, apenas os operadores 6 e 27 demonstraram abrigar linhagens similares (80% de similaridade), o que pode ser justificado pelo fato dos mesmos serem casados. Outros dois operadores (12 e 20) demonstraram abrigar linhagens provavelmente similares (78% de similaridade), porém nenhum traço de parentesco foi encontrado entre eles. Os demais operadores apresentaram linhagens com similaridades mais baixas, demonstrando especificidade entre cada manipulador de alimentos e uma linhagem diferente de *S. aureus*. Tais resultados são bastante interessantes, uma vez que podem permitir a identificação precisa da contaminação de alimentos a partir de operadores específicos dentro de uma indústria. Desta forma, a utilização do PFGE pode ser empregada com o intuito de identificar falhas individuais de operadores, evitando os trabalhosos treinamentos de todo pessoal. Cabe lembrar que, em grande parte desses treinamentos coletivos, a diminuição da produtividade ocorre como consequência das paradas de setores inteiros. Desta forma, os gastos gerados com os treinamentos, somados a aqueles advindos da diminuição da produtividade podem ser até mais altos que as próprias análises moleculares.

### 5.15.2. Leite cru

As análises demonstraram que todas as amostras provenientes de leite cru abrigavam linhagens diferentes entre si, uma vez que apresentaram similaridades menores que 68%. Essa ampla variedade de linhagens de *S. aureus* no leite cru já era esperada, haja visto a grande diversidade de regiões e animais diferentes dos quais o leite foi coletado.

Alta diversidade de linhagens de *S. aureus* no leite cru tem sido demonstrada por diversos pesquisadores. SILVA (1998) encontrou 38 perfis genéticos diferentes ao analisar 132 amostras através do RAPD. RAIMUNDO et al. (1999), utilizando a técnica do PFGE, verificaram 13 linhagens em 26 *S. aureus* isolados de leite bovino. Do mesmo modo, LANGE et al. (1999), estudando por PFGE 66 *S. aureus* provenientes de leites de vacas mastíticas, diferenciaram 33 linhagens desses microrganismos.

### 5.15.3. Produtos Finais Contaminados por *S. aureus* e a Diversidade de Linhagens Dentro de Indústrias de Alimentos

Os *S. aureus* isolados de produtos finais e analisados por PFGE demonstraram nove perfis de bandas com similaridade menor que 80%, sugerindo terem sido contaminadas por origens diferentes. Apenas as amostras 214 e 216, ambas isoladas do queijo minas frescal, apresentaram similaridade de 95%, sugerindo serem a mesma linhagem a qual veio, provavelmente, da mesma origem.

Quando comparados todos juntos, os 48 *S. aureus* isolados de operadores, leite cru e produtos finais geraram 42 perfis de bandas diferentes, demonstrando ampla variedade de linhagens desse microrganismo dentro do ambiente de produção. Se considerados que cerca de 30% dos *S. aureus* são enterotoxigênicos (SOARES et al.,

1997), a probabilidade de contaminação de produtos lácteos com essas linhagens é bastante grande.

O emprego de técnicas moleculares no estudo epidemiológico dentro de indústrias de alimentos tem demonstrado ampla variedade de diferentes linhagens de microrganismos nesses ambientes.

DESTRO et al. (1996), utilizando as técnicas RAPD e PFGE, encontraram 24 perfis diferentes nas 115 amostras de *Listeria monocytogenes* isoladas de indústria de processamento de camarões, demonstrando alta variabilidade de linhagens dentro daquela indústria. McCULLAGH et al. (1998) utilizaram o PFGE para encontrar 26 perfis de bandas diferentes entre 52 amostras de *S. aureus* coletados de aves clinicamente comprometidas e abatedouros de frango na Irlanda do Norte. Os mesmos pesquisadores também analisaram 62 amostras de *S. aureus* coletadas em 2 abatedouros de frangos, constatando que 48% delas foram idênticas, 22% foram relacionadas e 29% das mesmas demonstraram ser diferentes. Tais resultados demonstraram que apesar da alta variabilidade de linhagens presentes nos abatedouros investigados, uma delas foi predominante. Do mesmo modo, MIETTINEN et al. (1999) isolaram 41 amostras de *Listeria monocytogenes* de uma planta de processamento de sorvetes. As amostras foram clivadas com 3 enzimas de restrição diferentes durante os ensaios de PFGE, produzindo de 6 a 8 perfis distintos de acordo com a enzima utilizada.

#### **5.16. Similaridade de Perfis de Restrição e Procedência dos Isolados**

O dendograma apresentado na FIGURA 16 organizou as amostras em 4 grupos distintos de acordo com a similaridade de seus perfis de restrição, tais grupos poderiam

ser formados exclusivamente por amostras de operadores, leite cru ou produtos finais, caracterizando perfis específicos para cada procedência de amostras.

Os resultados apresentados demonstraram que não houve no dendograma um grupo formado exclusivamente por amostras de operadores, leite cru ou produtos finais, demonstrando que não foram encontradas características genotípicas específicas que pudessem agrupá-los de acordo com sua origem de isolamento.

É possível, no entanto, que amostragens muito maiores de *S. aureus*, analisados por técnicas moleculares, pudessem estabelecer correlação entre os perfis de restrição cromossomal e origem de contaminação.

#### **5.17. Identificação por PFGE das Fontes de Contaminação dos Produtos Finais**

Segundo as análises por PFGE, as amostras 197, 213, 214 e 216 apresentaram *S. aureus* similares à linhagens isoladas do leite cru, sugerindo ter sido essa a fonte de contaminação das amostras citadas acima. Esse fato é bastante interessante, uma vez que baseado na eficiência de eliminação do *S. aureus* pelo pasteurizador e nas Boas Práticas de Fabricação implantadas, a contaminação cruzada com o leite cru dificilmente era cogitada no Laticínio como provável fonte de contaminação de produtos finais.

Outro fato que cabe ser ressaltado, é que quando considerados os períodos de amostragem desses leites crus (matéria prima) e dos produtos finais contaminados acima citados, pode-se presumir que linhagens semelhantes de *S. aureus* estavam presentes no leite cru em períodos diferentes, uma vez que o isolamento de *S. aureus* do leite cru foi realizado no mês de maio de 1997, enquanto os isolamentos de

microrganismos similares nos produtos finais foram realizados em 12/07/97 (amostra 197), 14/05/98 (amostra 213), 14/11/98 (amostra 214) e 07/12/98 (amostra 216) como está demonstrado na TABELA 6.

Esses resultados também sugerem que existam linhagens específicas de *S. aureus* no leite de um Laticínio em particular (mesmos produtores), permitindo o isolamento das mesmas linhagens ao longo do ano. Corroborando essa idéia, SILVA (1998) demonstrou que os mesmos perfis de *S. aureus* gerados por RAPD foram encontrados em leites crus de diferentes municípios vizinhos, enquanto diversos perfis ficaram restritos a determinadas propriedades e/ou localidades. Esse mesmo autor demonstrou que alguns perfis foram encontrados em diversas propriedades de um mesmo município apenas, sugerindo que linhagens específicas de *S. aureus* estão presentes no leite cru de regiões específicas.

Um *S. aureus* isolado de um queijo quark (amostra 199) demonstrou similaridade de 95% com uma linhagem isolada de um manipulador (amostra 27), sugerindo contaminação proveniente manipulação inadequada.

Ao contrário do suposto no início do trabalho, a maioria das fontes de contaminação sugeridas para os produtos finais não foram ocasionadas por falhas nas condutas de pessoal, mas sim por contaminação cruzada com o leite cru. Como já mencionado anteriormente, é possível que a implantação do sistema APPCC tenha influenciado nesses resultados, uma vez que os treinamentos em Boas Práticas de Fabricação realizados no Laticínio foram direcionadas enfaticamente para a produção de queijos moles e para os hábitos de higiene pessoal. Resultados semelhantes foram demonstrados por DESTRO et al. (1996) que verificaram, ao contrário do esperado, que os operadores não foram os principais responsáveis pela disseminação de *Listeria*

*monocytogenes* nos produtos finais ou no ambiente de produção de uma planta de processamento de camarões.

As amostras 198, 200, 201, 212 e 215 demonstraram linhagens de *S. aureus* não relacionadas a nenhum outro microrganismo analisado, sendo todas elas, portanto, consideradas sem fonte de contaminação determinada (TABELA 6).

Dentre essas 5 amostras, 3 delas foram provenientes de leite pasteurizado (amostras 200, 201 e 215), uma de manteiga (198) e uma de queijo minas frescal (212).

Se apenas as amostras de leite pasteurizado forem analisadas, pode-se perceber que as amostras 200 e 201 foram isoladas com um dia de diferença (16/07/97 e 17/07/97 respectivamente), sugerindo serem microrganismos que contaminaram lotes de leite diferentes devido a falha na pasteurização ou na limpeza "CIP" (Cleaning in place) em dois dias consecutivos de produção. O mesmo pode ter ocorrido com a linhagem 215, porém cerca de um ano e três meses mais tarde.

O processamento do leite C pasteurizado não envolve manipulação direta, uma vez que a matéria-prima vai da recepção ao pasteurizador e então à embalagem sempre dentro de tubulações. A limpeza desses equipamentos, com exceção dos tanques da recepção, é realizada por limpeza "CIP", ou seja também não requer contato manual dos operadores, tornando pouco provável a presença de microrganismos de origem humana. Por essas razões, a fonte mais provável de contaminação, apesar de não identificada, parece ser o leite cru.

### 5.18. Comparação Entre a Capacidade de Diferenciação de Linhagens de *Staphylococcus aureus* por PFGE e Perfil de Susceptibilidade a Antimicrobianos

A análise genotípica realizada por Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE) demonstrou maior poder de discriminação entre linhagens que o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos. Como está demonstrado nos itens 5.16 e 5.19., enquanto a susceptibilidade a antimicrobianos diferenciou 4 linhagens de *S. aureus* a partir dos operadores, o PFGE discriminou 18 linhagens. A susceptibilidade a antimicrobianos foi capaz de identificar 7 perfis diferentes entre os 19 *S. aureus* provenientes do leite cru, sendo que o PFGE considerou todos distintos. Do mesmo modo, o PFGE foi capaz de discriminar 9 perfis entre os isolados dos produtos finais, enquanto a susceptibilidade a antimicrobianos só diferenciou 5 perfis.

O índice de discriminação (D) da tipagem por PFGE foi de 0,99, enquanto a tipagem por susceptibilidade a antimicrobianos apresentou  $D=0,81$ . Resultados semelhantes foram demonstrados por LANGE et al. (1999), os quais obtiveram índice de discriminação de 0,96 para a tipagem por PFGE e 0,72 para tipagem por susceptibilidade a antimicrobianos de 66 *S. aureus* isolados do leite cru.

O maior poder de discriminação do PFGE demonstra vantagem sobre métodos menos sensíveis como o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, uma vez que permite identificar com maior precisão a dinâmica de um microrganismo específico ou uma população microbiana dentro de um hospital, uma indústria de alimentos ou qualquer outra área geograficamente limitada. Se apenas os resultados dos antibiogramas fossem considerados, o re-treinamento de operadores poderia ser adotado como ação corretiva para as contaminações dos produtos finais analisados, enquanto

que os resultados advindos do PFGE apontaram o leite cru como o principal responsável pela contaminação dos produtos finais analisados. Com base nesses resultados, o PFGE pode ser muito útil na avaliação das Boas Práticas da Fabricação ou na correta identificação de perigos e pontos críticos de controle no processamento de alimentos.

#### **5.19. Comparação Entre as Linhagens Isoladas e o MRSA-POA**

A presença de linhagens similares ao MRSA-POA (linhagem brasileira epidêmica de *S. aureus* resistente à meticilina isolado de quatro hospitais de Porto Alegre) não foi verificada no Laticínio em estudo, sendo as linhagens isoladas não relacionadas a esse microrganismo. Tais resultados vão ao encontro daqueles visualizados nos antibiogramas, onde nenhum dos isolados demonstrou multi-resistência a mais de três drogas como é costumeiro aos MRSA.

#### **5.20. Ações Corretivas**

Sendo a contaminação cruzada com o leite cru a principal causa identificada de contaminação de produtos finais por *S. aureus* no Laticínio em estudo, as ações corretivas tomadas foram: 1) obstrução (soldagem) de uma porta de acesso da recepção de leite para a sala de produção de queijos moles; 2) maior cuidado com a higiene de pessoal e sanitização de utensílios que circulam entre as recepções de leite cru e as salas de produção.

### 5.21. Contaminação do Produto Final por *Staphylococcus aureus*

Como demonstra a FIGURA 17, progressivamente ao avanço da implantação do plano APPCC houve redução do número de produtos finais contaminados pelo *S. aureus*. Cabe ressaltar que a partir do segundo semestre de 1998, a produção do Laticínio aumentou em aproximadamente 4 vezes, o que certamente tornou mais difícil o controle da qualidade.

Os dados apresentados na FIGURA 17 sugerem que o sistema APPCC foi eficiente na prevenção de contaminação de produtos finais por *S. aureus*, mesmo havendo aumento significativo na produção de lácteos.

As análises apresentadas nesse trabalho contribuíram na elaboração dos fluxogramas de produção, assim como seus respectivos Pontos de Controle – PC (pontos controlados pelas Boas Práticas de Fabricação) e Pontos Críticos de Controle – PCC (pontos não controlados pelas Boas Práticas de Fabricação, mas que necessitam estar sob controle para preservar a segurança do produto) presentes no ANEXO 2.

## 6. CONCLUSÕES

A análise dos resultados desse trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- O leite cru processado pelo Laticínio demonstrou estar contaminado com níveis elevados de mesófilos totais, coliformes, psicrotróficos totais e *S. aureus* tanto em meses frios como em meses de temperaturas mais elevadas.
- A temperatura de 7°C demonstrou ser eficiente no controle do crescimento de mesófilos totais, psicrotróficos totais e *S. aureus*, demonstrando ser adequada para o transporte ou armazenamento do leite por 24 horas.
- As falhas nos procedimentos de limpeza e sanitização de equipamentos e utensílios da coleta do leite foram os principais fatores responsáveis pela elevada contaminação microbiana do leite cru.
- Os procedimentos de limpeza e sanitização de equipamentos e utensílios aplicados no interior do Laticínio demonstraram ser eficientes na remoção de microrganismos. Contudo, resíduos de matéria orgânica, por vezes, permaneceram após esses procedimentos, justificando o emprego de água fervente ou vapor quente antes do uso de superfícies que entrarão em contato direto com o alimento.

- O leite cru e os operadores demonstraram ser fontes potenciais de *S. aureus* no Laticínio investigado, ao contrário dos equipamentos e utensílios onde a presença desse microrganismo não foi evidenciada.
- Grande parte dos *S. aureus* isolados no Laticínio demonstrou ser resistente à penicilina, porém foi sensível à oxacilina, cefalotina, clindamicina, gentamicina, sulfametaxazol/trimetoprim e vancomicina.
- A análise por PFGE demonstrou a ausência de uma única linhagem endêmica, ou linhagem endêmica predominante de *S. aureus*, colonizando os operadores ou leite cru investigados. Ao contrário da susceptibilidade a antimicrobianos, a análise por PFGE demonstrou que, praticamente, cada amostra de leite cru ou manipulador abrigava uma linhagem diferente desse microrganismo.
- A similaridade entre linhagens provenientes do leite cru e de linhagens de *S. aureus* isoladas dos produtos finais sugere a contaminação-cruzada como a principal causa identificada de contaminação dos produtos finais investigados.
- Nenhuma amostra de *S. aureus* isolado do Laticínio apresentou similaridade fenotípica ou genotípica ao MRSA-POA.
- O PFGE demonstrou ser uma ferramenta eficiente na investigação de fontes de contaminação de produtos lácteos por *S. aureus*, na melhoria das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e conseqüentemente, na implantação do sistema APPCC.

- O plano APPCC demonstrou ser eficiente na redução e prevenção da contaminação de produtos finais lácteos por *S. aureus* no Laticínio estudado.

## 7. PERSPECTIVAS

Os experimentos e atividades desenvolvidas nesse trabalho suscitaram as seguintes perspectivas:

- Organização de programa de treinamento em Boas Práticas de Fabricação (BPF) para produtores de leite e implantação de sistema APPCC específico para propriedade rural.
- Implantação de sistema APPCC nos outros setores da Cooperativa.
- Comparação do perfil de susceptibilidade a antibióticos e/ou perfil genômico segundo PFGE de *S. aureus* isolados de leites crus ou de animais com mastite de diferentes regiões do Rio Grande do Sul.
- Comparação dos perfis gerados por PFGE dos *S. aureus* isolados de leite cru ou operadores de laticínios e *S. aureus* envolvidos com intoxicação alimentar transmitidas por produtos lácteos.
- Avaliação genotípica por PFGE mais abrangente sobre a especificidade entre linhagens de *S. aureus* e portadores assintomáticos.
- Avaliação da presença de mais de uma linhagem de *S. aureus* contaminando a nasofaringe de operadores de alimentos.

- Avaliação da presença de linhagens específicas de *S. aureus* no leite cru de determinado laticínio ao longo do ano.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- ADESIYUN, A.A.; WEBB, L.A. ROMAIN, H.T. Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. **Journal Food Protection**, Des Moines, v.61, n.5, p.629-632, 1998.
- AHRABI, S.S.; ERGUVEN, S.; GUNALP, A. Detection of *Listeria* in raw and pasteurized milk. **Cent. European Journal Public Health**, Czech Republic, v.6, n.3, p.254-255, 1998.
- ALTEKRUSE, S.F.; TIMBO, B.B.; MOWBRAY, J.C.; BEAN, N.H.; POTTER, M.E. Cheese-associated outbreaks of humans illness in the United States, 1973 to 1992: sanitary manufacturing practices protect consumers. **Journal Food Protection**, Des Moines, v.61, n.10, p.1405-1407, 1998.
- ALVES, L.M.C.; CORRÊA, M.R. Características microbiológicas do leite "in natura" comercializado no município de São Luis - MA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19., 1997, Rio de Janeiro. **Resumos**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997. Abst: AL-034, p.271.
- BAIRD-PARKER, A.C. Food and microbiological risks. **Microbiology**, New York, v.140, p.687-695, 1994.
- BANNERMAN, T.L.; HANCOCK, G.A.; TENOVER, F.C.; MILLER, M. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.33, n.3, p.551-555, 1995.
- BARROS, V.R.M.; JARDIM, F.S.F.; MACHADO, P.F.; ISHISATO, M.Y.; CUOGOO, M.M.M.M.; COLETE JUNIOR, M. C.C.; SALVADOR, G.J.; NASCIMENTO, N. R. Quebra do paradigma da qualidade do leite C, recebido em uma usina de beneficiamento sob inspeção federal, em Catanduva - SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.65, p.6-9, 1999.
- BAYNES, R.E.; LYMAN, R.; ANDERSON, K.L.; BROWIE, C. F. A preliminary survey of antibiotic residues and viable bacteria in milk from three caribbean basin countries. **Journal Food Protection**, Des Moines, v.62, n.2, p. 177-180, 1999.
- BELKUM, A.V.; LEEUWEN, W.V.; VERKOOYEN, R.; SAÇISIK, S.C.; COKMUS, C.; VERBRUGH, H. Dissemination of a single clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among turkish hospitals. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.35, n.4, p.978-981, 1997.
- BOOR, K.J.; BROWN, D.P.; MURPHY, S.C.; KOZLOWSKI, S.M.; BANDLER, D.K. Microbiological and chemical quality of raw milk in New York state. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.81, p.1743-1748, 1998.

- BRASIL. Portaria nº 1428, de 26 de novembro de 1993. Regulamento técnico para inspeção de alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 02 dez. 1993. Seção 1.
- BRASIL. Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997a. Regulamento técnico princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 182, 22 set. 1997. Seção 1
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Divisão de Normas Técnicas. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. Brasília, 1997b. 239p.
- BRASIL. Portaria nº 46, de 10 de fevereiro de 1998. In: Ponto Crítico (Org.). **Legislação sobre boas práticas de fabricação**. São Paulo, 1999.
- BRANDÃO, S.C. PNQL: a hora de decidir a reestruturação da cadeia do leite. **Indústria de Laticínios**, São Paulo. v.3, n.16, p.20-24, 1998.
- BUCHANAN, R. National advisory committee on microbiological criteria for foods "principles of risk assessment for illnesses caused by foodborne biological agents". **Journal Food Protection**, Des Moines, v.60, n.11, p.1417-1419, 1997.
- CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A., FARIA, M.E.; PENA, E.C. Intoxicação alimentar causada por linhagens enterotoxigênicas de *Staphylococcus aureus* veiculadas por queijo tipo "minas". In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., 1999, Salvador. **Resumos**. Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999. Abst: AL-011, p.347.
- CARVALHO, L.S.; FERREIRA, C.L.L.F.; BRANDÃO, S.C. C.; PARIZZI, F.E.; OLIVEIRA, G.C. Efeito da temperatura de estocagem e da pós-contaminação na qualidade do leite pasteurizado. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v.2, n.12, p.69-73, 1997.
- CLIVER, D.O. **Foodborne disease**. London: Academic Press, 1990. 395p.
- COSTA NETO, P.L.O. **Estatística**. 15.ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1997.
- CONFEDERAÇÃO NACIONAL DE AGRICULTURA (CNA). **Súmula da reunião da comissão nacional de pecuária de leite - CNPL**. Brasília: CNA, 1998. 4fls.
- CONIL. Propostas da iniciativa privada para a modernização do setor. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v.4, n.20, p.13, 1999.
- DE LENCASTRE, H.; COUTO, I.; SANTOS, I.; MELO-CRISTINO, J.; TORRES-PEREIRA, A.; TOMASZ, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in a portuguese hospital: characterization of clonal types by a combination of DNA typing methods. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Wiesbaden, NE, v.13, n.1, p.64-73, 1994.

- DE LENCASTRE, H.; DE LENCASTRE, A.; TOMASZ, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered from a New York city hospital: analysis by molecular fingerprinting techniques. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.34, n.9, p.2121-2124, 1996.
- DESTRO, M.T.; LEITÃO, M.F.F.; FARBER, J.M. 1996. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.2, p.705-711, 1996.
- DIAS, R.S.; LAURIA-FILGUEIRA, A.L.; SILVA, M.C.C.; PENA, E.C.; FARIA, M.E.; SANTOS, D.A.; SENA, M.J.; CARMO, L.S. Perfil microbiológico de leite *in natura* comercializados em alguns municípios mineiros - (resultados parciais). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., Salvador. **Resumos**. Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999. Abst: AL-023, p.350.
- DODD, C.E.R. The application of molecular typing techniques to HACCP. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.5, p.160-164, 1994.
- DOMINGUEZ, M.A.; DE LENCASTRE, H. LINARES, J.; TOMASZ, A. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a spanish hospital. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.9, p.2081-2087, 1994.
- EDMISTON, A.L.; RUSSEL, S.C. Evaluation of conductance method for enumerating *Escherichia coli* on chicken, pork, fish, beef, and milk. **Journal Food Protection**, Des Moines, v.62, n.11, p.1260-1265, 1999.
- FAGUNDES, C.M. **Inibidores e controle de qualidade do leite**. Pelotas: Editora Universitária/UFPel, 1997.
- FARBER, J.M. An introduction to the hows and whys of molecular typing. **Journal Food Protection**, Des Moines, v.59, n.10, p.1091-1101, 1996.
- FONSECA, L.F.L. Leite a granel: modelo moderno de estocagem e transporte. **Leite & Derivados**, São Paulo, n.40, p.6-22, 1998.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bacteriological analytical manual**. 7.ed. Airlington: AOAC International, 1992. 529p.
- FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.
- GALLINA, D.A.; FARIA, J.E.; FERREIRA, C.L.F.; BRANDÃO, S.C.C. Resíduos inibidores no leite de vacas tratadas com antibióticos. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v.3, n.15, p.70-79, 1998.

- GELLI, D.S.; RIBEIRO, E.G.A.; PACHECO, M.R.; FREITAS, A.M.; ESPER, M.R.; PISANI, B.; ROCHA, M.M.M.; TANAKA, A.Y.; CASTRO, M.T.F.; KAKU, M. Termorresistência e sensibilidade a antibióticos e quimioterápicos de cepas de *S. aureus* isolados de materiais envolvidos em intoxicação por enterotoxina estafilocócica, no estado de São Paulo. **Boletim Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.10, p.23-34, 1992.
- GRUETZMECHER, T.J.; BRADLEY JR., R.L. Identification and control of processing variables that affect the quality and safety of fluid milk. **Journal Food Protection**, Des Moines, v.62, n.6, p.625-631, 1999.
- GUILDRIY, A.; FATTON, A.; PATEL, A.; O'BREIN, C.; SHEPHERD, S.; LOHUIS, J. Serotyping scheme for *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. **American Journal Veterinary Research**, Chicago, v.59, n.12, p.1537-1539, 1998.
- GUTERBOCK, W.M. Reducing antibiotic use in the treatment of clinical mastitis. **Veterinary Medicine**, Chicago, p.1229-1234, 1992. Symposium on antibiotic residues.
- HAJDENWURCEL, J.R. Análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) na indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, n. 300, p.39-50, 1997a.
- HAJDENWURCEL, J.R. HACCP- Análise de perigos e pontos críticos de controle na indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, n.300, p.51-53, 1997b.
- HEEMAN, O. Reunião para planejamento de diretrizes a serem adotadas pela comissão nacional de pecuária e leite - CNPL. Porto Alegre: FARSUL., 22 set. 1998. Comunicação verbal.
- HOEFNAGELS-SCHUERMANS, A.; PEETERMANS, W.E.; STRUELENS, M.J.; VAN LIERDE, S.; VAN ELDERE, J. Clonal analysis and identification of epidemic strains of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antibiotyping and determination of protein A gene and coagulase gene polymorphisms. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.35, n.10, p.2514-2520, 1997.
- HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numerical index of discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.26, n.10, p.2465-2466, 1988.
- INTERNATIONAL ASSOCIATION OF MILK, FOOD AND ENVIRONMENTAL SANITARIANS (IAMFES). **Guia de procedimentos para implantação do método de análises de perigos e pontos críticos de controle APPCC HACCP**. São Paulo, Ponto Crítico Consultoria em Alimentação, 1991. 110p.
- INTERNATIONAL DAIRY FOODS ASSOCIATION (IDFA). **Dairy products safety system**. Washington: International Dairy Foods Association, 1996. 163p.

- JANK, M.S. Subsídios ao leite na União Européia. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v.4, n.21, p.13, 1999.
- JANK, M.S.; GALAN, V.B. Competitividade do sistema agroindustrial do leite. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v.2, n.12, p.48-55, 1997.
- JARET, P. The antibiotic crisis. **Hippocrates**, v.12, n.11, p.26-33, 1998. Disponível na Internet. <http://www.medscape.com/time/hippocrates>
- JASSIM, S.A.A.; DENYER, S.P. Coagulase-negative *Staphylococci*: useful organism or potential problem for food processing?. **Food Quality**, Barking, Apr, p.31-35, 1997.
- JAY, J. **Modern food microbiology**. 5.ed. New York: Chapman & Hall, 1996. 661p.
- JERMINI, M.; BRYAN, F.L.; SCHIMITT, R.; MWANDWE, C.; MWENYA, J.; ZYUULU, M.H.; CHILUFYA, E.N.; MATOBA, A.; HAKALIMA, A.T.; MICHAEL, M. Hazards and critical control points of food vending operations in a city in Zambia. **Journal Food Protection**, Des Moines, v.60, n.3, p.288-299, 1997.
- KLUYTMANS, J.; LEEUWEN, W.V.; GOESSENS, W.; HOLLIS, R.; MESSER, S.; HERWALDT, L.; BRUINING, H.; HECK, M.; ROST, J.; LEEUWEN, N.V.; BELKUM, A.V. VERBRUGH, H. Food-initiated outbreak of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno-and genotyping. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.33, n.5, p.1121-1128, 1995.
- KUAYE, A.Y. Análise de perigos e pontos críticos de controle - garantia e controle de qualidade no processamento de alimentos. **Boletim SBCTA**, Campinas, v.29, n.2, p.151-154, 1995.
- KUMARI, D.N.P.; KEER, V.; HAWKEY, M.; PARNELL, P.; JOSEPH, N.; RICHARDSON, J.F.; COOKSON, B. Comparison and application of ribosome spacer DNA amplicon polymorfisms and pulsed-field gel eletrophoresis for differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.35, n.4, p.881-885, 1997.
- LABORATORY MERCK CUSTOMER SERVICE DEPARTMENT. **Mercury award for hy-lite**. Frankfurter, [199?]. Paginação irregular.
- LANGE, C.; CARDOSO, M.; PIANTA, C. Epidemiological characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brazil). **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.28, p.215-219, 1997.
- LANGE, C.; CARDOSO, M.; SENCZEK, D.; SCHWARZ, S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.67, p.127-141, 1999.
- LARANJA, L.F. A necessidade de incremento de produtividade. **Leite & Derivados**, São Paulo, n 35, p.40-50, 1997.

- LEITÃO, M.F.F. **Análise de perigos e pontos críticos de controle na indústria de alimentos**. São Bernardo do Campo: Prefeitura Municipal, 1993. 11p.
- LEITÃO, M.F.F. Análise de perigos e pontos críticos de controle - APPCC: avaliação de aspectos controvertidos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, n.300, p.32-35, 1997.
- LEITE, R.L.; CARVALHO, E.P.; DIONÍZIO, F.L.; MOURA, C.J. TEIXEIRA, L.A.M. Influência do leite proveniente de vacas mamáticas na elaboração de queijos minas frescal e minas padrão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., 1999, Salvador. **Resumos**. Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999. Abst: AL-042, p.355.
- LEMAITRE, N.; SOUGAKOFF, W.; MASMOUDI, A.; FIEVET, M.H.; BISMUTH, R.; JARLIER, V. Characterization of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involved in nosocomial spread. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.36, n.1, p.81-85, 1998.
- LIN, S.; SCHRAFT, H.; ODUMERU, J.A.; GRIFFITHS, M.W. Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v.43, n.3, p.159-71, 1998.
- LOGUERCIO, A.P.; ALEIXO, J.A.G. Qualidade microbiológica do leite não inspecionado comercializado em Cuiabá - MT. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., 1999, Salvador. **Resumos**. Salvador, Sociedade Brasileira de Microbiologia. Abst: AL-089, p.367.
- MANIE, T.; BRÖZEL, V.S.; VEITH, W.J.; GOUWS, P. Antimicrobial resistance of bacterial flora associated with bovine products in south Africa. **Journal Food Protection**, Des Moines, v.62, n.6, p.615-618, 1999.
- MATTHEWS, K.R.; ROBERSON, J.; GILLESPIE, B.E.; LUTHER, D.A.; OLIVER, S.P. Identification and differentiation of coagulase-negative *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 60, p.686-688, 1997.
- MATUSHEK, M.G.; BONTEN, M.M.; HAYDEN, M.K. Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel eletroforesis. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.34, p.2598-2600, 1996.
- McCULLAGH, J.J.; McNAMEE, P.T.; SMYTH, J.A.; BALL, H.J. The use of pulsed field gel eletrophoresis to investigate the epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in commercial broiler flocks. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.63: 275-281, 1998.
- McNAB, W.B. A general framework illustrating na approach to quantitative microbial food safety risk assessment. **Journal Food Protection**, Des Moines, v.61, n.9, p.1216-1228, 1998.

- MIETTINEN, M.K.; BJORKROTH, K.J.; KORKEALA, H.J. Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal Food Microbiol**, Amsterdam, v. 46, n.3, p.187-192, 1999.
- MILLES, A.A.L.; MISRA, S.S. The estimation of bacterial power of blood. **Journal of Hygiene**, Cambridge, v.38, p.732-749, 1938.
- MORTLOCK, M.; PETERS, A.C.; GRIFFITH, C.J. Food Hygiene and hazard analysis critical control point in the United Kingdom food industry: practices, perceptions, and attitudes. **Journal Food Protection**, Des Moines, v.62, n.7, p.786-792, 1999.
- MOSSEL, D.A.A.; GARCIA, B.M. **Microbiologia de los alimentos: fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993. 375p.
- NACMCF. Hazard analysis and critical control point principles and application guidelines. **Journal Food Protection**, Des Moines, v.61, n.9, p.1246-1259. 1998.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Approved standard M100-S10. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2000.
- NA'WAS, T.; HAWWARI, A.; HENDRIX, E.; HEBDEN, J.; EDELMAN, R.; MARTIN, M.; CAMPBELL, W.; NASO, R. SCHWALBE, R.; FATTOM, A.I. Phenotypic and genotypic characterization of nosocomial *Staphylococcus aureus* isolates from trauma patients. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n.2, p.414-420, 1998.
- NOVA Legislação de produtos lácteos e de alimentos para fins especiais, diet, light e enriquecidos. Comentada por Alda Luiza Santos Lerayer et al. São Paulo: Fonte Comunicações, 1998. Cap.4: Leites.
- NUSSINOVITCH, A.; CURASSO, Y.; PELEG, M. Analysis of the fluctuating microbial counts in commercial raw milk-a case study. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.63, n.9, p.1240-1247, 2000.
- OLIVEIRA, M.V.P. HACCP: aprendizagem para um sistema de qualidade assegurada em alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, n.300, p.17-21, 1997.
- OLIVEIRA, C.A.F. Métodos rápidos para análise de resíduos de antibióticos no leite. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v.3, n.13, p.75-79, 1998.
- OLIVEIRA, C.A.F.; GERMANO, P.M.L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13 n.62, p.10-16, 1999a.

- OLIVEIRA, G.A.; DELL'AQUILA, A.M.; GOMES, M.S.; MASIERO, R.L. DIAS, M. A.E.; FEDELI, L.H. C.; LEVY, C.E.; MAMIZUKA, E.M. Isolamento de populações heterogêneas de *Staphylococcus aureus* que apresentam sensibilidade intermediária à vancomicina (hetero-VISA) no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20, 1999, Salvador. **Resumos**. Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999b. Abst: MH 222, p.106.
- PANETTA, J.C. Análise de risco por pontos críticos de controle: uma visão crítica. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, n.300, p.36-38, 1997.
- PAÍSES reorganizam a produção e o mercado de laticínios. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v.4, n.20, p.16-22, 1999.
- PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. **Higiene, ciência e tecnologia de carnes**. Goiânia: Editora Universitária, 1995. p.329-338.
- PIRTTIJARVI, T.S.; AHONEN, L.M.; MAUNUKSELA, L.M. SALKINOJA-SALONEN, M.S. *Bacillus cereus* in a whey process. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v.44, n.1-2, p.31-41, 1998.
- PRESCOTT, L.M.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. **Microbiology**. 3.ed. Dubuque: IA. Wm. C. Brown Publishers, 1996. p.441.
- RAIMUNDO, O.; DEIGHTON, M.; CAPSTICK, J.; GERRATY, N. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymorphisms of the coagulase gene. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.66, p.275-284, 1999.
- RALYEA, R.D.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. Bacterial tracking in a dairy production system using phenotypic and ribotyping methods. **Journal Food Protection**, Des Moines, v.61, n.10, p.1336-1340, 1998.
- RIJPENS, N.; HERMAN, L.; VEREECKEN, F.; JANNES, G., DE SMEDT, J.; DE ZUTTER, L. Rapid detection of stressed *Salmonella* spp. in dairy and egg products using immunomagnetic separation and PCR. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v.46, p.37-44, 1999.
- RIO GRANDE DO SUL. Secretaria de Saúde e do meio Ambiente. Divisão de Vigilância Sanitária. **Relatório anuais de ETA: 1987-1998**. Porto Alegre, 1998, não paginada.
- ROBBS, P.G.O. O que está acontecendo com a segurança de nossos alimentos? **Leite & Derivados**, São Paulo, v.8, n.47, p.28-30, 1999.
- SABIONI, J.C.; NASCIMENTO, D.; PEREIRA, J. L. Intoxicação estafilocócica causada por queijo tipo minas em Ouro Preto (MG), 1992. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.8, n.33; p.22-23, 1994.
- SANTOS, J.A. HACCP é garantia de qualidade. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v.1, n.3, p.16-20, 1996.

- SCHAECHTER, M.; MEDOFF, G.; EISENSTEIN, B.I. **Mechanisms of microbial disease**. 2.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993. p.189.
- SCHMITT, R.; BRYAN, F.L.; JERMINI, M.; CHILUFYA, E.N.; HAKALIMA, A.T.; ZYUULU, M.; MFUME, E.; MWANDWE, C.; MULLUNGUSHI, E.; LUBASI, D. Hazard and critical control points of food preparation in homes in which persons had diarrhea in Zambia. **Journal Food Protection**, Des Moines, v.60, n.2, p. 161-171, 1997.
- SENNA, J.; CHACHATY, E.; SAULNIER, P.; ESPAZE, E.; BARBIER, N.; LECLERCQ, B. RICHEL, H.; ANDREMONT, A. Molecular characterization of sporadic and epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in 3 french hospitals. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON STAPHYLOCOCCI AND STAPHYLOCOCCAL INFECTIONS, 8., 1996, Aix-Les/Bains. **Program and abstracts**. Aix-Les/Bains, France: Société Française de Microbiologie, 1996. Abstr. 285. p. 260
- SILVA Jr., E.A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1995. 347p.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997. 295p.
- SILVA, W.P. **Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite de vacas com mastite subclínica e de outras fontes em propriedades produtoras de leite**. São Paulo: USP, 1998. 88 fls. Tese (Doutorado). Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo-USP, São Paulo, 1998.
- SMELTZER, M.; GILLASPY, A.F.; PRATT, F.L.; THAMES, M.D. Comparative evaluation of use of *cna*, *fnbA*, *fnbB*, and *hly* for genomic fingerprinting in the epidemiological typing of *Staphylococcus aureus*. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.35, n.10, p.2444-2449, 1997.
- SOARES, J.; BENITEZ, L.B.; TERRA, N.N. Análise de pontos críticos no abate de frangos através da utilização de indicadores microbiológicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., 1999, Salvador. **Resumos**. Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999. Abst: AL-052, p.357.
- SOARES, M.J.S.; TOKUMARU-MIYAZAKI, N.H.; NOLETO, A.L.S.; FIGUEIREDO, M.S. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* clones and detection of brazilian epidemic MRSA clone (III::B:A) among isolates from food handlers. **Journal of Medical Microbiology**, Essex, v.46, p.214-221, 1997
- SOUZA, J.M.; OLIVEIRA, S.S.; CARMO, L.S. SENA, M.J. Isolamento de *Staphylococcus aureus* e detecção de enterotoxinas estafilocócicas de alimentos envolvidos em surto de toxinfecção alimentar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., 1999, Salvador. **Resumos**. Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999. Abst: AL-031, p.352.

- SPECK, M.L. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 2 ed. Washington: American Public Health Association, 1976. 702 p.
- TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.33, p.2233-2239, 1995.
- UDO, E.E.; AL-OBAID, I.A.; JACOB, L.E.; CHUGH, T.D. Molecular characterization of epidemic ciprofloxacin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains colonizing patients in an intensive care unit. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.34, p.3242-3244, 1996.
- WALKER, J.; BORROW, R.; EDWARDS-JONES, V.; OPPENHEIM, B.A. Epidemiological characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in the North West of England by protein A (*spa*) and coagulase (*coa*) gene polymorphisms. **Epidemiology Infectious**, Cambridge, v.21, p.507-514, 1998.
- WENDPAP, L.L.; ROSA, O.O. Presença de *Staphylococcus aureus* em queijos minas consumido no município de Cuiabá-MT. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.7, n. 27, p.23-29, 1993.
- WILKINSON, J. Países reorganizam a produção e o mercado de laticínios. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v.4, n.20, p.16-22, 1999.
- YOSHIDA, T.; KATO, Y.; SATO.; HIRAI. K. Sources and routes of contamination of raw milk with *Listeria monocytogenes* and its control. **Journal Veterinary Science**, v.60, n.10, p.1165-1168, 1998.
- ZENG, S.S.; HART, S.; ESCOBAR, E.N.; TESFAI, K. Validation of antibiotic residue tests for dairy goats. **Journal Food Protection**, Des Moines, v.61, n.3, p.344-349, 1998.

## 9. RESUMO

Em vista do desenvolvimento apresentado pelo mercado laticínista brasileiro e dos riscos que envolvem o consumo de produtos lácteos, o controle de qualidade em nível de campo ou industrial devem ser rigorosos. Baseado nestes pressupostos, o presente trabalho objetivou investigar as fontes de contaminação microbiológicas em um laticínio, a fim de identificar falhas operacionais e pontos críticos de controle ao longo do processo produtivo. Durante um período de 2,5 anos, foram realizadas análises microbiológicas do leite cru, avaliação dos procedimentos de limpeza e sanitização de equipamentos e utensílios, assim como um estudo, utilizando técnicas fenotípicas e genotípicas, sobre a presença e disseminação do *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) entre matéria prima, operadores, ambiente de produção, e produtos finais.

Os resultados das 550 análises de leite cru demonstraram níveis elevados de contaminação por mesófilos totais, psicotróficos totais, coliformes e *S. aureus*, sendo as falhas dos procedimentos de limpeza de equipamentos da ordenha e transporte os principais responsáveis pela presença desses microrganismos no leite. Ao contrário do esperado inicialmente, o resfriamento do leite cru na propriedade rural e transporte não foi suficiente para manter níveis baixos de contaminação microbiológica. Por outro lado, os procedimentos de limpeza e sanitização de equipamentos e utensílios realizados dentro da indústria demonstraram ser adequados, não sendo caracterizados como fontes de contaminação.

A presença de *S. aureus* foi constatada em 35,29% dos operadores e em 90,48% das amostras do leite cru, sugerindo a necessidade de cuidados quanto a manipulação de alimentos e controle da contaminação cruzada. Dentre as mais de 3200 amostras de produtos finais investigadas, apenas 10 apresentaram *S. aureus*, sugerindo procedimentos corretos de processamento.

As análises por susceptibilidade a antimicrobianos e genotipagem por PFGE demonstraram ampla variedade de linhagens de *S. aureus* no leite cru e operadores, sendo que não foram identificadas linhagens endêmicas predominantes entre eles.

A genotipagem por PFGE demonstrou ser mais eficiente que a susceptibilidade a antimicrobianos na investigação das prováveis fontes de contaminação de produtos finais. Essas análises sugeriram a contaminação cruzada com o leite cru como a principal causa de contaminação por *S. aureus* dos produtos finais analisados, justificando a utilização de métodos moleculares na implantação de sistemas de qualidade como o APPCC.

## 10. ABSTRACT

Due to the development of the Brazilian dairy industry, and the risks concerning the consumption of dairy products, control of quality from farm to plant should be rigorous. The aims of this work were to investigate sources of microbiological contamination in a dairy plant, with the purpose to identify failures in the procedures and critical control points in the milk processing.

During a period of 2.5 years, microbiological analysis of the raw milk and evaluation of the cleansing procedures were performed. The presence and dissemination of *S. aureus* in personnel, raw milk, equipment, and final products were also investigated, using phenotyping and genotyping techniques.

Contrary to what was initially thought, the cooling of milk in farm and during transportation was not sufficient to maintain low levels of microbiological contamination. The results of 550 analysis of raw milk samples indicated high levels of mesophilic, psychrotrophics, coliforms, and *S. aureus* contaminating the milk, being failures in cleansing of collecting equipment the responsible for it. On the other hand, the cleansing procedures performed in plant were considered adequate to microbiological reduction.

The presence of *S. aureus* were verified in 35.29% of personnel and in 90.48% of raw milk samples, and the susceptibility to antibiotics and PFGE analysis showed high diversity among these strains, suggesting the necessity of control in food manipulation and cross contamination. Such analysis also showed the lack of a predominant endemic strain colonising the food handlers. Among more than 3200 final products analysed, only 10 presented contamination by *S. aureus*, demonstrating good processing procedures.

The PFGE proved to be more efficient than susceptibility to antibiotics in order to investigate the probable sources of final products contamination. This analysis suggested the cross contamination with raw milk as the principal cause of final products contamination by *S. aureus*, justifying the utilisation of molecular techniques during implantation of control systems, as HACCP, in the dairy products plants.

## ANEXO 1

### Análises Estatísticas

#### 1) Tamanho das amostragens

Fórmula utilizada:

$$n \geq \left( t_{n'-1, \alpha/2} \times \frac{\sigma}{e_0} \right)^2 \quad \alpha = 95\%$$

Onde:

t = função estatística vinda da tabela t - Student

$e_0$  = semi-amplitude do intervalo de confiança (MATLAB versão 5.3)

$\sigma$  = Desvio padrão da população piloto

$\alpha$  = nível de significância

$n'$  = população piloto (número de amostras)

$n' - 1$  = graus de liberdade

#### Contagem de microrganismos mesófilos totais em leite cru:

$$\sigma = 7,74 \times 10^6 \text{ UFC/mL}$$

$$e_0 = 1,3385 \times 10^6 \text{ (MATLAB versão 5.3)}$$

$$n = 100$$

$$n \geq 93$$

#### Contagem de coliformes totais e presença de *Escherichia coli* em leite cru:

$$\sigma = 5,57 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$$

$$e_0 = 1,0441 \times 10^5 \text{ (MATLAB versão 5.3)}$$

$$n = 100$$

$$n \geq 79$$

**Contagem de *Staphylococcus aureus* no leite cru:**

$$\begin{aligned}\sigma &= 4,32 \times 10^3 \text{ UFC/mL} \\ e_0 &= 1,25485 \times 10^3 \text{ (MATLAB versão 5.3)} \\ n &= 50\end{aligned}$$

$$n \geq 34$$

**Contagem por mesófilos totais em leite cru resfriado:**

$$\begin{aligned}\sigma &= 5,12 \times 10^6 \text{ UFC/mL} \\ e_0 &= 0,9324 \times 10^6 \text{ (MATLAB versão 5.3)} \\ n &= 100\end{aligned}$$

$$n \geq 84$$

**Contagem de coliformes totais e presença de *Escherichia coli* em leite cru resfriado:**

$$\begin{aligned}\sigma &= 8,78 \times 10^5 \text{ UFC/mL} \\ e_0 &= 1,8295 \times 10^5 \text{ (MATLAB versão 5.3)} \\ n &= 100\end{aligned}$$

$$n \geq 64$$

**Contagem de microrganismos psicotróficos totais em leite cru resfriado:**

$$\begin{aligned}\sigma &= 3,39 \times 10^6 \text{ UFC/mL} \\ e_0 &= 0,60625 \times 10^6 \text{ (MATLAB versão 5.3)} \\ n &= 100\end{aligned}$$

$$n \geq 87$$

**Limpeza de superfícies de bancadas, equipamentos e utensílios:**

$$\begin{aligned}\sigma &= 6,12 \times 10^3 \text{ UFC/mL} \\ e_0 &= 1,62465 \times 10^3 \text{ (MATLAB versão 5.3)} \\ n &= 50\end{aligned}$$

$$n \geq 40$$

**Sanitização de superfícies de bancadas, equipamentos e utensílios:**

$$\sigma = 0$$

$$n' = 25$$

$$n \geq 3$$

**2) Comparação entre duas médias****Teste de hipóteses para diferença entre duas médias com desvios-padrão da população desconhecido:**

Método Aspin-welch (COSTA NETO, 1997):

$v$  = graus de liberdade para cálculo do valor de **t crítico** (tabela Student)  
 $\alpha$  = nível de significância (95%)

$$v = \frac{(w_1 + w_2)^2}{w_1^2/(n_1 + 1) + w_2^2/(n_2 + 1)} - 2$$

Onde  $w_1$  e  $w_2$  são calculados por:

$$W_1 = \sigma_1^2/n_1 \quad W_2 = \sigma_2^2/n_2$$

O valor **t calculado** é:

$$t \text{ (calculado)} = \frac{\mu_1 - \mu_2}{(W_1 + W_2)^{1/2}}$$

Hipóteses testadas:

$t \text{ (calculado)} \leq t \text{ crítico}$ , aceita-se  $H_0 \Rightarrow \mu_1 = \mu_2$  (Médias Iguais)

$t \text{ (calculado)} \geq t \text{ crítico}$ , aceita-se  $H_1 \Rightarrow \mu_1 > \mu_2$  (Médias Diferentes)

**Mesófilos totais em leite cru resfriado e à temperatura ambiente:**Leite cru ( $\mu_1 = 9,89 \times 10^6$ )Leite cru resfriado ( $\mu_2 = 4,78 \times 10^6$ ) $W_1 = 5,99 \times 10^{11}$  $W_2 = 2,62 \times 10^{11}$  $v = 174$  $t_{\text{crítico}} = 1,6537$  $t(\text{testado}) = 5,5060$  logo,  $t(\text{testado}) > t_{\text{crítico}}$ **Com nível de significância de 95%, aceita-se  $H_1$ , ou seja médias consideradas diferentes.****Coliformes totais em leite cru resfriado e à temperatura ambiente:**Leite cru ( $\mu_1 = 6,4 \times 10^5$ )Leite cru resfriado ( $\mu_2 = 5,54 \times 10^5$ ) $W_1 = 3,10249 \times 10^9$  $W_2 = 7,70884 \times 10^9$  $v = 169$  $t_{\text{crítico}} = 1,6539$  $t(\text{testado}) = 0,8271017$  logo,  $t(\text{testado}) < t_{\text{crítico}}$ **Com nível de significância de 95%, aceita-se  $H_0$ , ou seja, médias consideradas iguais.****Determinação Numérica do Índice de Discriminação (D):**

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{n=1}^s n_j(n_j-1)$$

Onde:

 $s$  = número total de linhagens diferentes. $n_j$  = número de isolados de cada linhagem. $N$  = número total de isolados dentro da população.

**Tipagem por Susceptibilidade a Antimicrobianos:**

Perfil	$n_j(n_j-1)$
A	14 (13) = 182
B	13 (12) = 156
C	6 (5) = 30
D	6 (5) = 30
E	5 (4) = 20
F	3 (2) = 6
G	1 (0) = 0

$$D = 1 - \frac{1}{48(47)} \times \Sigma$$

$$\Sigma = 182 + 156 + 30 + 30 + 20 + 6 = 423$$

$$D = 1 - 423/2256 = 0,81$$

**Tipagem por PFGE:**

Perfil (amostras)	$n_j(n_j-1)$
1 (117 e 197)	2 (1) = 2
2 (26, 105 e 213)	3 (2) = 6
3 (214 e 216)	2 (1) = 2
4 (6, 27 e 199)	3 (2) = 6
5 (todas demais)	1 (0) = 0

$$D = 1 - \frac{1}{48(47)} \times \Sigma$$

$$\Sigma = 6 + 2 + 6 + 2 = 16$$

$$D = 16/2256 = 0,99$$

## ANEXO 2

## Fluxogramas de Produção

## Leite Pasteurizado

ETAPA	PC/ PCC	MEDIDA DE CONTROLE
Ordenha	PC	(Limpeza de utensílios)
↓		
Resfriamento	PC	(Limpeza dos resfriadores, temperatura)
↓		
Transporte	PC	(Limpeza dos tanques e temperatura)
↓		
Recepção na usina	PCC	(Acidez, antibióticos, temperatura)
↓		
Filtração		
↓		
Resfriamento/estocagem	PC	(Temperatura)
↓		
Clarificação por centrifugação		
↓		
Padronização		
↓		
Pasteurização	PCC	(Tempo x Temperatura)
↓		
Estocagem	PCC	(Temperatura)
↓		
Envase	PC	(Higiene das embalagens)
↓		
Estocagem	PCC	(Temperatura, análises Microbiológicas)
↓		
Expedição		
↓		
Transporte	PCC	(Temperatura)
↓		
Mercado	PCC	(Temperatura)

**Leite esterilizado - UHT**

<b>ETAPA</b>	<b>PC/ PCC</b>	<b>MEDIDA DE CONTROLE</b>
<b>Ordenha</b>	PC	(Limpeza de utensílios)
↓		
<b>Resfriamento</b>	PC	(Limpeza dos resfriadores, temperatura)
↓		
<b>Transporte</b>	PC	(Limpeza dos tanques e temperatura)
↓		
<b>Recepção na usina</b>	PCC	(Acidez, antibióticos, temperatura)
↓		
<b>Filtração</b>		
↓		
<b>Resfriamento/estocagem</b>	PC	(Temperatura)
↓		
<b>Clarificação por centrifugação</b>		
↓		
<b>Padronização</b>		
↓		
<b>Pasteurização</b>	PCC	(Tempo x Temperatura)
↓		
<b>Homogeneização</b>		
↓		
<b>Esterilização</b>	PCC	(Tempo x Temperatura)
↓		
<b>Envase</b>	PC	(Higiene das embalagens)
↓		
<b>Expedição</b>		
↓		
<b>Transporte</b>	PCC	(Temperatura)
↓		
<b>Mercado</b>	PCC	(Temperatura)

**Iogurte com polpa de fruta**

	<b>ETAPA</b>	<b>PC/PCC</b>	<b>MEDIDA DE CONTROLE</b>
	<b>Ordenha</b>	PC	(Limpeza de utensílios)
	↓		
	<b>Resfriamento</b>	PC	(Limpeza dos resfriadores, temperatura)
	↓		
	<b>Transporte</b>	PC	(Limpeza dos tanques e temperatura)
	↓		
	<b>Recepção na usina</b>	PCC	(Acidez, antibióticos, temperatura)
	↓		
	<b>Filtração</b>		
	↓		
	<b>Resfriamento/estocagem</b>	PC	(Temperatura)
	↓		
	<b>Clarificação por centrifugação</b>		
	↓		
	<b>Padronização</b>		
	↓		
<b>Leite em pó → açúcar</b>	<b>Mistura</b>	PCC	(Laudo do fornecedor do leite em pó e açúcar)
	↓		
	<b>Pasteurização</b>	PCC	(Tempo x Temperatura)
	↓		
	<b>Resfriamento a 42°C</b>		
	↓		
	<b>Adição do fermento</b>		
	↓		
	<b>Fermentação</b>	PCC	(Controle da acidez final e temperatura)
	↓		
<b>Polpa de fruta → pasteurizada</b>	<b>Adição da polpa de fruta</b>		
	↓		
	<b>Embalagem</b>	PC	(Higiene das embalagens)
	↓		
	<b>Estocagem</b>	PCC	(Temperatura, Integridade da embalagem)
	↓		
	<b>Transporte</b>	PCC	(Temperatura)
	↓		
	<b>Mercado</b>	PCC	(Temperatura)

## Creme de Leite

<b>ETAPA</b>	<b>PC/ PCC</b>	<b>MEDIDA DE CONTROLE</b>
<b>Ordenha</b>	PC	(Limpeza de utensílios)
↓		
<b>Resfriamento</b>	PC	(Limpeza dos resfriadores, temperatura)
↓		
<b>Transporte</b>	PC	(Limpeza dos tanques e temperatura)
↓		
<b>Recepção na usina</b>	PCC	(Acidez, antibióticos, temperatura)
↓		
<b>Filtração</b>		
↓		
<b>Resfriamento/estocagem</b>	PC	(Temperatura)
↓		
<b>Clarificação por centrifugação</b>		
↓		
<b>Padronização</b>		
↓		
<b>Pasteurização</b>	PCC	(Tempo x Temperatura)
↓		
<b>Envase</b>	PC	(Higiene dos vasilhames)
↓		
<b>Estocagem</b>	PCC	(Temperatura)
↓		
<b>Expedição</b>		
↓		
<b>Transporte</b>	PCC	(Temperatura)
↓		
<b>Mercado</b>	PCC	(Temperatura)

**Queijo Minas Frescal**

	<b>ETAPA</b>	<b>PC/ PCC</b>	<b>MEDIDA DE CONTROLE</b>
	<b>Ordenha</b>	PC	(Limpeza de utensílios)
	↓		
	<b>Resfriamento</b>	PC	(Limpeza dos resfriadores, temperatura)
	↓		
	<b>Transporte</b>	PC	(Limpeza dos tanques e temperatura)
	↓		
	<b>Recepção na usina</b>	PCC	(Acidez, antibióticos, temperatura)
	↓		
	<b>Filtração</b>		
	↓		
	<b>Resfriamento/estocagem</b>	PC	(Temperatura)
	↓		
	<b>Clarificação/centrifugação</b>		
	↓		
	<b>Padronização</b>		
	↓		
	<b>Pasteurização</b>	PCC	(Tempo x temperatura)
	↓		
<b>Coalho, Fermento</b>	<b>Mistura de ingredientes</b>	PCC	(Laudo do fornecedor do coalho, fermento láctico)
<b>Lático, Cloreto de cálcio →</b>	↓		
	<b>Coagulação</b>	PC	(Higiene operador, tanque e utensílios)
	↓		
	<b>Corte</b>	PC	(Higiene operador, tanque e utensílios)
	↓		
	<b>Retirada do soro</b>	PC	(Higiene operador, tanque e utensílios)
	↓		
	<b>Enformagem</b>	PC	(Higiene operador, tanque e utensílios)
	↓		
	<b>Viragem</b>	PC	(Higiene operador, tanque e utensílios)
	↓		
	<b>Dessoramento</b>	PC	(Higiene operador, tanque e utensílios)
	↓		
	<b>Salga</b>	PC	(Higiene operador, tanque e utensílios)
	↓		
	<b>Embalagem</b>	PC	(Higiene da embalagem)
	↓		
	<b>Estocagem</b>	PCC	(Temperatura)
	↓		
	<b>Transporte</b>	PCC	(Temperatura)
	↓		
	<b>Mercado</b>	PCC	(Temperatura)

**Queijo Prato**

ETAPA	PC/ PCC	MEDIDA DE CONTROLE
Ordenha	PC	(Limpeza de utensílios)
↓		
Resfriamento	PC	(Limpeza dos resfriadores, temperatura)
↓		
Transporte	PC	(Limpeza dos tanques e temperatura)
↓		
Recepção na usina	PCC	(Acidez, antibióticos, temperatura)
↓		
Filtração		
↓		
Resfriamento/estocagem	PC	(Temperatura)
↓		
Clarificação/centrifugação		
↓		
Padronização		
↓		
Pasteurização	PCC	(Tempo x temperatura)
↓		
Mistura de ingredientes	PCC	(Laudo do fornecedor do coalho, fermento láctico)
↓		
Coagulação	PC	(Higiene operador, tanque e utensílios)
↓		
Corte	PC	(Higiene operador e utensílios)
↓		
Enformagem	PC	(Higiene operador, tanque e utensílios)
↓		
Salga	PC	(Higiene do tanque, Higiene do operador, pasteurização da salmoura)
↓		
Embalagem	PC	(Higiene da embalagem)
↓		
Estocagem	PCC	(Temperatura)
↓		
Transporte	PCC	(Temperatura)
↓		
Mercado	PCC	(Temperatura)

Coalho, Fermento  
Lático, Cloreto de cálcio →

## ANEXO 3

### Produção Relacionada ao Assunto BPF e APPCC

#### Artigos publicados ou aceitos para publicação

- 1) E. C. Tondo; M. C. M. Guimarães; J. A. P. Henriques; M. A. Z. Ayub. 2000. Assessing and Analysing contamination of dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. Journal of Canadian Microbiology. "*In Press*". Cópia anexada a seguir.
- 2) Brugalli, A.; Pinto, J. M.; Tondo, E. C. 2000. Análise de perigos e identificação de pontos críticos de controle em restaurante universitário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Revista Higiene Alimentar, Vol. 14 - nº 72, p. 53-59.
- 3) Santos, M. I. S.; Tondo, E. C. 2000. "Determinação de perigos e pontos críticos de controle para implantação de sistema APPCC/HACCP em lactário" Revista de Nutrição - PUC Campinas, "*In Press*".

#### Artigos submetidos

- 1) Stolte, D.; Tondo, E. C. 2000. Avaliação de uma unidade de alimentação e nutrição para aplicação do método análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC/HACCP). Revista Higiene Alimentar.

#### Trabalhos apresentados em congressos científicos

Apresentação em poster - 15

#### Orientações

Monografias de especialização – 12

Estágios discentes em indústrias de alimentos – 5

Implantações de sistema APPCC em indústrias de alimentos – 3

#### Cursos ministrados em Indústrias de Alimentos ou Instituições de Ensino

BPF – 14

APPCC - 7

JAMES J. GERMIDA, *Editor*  
HARRY G. DENEER, *Editor*  
TRACEY PERRY, *Editorial Asst.*  
Department of Soil Science  
University of Saskatchewan  
51 Campus Drive  
Saskatoon SK S7N 5A8

Telephone: 306-966-6879  
Fax: 306-966-6949  
E-mail: [cjm.journal@usask.ca](mailto:cjm.journal@usask.ca)

15 September, 2000  
File No.: I00-011

Dr. M. A.Z. Ayub  
Institute of Food Science & Technology  
Federal University of Rio Grande do Sul State  
Av. Bento Gonçalves, 9500  
PO BOX 15090  
91501-970 Porto Alegre Brazil

Dear Dr. Ayub,

Re: Assessing and analysing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using ...

We are pleased to inform you that your manuscript is acceptable for publication in the Canadian Journal of Microbiology.

Your contribution will appear in the Infection and Immunity section of the first available issue. Galley proofs will be mailed to you directly from the printer. Corresponding authors must proofread and provide approval for their galley proofs within 48 hours of receipt. Those authors planning to be away for any length of time should designate a backup to proofread and approve galley proofs. Galley proofs not approved within a minimum time period will be published as is. CJM is now publishing papers as they are ready on the web, in advance of the paper copy. Once you have approved your galley proofs, you can expect to find your paper published on the web-site within 2-3 weeks at <http://cjm.nrc.ca>.

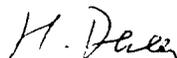
If you have any questions regarding publication or proofs, please contact the Publication Officer:

Rebecca Fleming                      PHONE: (613) 993-9038  
Publications Office                FAX:     (613) 952-7656  
NRC Research Press  
National Research Council of Canada  
Ottawa, Ontario K1A 0R6

Thank you for sending a disk. It will be forwarded to the Publication Office with the manuscript.

We thank you again for submitting your research for publication in the Canadian Journal of Microbiology.

Yours sincerely,



Drs. J.J. Germida and H.G. Deneer  
Editors

tp  
cc: Dr. N. Cimolai

**Assessing and analysing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE**

E. C. Tondo<sup>a</sup>, M. C. M. Guimarães<sup>a</sup>, J. A. P. Henriques<sup>b</sup>, M. A. Z. Ayub<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Food Science and Technology of Federal University of Rio Grande do Sul State, Av. Bento Gonçalves, 9500, PO BOX 15090, ZIP CODE 91501-970, Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup> Biotechnology Centre of Rio Grande do Sul State,

Corresponding author: Tel.+5513166685; Fax: +5513167048; e-mail: [mazayub@vortex.ufrgs.br](mailto:mazayub@vortex.ufrgs.br)

## Abstract

A 2.5 years long study of a dairy products processing plant was performed with the purpose to examine the contamination of *Staphylococcus aureus* and try to correlate their sources of contaminations. Cultures were submitted to an antibiotic susceptibility test (AST) and characterised by Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) analysis.

Results showed that 35.2% (19/51) of food handlers were asymptomatic carriers of *S. aureus*, and that 90.4% (19/21) of raw milk sampled were contaminated. *S. aureus* was isolated from only 10 samples among more than 3200 investigated final dairy products. No *S. aureus* contamination was found on machinery. The AST analysis demonstrated sensitivity of tested *S. aureus* to oxacillin, cephalothin, vancomycin, gentamicin and sulfamethoxazole / trimethoprim. AST analysis generated 8 different phenotyping profiles, but did not allow us to suggest the source of contamination of 7 among 10 final products.

PFGE analysis proved to be a sensitive method as it generated 42 different DNA banding profiles among the 48 *S. aureus* investigated, demonstrating a lack of predominance of endemic strains in the plant, contrary to suggestions raised by antibiotic resistance typing. Based on PFGE genotyping, *S. aureus* strains isolated from 4 contaminated final products were similar to 4 *S. aureus* isolated from raw milk. Five final products contained *S. aureus* different from all other strains collected, and one showed similarity to a strain isolated from a food handler. These results suggested contamination by raw milk as the main source of contamination of the final dairy products investigated.

Key words: *S. aureus*, dairy products, antibiotic susceptibility, PFGE.

## Introduction

The composition of milk, its natural microbiological contamination, and the high degree of handling, can explain the fact that dairy products are frequently implicated in foodborne diseases (Wendpap and Rosa 1993; Bowen and Henning 1994; Carmo et al. 1999). Among pathogenic bacteria, *S. aureus* is one of the most abundant microorganisms isolated from Brazilian raw milk, and also the microorganism most commonly isolated from bovine mastitis (Lange et al. 1997). The presence of *S. aureus* in asymptomatic food handlers is well documented (Jay 1996; Soares et al. 1997) and also contributes to contamination of dairy products. Irregularities in storage time and temperature, and failures in the hygienic procedures during the production of dairy products, are factors that may lead to high contamination with *S. aureus*. Therefore, even industrialised dairy products can be sources of food intoxication, since the staphylococcal enterotoxin is not inactivated by pasteurisation (Manie et al. 1999).

The differentiation of *S. aureus* in a dairy products facility by classical typing methods is very useful, contributing to the investigation of contamination sources. For instance, antibiotic susceptibility testing (AST) of microorganisms can be used, being low cost and easy handling the advantages of this method. However, even being more time-consuming, modern techniques as the molecular typing, will yield rapid and precise results (Farber 1996) and can be used to trace the dissemination of microorganisms in a processing plant, resulting in very precise correlation between strains. Molecular typing of *S. aureus* has been widely used in epidemiological studies (Bannermann et al. 1995; De Lencastre et al. 1996; Hoefnagels-Schurermans et al. 1997; Walker et al. 1998), but not, as extensively, to evaluate the dissemination of this pathogenic bacterium in food plants (Destro et al. 1996; McCullagh et al. 1998). The application of typing methods, such as Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), can lead to a precise identification of food contamination sources that would not be possible by using other less sensitive techniques.

This research aimed at examining the contamination of *Staphylococcus aureus* in a dairy products processing plant and investigating, by means of AST and PFGE analysis, the relationship, if any, among the isolated strains and their possible sources of contamination.

## **Materials and Methods**

### **Sampling**

In a period of 2.5 years (May 1997 to November 1999), during a HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) implantation, a total of 217 samples of raw milk, personnel, and machinery and more than 3 200 final products were analysed to the presence of *S. aureus* in a middle-sized, dairy products processing plant in Nova Petropolis, South of Brazil. The surface samples (100 cm<sup>2</sup>) of sanitised machinery (n=145) were obtained using a sterile cotton swab moistened in 0.1% peptone water (Difco, Detroit, MI, USA) and plated on Baird-Parker (Oxoid, Basingstone, Hampshire, UK) added with 0.5% (W/V) of sodium thiosulfate (Sigma, St. Louis, MO, USA) according to Russell et al. (1984). The nasopharigae of all the 51 food handlers were analysed using a sterile cotton swab according to Adesiyun et al. (1998). The raw milk was sampled in aliquots of 100 ml of each delivery truck of the plant (n=21). The samples (10 g or ml) of dairy final products; butter, cream, cheese, and pasteurized milk were investigated at regular intervals following methodology described by the FDA (1992). All collected samples were immediately transported to the dairy plant laboratory and cultured on Baird-Parker plates at 37°C for 48 h.

### **Strain identification**

Typical colonies grown on Baird-Parker plates were identified as *S. aureus* after the following tests: Gram staining, production of coagulase, catalase, and DNase and oxidation and fermentation of manitol, according to FDA (1992).

### **Antibiotic susceptibility test (AST)**

The AST were performed by the disk-agar method described by The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2000), using *S. aureus* ATCC 25923 as a control strain. The tested antibiotics were: penicillin, erythromycin, oxacillin, cephalothin, clindamycin, gentamicin, sulfamethoxazole/trimethoprim and vancomycin. For the purpose of typing, a numerical code profile was created based on antibiotic

resistance of each isolate. Resistance was classified as 1, intermediary resistance as 2, and full susceptibility was classified as 3 (modified from Kluytmans et al. 1995).

### **Pulsed -field Gel Electrophoresis analysis (PFGE)**

The protocol for the preparation of chromosomal DNA and restriction endonuclease digestion was according to Senna et al. (1996). The high-molecular-weight restriction fragments generated were resolved with a CHEF-DR II pulsed-field electrophoresis system (Bio-Rad, Melville, NY, USA). The initial and final pulse times, respectively, were 5.0 and 60 s, at 200 V or 6V/cm, during 22 h with the buffer being kept at 12 °C. A 1.2 % agarose gel in 0.5X TBE buffer (0.1 M Tris-Cl [Sigma], 0.1 M boric acid [Sigma], 0.2 EDTA [Sigma, pH 8.0]) was loaded with the plugs for electrophoresis. The DNA size standard used was a bacteriophage Lambda ladder consisting of concatemers starting at 48.5 kpb and increasing to approximately 1 000 kpb (Sigma). The gel was photographed under UV transillumination. Banding patterns were compared using the Molecular Analyst Fingerprinting software system (Bio-Rad) and dendogram was constructed by the unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA). One of the isolated *S. aureus* strains, numbered 12, was used in all electrophoresis as internal control. The interpretation of the PFGE results was based on Tenover et al. (1995) who considered three classes of relatedness for strains: strains yielding DNA banding patterns presenting up to three different bands between themselves were considered closely related; strains presenting four to six different bands between themselves were classified as probably related, while strains bearing seven or more different bands between themselves were considered unrelated. In our work, in order to avoid possible misinterpretations of results, we have classified strains in only 2 groups: DNA banding patterns presenting up to three bands of difference ( $\geq 80\%$  of similarity) were considered closely related or similar, and all strains differing from four or more bands were considered unrelated or different ( $\leq 79\%$  of similarity). All strains were compared with a Brazilian epidemic Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA-POA) clone (generously provided by Dr. Diógenes Santos, Biotechnology Centre of Rio Grande do Sul State) isolated from local hospitals (120 km distant from the milk processing plant). This strain was also used as control to PFGE analysis.

## Results and Discussion

### Personnel colonization

Strains of *S. aureus* were isolated from 19 (35.2%) of the 51 personnel investigated (table 1). These results are similar with those reported previously by Noble et al. (1967), who found that between 10 and 50% of human beings are healthy carriers of this microorganism, with numbers varying from  $10^1$  to  $10^6$  CFU/cm<sup>2</sup> (Jay 1996).

Higher staphylococcal percentages were found in Teresina City, in the Northeast of Brazil by Soares et al. (1997) who verified that the incidence of such pathogen varied from 43.3% to 49.5% among food handlers. The authors also found that 26 of 91 investigated healthy carriers were contaminated by enterotoxin-producing strains. This contamination is particularly preoccupant since *S. aureus* is one important agent of food intoxication worldwide. Statement deleted.

### Raw milk contamination

The sampling of the 21 delivery trucks produced 19 (90.4%) samples contaminated by *S. aureus*. One isolate of each positive sample was collected to be analysed by AST and PFGE, with the purpose to compare *S. aureus* from different regions where the trucks came from.

Significant numbers of Brazilian milk cattle have clinical or sub-clinical mastitis caused by several strains of *S. aureus*. This is the most frequently isolated bacterium from bovine mastitis in Southern Brazil (Lange et al. 1997). Also in other countries, the counts of *S. aureus* in milk are frequently around  $10^5$  CFU/ml (Adesiyun et al. 1998), which is considered the minimal population to produce sufficient amount of staphylococcal enterotoxin to cause food intoxication (Cliver 1990). The populations of *S. aureus* in raw milk in the present work were variable, raging from undetectable to  $1.8 \times 10^4$  CFU/ml with a mean number of  $3.5 \times 10^3$  CFU/ml (table 1). Similar values were also reported by other Brazilian researchers (Dias et al. 1999; Logueiro and Aleixo 1999) and by Adesiyun et al. (1998) studying the contamination of raw milk in Trinidad, West Indies. Comment deleted.

### **Equipment and final products contamination**

*S. aureus* was not found in 145 samples of sanitised surfaces of the milk plant equipment, suggesting good manufacturing practices (GMP) and appropriate cleansing procedures. Concerning the final products contamination, of more than 3 200 samples, only 10 samples presented *S. aureus* contamination (4 soft cheeses, 1 cheddar cheese, 2 butters, and 3 batches of pasteurized milk) with population of  $<1.0 \times 10^2$  CFU/g (mean number  $6.1 \times 10^1$  CFU/ml or g, ranging from  $1.0 \times 10^1$  to  $9.0 \times 10^1$  CFU/ml or g - table 1). The low incidence of contaminated final products was attributed to the good performance of pasteurization and to the implementation of control procedures directly focused on the prevention of the presence of *S. aureus*. Destro et al. (1996), studying the dissemination of *L. monocytogenes* in a shrimp plant in Santos City, Brazil, isolated 15 strains on utensils, 25 strains from the processing environment, and 59 strains from shrimp. The authors suggested the need of a HACCP implantation in the processing plant, when these levels of contamination are found. The low contaminations on equipments and final products found in this study were indicatives of the efficiency of HACCP implantation in the dairy plant investigated.

### **Antibiotic susceptibility**

Among the *S. aureus* isolated from personnel, raw milk, and final products, 94.4%, 47.3%, and 50% were resistant to penicillin, respectively (table 2). Almost the same percentages of resistance of *S. aureus* to penicillin were found by other works that investigated food handlers (Soares et al. 1997) and raw milk (Lange et al. 1999; Baynes et al. 1999). The difference in percentages between resistance presented by strains isolated from personnel and raw milk could be explained by the long time clinical utilisation of antibiotics to treat human staphylococcal diseases.

Since all isolates were sensitivite to oxacillin, cephalothin, gentamicin, sulfametoxazole / trimethoprim and vancomycin, the typing by AST was based on the different susceptibilities to penicillin, erythromycin and clindamycin presented in table 2.

In recent years, attention has been given to staphylococcal antibiotic multi-resistance, mainly to high virulent strains called methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA).

(Dominguez et al. 1994; de Lencastre et al. 1996; Kumari et al. 1997). The investigation of such strains in food processing plants is highly recommended, since horizontal transmission could happen. Kluytmans et al. (1995) described food-related outbreaks caused by MRSA, that involved 27 patients and 14 health-care workers, resulting in five deaths. The spreading of MRSA, or other multi-resistant *S. aureus* by food or food handlers is a subject of concern and should be prevented in the food chain. In this study, we did not find any *S. aureus* similar to MRSA clones, which was confirmed by PFGE. All the analysed samples presented DNA banding patterns with less than 60% of similarity with the MRSA-POA, and therefore were classified as unrelated to it (figure 2). Nevertheless, attention should be given to the fact that some of the isolates showed resistance to more than one antibiotic.

#### **Typing by the antibiotics susceptibility test (AST)**

The AST generated 7 different profiles (A to G - table 3), being 56.25% (27/48) grouped as profiles A and B. *S. aureus* isolated from personnel displayed 4 different profiles (A, B, C, D, and G), while *S. aureus* from raw milk showed 7 profiles (A, B, C, D, E, and F). The *S. aureus* isolated from final products were distributed in 5 profiles (A, B, C, D, and E), suggesting different origins of contamination.

Considering only the AST results, one could assume the occurrence of predominant phenotypes (A and B) among investigated *S. aureus*. Furthermore, among the 10 final product isolates, 7 (isolate numbers 197, 198, 199, 212, 213, 214 and 216) belonged to the profiles (A, B, C, and D), suggesting similar strains of *S. aureus* colonising personnel, raw milk and final products, not allowing the identification of the origin of contamination. Only final product strains 200, 201, and 215 were classified in profile E, as *S. aureus* from raw milk, suggesting the raw milk as the source of contamination.

#### **Typing by PFGE analysis**

The PFGE genotyping analysis generated DNA patterns varying from 6 to 15 distinct bands (figure 1: an example of gel electrophoresis, and figure 2: the complete dendogram of all strains). Among the strains analysed, 75% (36/48) presented 10 or more

bands. Similar results were reported previously in typing of *S. aureus* using PFGE methods (Dominguez et al. 1994; Kumari et al. 1997; McCullagh et al. 1998).

The PFGE analysis revealed 42 different DNA banding patterns among the 48 *S. aureus* isolated from food handlers, raw milk, and from final products, showing high diversity of this microorganism in the processing plant. Contrary to what was showed by AST test, among the 19 strains isolated from food handlers, PFGE revealed 18 different profiles (figure 2), demonstrating a lack of an endemic strain among personnel, even considering the fact that they have been working together for years at the same plant area. Only a married couple of food handlers (6 and 27) harboured closely related *S. aureus* (80% of similarity). All other food handlers (isolates 1, 9, 12, 15, 17, 20, 21, 23, 24, 26, 32, 34, 35, 36, 48, 50, and 53) presented unrelated *S. aureus*, since their similarities were lower than 79% (difference  $\geq 4$  bands). The specificity of association of a strain of *S. aureus* to a specific food handler, as showed in this work, can be suitable to the precise identification of the sources of contamination of final products. As an example of this, Suzuki et al. (1999) demonstrated different PFGE patterns among *S. aureus* isolated of food handlers involved with an outbreak in Aichi-ken, Japan. These authors showed that a specific type of *S. aureus* was isolated from a food handler, food and from the patients, indicating the food handler as the possible source of contamination. Moreover, this PFGE molecular analysis can be used in industry to detect failures in hygienic procedures, establishing individual corrections, instead of implanting laborious general personnel training.

PFGE genotyping also showed that *S. aureus* isolated from raw milk were all unrelated. Among the 19 samples, the higher similarities were demonstrated for strains 93 and 103 (67% of similarity). The high variability of these isolates was already expected, based on the diversity of regions and animals from which the milk came from.

Final product strains also presented different banding patterns, suggesting diversity of origins of contaminations. Only strains 214 and 216, both isolated from soft cheeses, fell onto the same group (95% of similarity), and were thus identified as related strains.

With respect to suggestion of contamination source of final products, PFGE analysis demonstrated similarity between strains 117 and 197, strains 105 and 213, strains 94 and strains 214 and 216 (table 4), suggesting the raw milk as the source of contamination of 4 different final products, while AST analysis established similarity of these final products

strains (197, 213, 214 and 216) with strains from food handler or raw milk, made the identification of the probable source of contamination difficult (table 3). The same situation occurred with sample 199 (soft cheese), which by PFGE analysis was similar (95%) to a personnel sample (27), suggesting human contamination, while the AST was unable to differentiate raw milk or personnel as the source of contamination. Strain 212 (soft cheese) and strain 198 (butter) did not present similarity with none of the strains investigated by PFGE analysis, and the AST produced the same profile of these strains with *S. aureus* from milk and from food handlers (table 3), thus not allowing the identification of the probable sources of contamination.

Strains 200, 201, and 215 were grouped by AST with strains from raw milk (93 and 99), suggesting cross-contamination, while PFGE analysis was not able to identify the probable source of contamination of these final product samples, since it revealed unrelated DNA banding patterns.

Concerning the discrimination power of the methods, PFGE presented better results than AST, justifying its utilisation in the investigation of bacterial dissemination in a dairy plant, even being this technique more expensive and more time-consuming than classic microbiological methods.

Methods with lower sensitivity (as AST) could lead to determination of inadequate control points or identifications of wrong sources of contaminations. As an example, if only the results from AST were considered, one could assume that food handlers were the major causes of *S. aureus* contaminations of the analysed final products, since *S. aureus* isolated from these products are frequently originated from personnel poor hygiene habits and not from the raw milk, specially when GMP procedures are implemented. In this case, time-consuming training would be implemented to prevent these contaminations, while the real source of *S. aureus* would still be uncontrolled.

Dodd (1994) pointed out that the utilisation of molecular techniques allows for rapid and sensitive differentiation among strains of a specific microorganism. This facilitates the study of changes in the microbial flora in a processing plant, and provides information on sites of entry and cross-contamination of a microorganism. Many different methods can be applied, including plasmid typing, ribotyping, polymerase chain reaction-based methods, PFGE (Farber 1996) among others. Each of them has their particular properties, but main

criteria as reproducibility, typeability, ease to interpretation and ease of performance must be considered. The choice of PFGE to perform the analysis in the present work can be justified by the higher sensitivity of this technique compared to bacteriophage typing (Bannerman et al. 1995) plasmid typing (Dodd 1994), or PCR-based methods (Kumari et al. 1997).

Similarly to the results found by Destro et al. (1996), but in disagreement with what was thought initially in this work, personnel did not appear to play a major role in the dissemination of pathogenic bacteria in the investigated milk processing plant. In the present research, the PFGE analysis suggested that the raw milk was the main cause of the identified contaminations of final products.

### **Acknowledgements**

This study was funded in part by the Laboratory Genotox-UFRGS and by the Agropecuária Petropolis. The authors wish to thank M.Sc. Procópio Senna, Dr. Diógenes Santos (Biotechnology Centre, UFRGS), and to Ms. Siglinde Wazlawik (laboratory Agropecuária Petropolis) for their scientific and technical support.

## References

- Adesiyun, A. A., Webb, L. A., and Romain, H. T. 1998. Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. *J. Food Protect.* **61**: 629-632.
- Bannerman, T. L., Hancock, G. A., and Tenover, F. C. 1995. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 551-555.
- Baynes, R. E., Lyman, R., Anderson, K. L., and Bronie, C. F. 1999. A preliminary survey of antibiotic residues and viable bacteria in milk from three caribbean basin countries. *J. Food Prot.* **62**: 177-180.
- Bowen, D. A., and Henning, D. R. 1994. Coliform bacteria and *Staphylococcus aureus* in retail natural cheese. *J. Food Prot.* **57**: 253-255.
- Cliver, D. O. 1990. Foodborne diseases. Academic Press, INC., San Diego, Ca. 86 and 98pp.
- Carmo, L. S., Dias, R. S., Linardi, V. R., Sena, M. J., Santos, D. A., Faria, M. E., and Pena, E. C. 1999. Intoxicação alimentar causada por linhagens enterotoxigênicas de *Staphylococcus aureus* veiculadas por queijo tipo "minas". XX Congresso brasileiro de microbiologia. 1999. Abstr: AL-011. p. 347.
- De Lencastre, H., De Lencastre, A., and Tomasz, A. 1996. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered from a New York city hospital: analysis by molecular fingerprinting techniques. *J. Clin. Microbiol.* **34** (9): 2121-2124.
- Destro, M. T., Leitão, M. F. F., and Farber, J. M. 1996. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 705-711.
- Dias, R.S., Lauria-Filgueira, A.L., Silva, M.C.C., Pena, E.C., Faria, M.E., Santos, D.A., Sena, M.J., and Carmo, L.S. 1999. Perfil microbiológico de leite *in natura* comercializados em alguns municípios mineiros - (resultados parciais). XX Congresso brasileiro de microbiologia, 1999. Abstr: AL-023. p. 350.
- Dodd, C. E. R. 1994. The application of molecular typing techniques to HACCP. *Trends in food science & technology.* **5**: 160-164.
- Dominguez, M. A., De Lencastre, H., Linares, J., and Tomasz, A. 1994. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during a outbreak of MRSA disease in a spanish hospital. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 2081-2087.

- Farber, J. M. 1996. An introduction to the hows and whys of molecular typing. *J. Food Protect.* **59**: 1091-1101.
- Food and Drug Administration. 1992. *Bacteriological Analytical Manual*. 7 Ed. Airlington: AOAC International.
- Hoefnagels-Schuermans, A., Peetermans, W. E., Struelens, M. J., Van Lierde, S., and Van Eldere, J. 1997. Clonal analysis and identification of epidemic strains of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antibiotyping and determination of protein A gene and coagulase gene polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2514-2520.
- Jay, J. M. 1996. *Modern food Microbiology*. Fifth edition. Chapman & Hall, New York, NY, 429pp.
- Kluytmans, J., Leeuwen, W. V., Goessens, W., Hollis, R., Messer, S., Herwaldt, L., Bruining, H., Heck, M., Rost, J., Leeuwen, N. V., Belkum, A. V., and Verbrugh, H. 1995. Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno - and genotyping. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 1121-1128.
- Kumari, D. N. P., Keer, V., Hawkey, P. M., Parnell, P., Joseph, N. Richardson, J. F., and Cookson, B. 1997. Comparison and application of ribosome spacer DNA amplicom polymorphisms and pulsed-field gel eletrophoresis for differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus auereus* strains. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 881-885.
- Lange, C., Cardoso, M., and Pianta, C. 1997. Epidemiological characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brazil). *Rev. Microbiol.* **28**: 215-219.
- Lange, C., Cardoso, M., Senczek, D., and Schwarz, S. 1999. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Veterinary Microbiology* **67**: 127-141.
- Logueiro, A.P., and Aleixo, J.A.G. 1999. Qualidade microbiológica do leite não inspecionado comercializado em Cuiabá - MT. XX Congresso brasileiro de microbiologia. Abstr. AL-089. p. 367.
- Manie, T. Brözel, V. S. Veith, W. J., and Gouws, P. A. 1999. Antimicrobial resistance of a bacterial flora associated with bovine products in South Africa. *J. Food Prot.* **62**: 615-618.
- McCullagh, J. J., McNamee, P. T., Smyth, J. A., and Ball, H. J. 1998. The use of pulsed field gel eletrophoresis to investigate the epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in commercial broiler flocks. *Veterinary Microbiology* **63**: 275-281.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Approved standard M100-S10. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

- Noble, W. C., Valkenburg, H. A., and Wolters, C. H. L. 1967. Carriage of *Staphylococcus aureus* in random samples of a normal population. *Journal of Hygiene* **65**: 567-573.
- Russell, A. D., Yarnych, V. S., and Koulikovskii, A. V. 1984. Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and control of zoonotic diseases. World Health Organization. Geneva.
- Senna, J., Chachaty, E., Saulnier, P., Espaze, E., Barbier, N., Leclercq, B., Richet, H., and Andremont, A. 1996. Molecular Characterization of sporadic and epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in 3 French hospitals. 8<sup>th</sup> Int. Symposium on Staphylococci and Staphylococcal infections Abstr. 285. p. 260.
- Soares, M. J. S., Tokumaru-Miyazaki, N. H., Noletto, A. L. S., and Figueiredo, A. M. S. 1997. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* clones and detection of brazilian epidemic MRSA clone (III:B:A) among isolates from food handlers. *J. Med. Microbiol.* **46**: 214-221.
- Suzuki, Y., Saito, M., and Ishikawa, N. 1999. Restriction fragment length polymorphisms analysis by pulsed-field gel electrophoresis for discrimination of *Staphylococcus aureus* isolates from foodborne outbreaks. *Int. J. Food Microbiol.* **46**: 271-274.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., and Swaminathan, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2233-2239.
- Walker, J., Borrow, R., Edwards-Jones, V., and Oppenheim, B. A. 1998. Epidemiological characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in the North West of England by protein A (*spa*) and coagulase (*coa*) gene polymorphisms. *Epidemiol. Infect.* **121**: 507-514.
- Wendpap, L. L., and Rosa, O. O. 1993. Presença de *Staphylococcus aureus* em queijo minas consumido no município de Cuiabá-MT. *H. Alimentar.* **7**: 23-29.

**Table 1.** Contamination of *S. aureus* in personnel, raw milk, machinery, and final products.

Sources (No. of samples)	Positive samples No. (%)	Mean (range) CFU/ ml or g
Personnel (51)	19 (35.2)	ND
Raw milk (21)	19 (90.4)	$3.5 \times 10^3$ (<0.01 to $1.8 \times 10^4$ )
Machinery (145)	0	0
F. products (>3200*)	10 (<0.31)	$6.1 \times 10^1$ ( $10^1$ to $9.0 \times 10^1$ )

\*: during 2.5 years of daily sampling. ND: not determined;

**Table 2.** Antibiotic susceptibility of *S. aureus* isolated from raw milk, personnel and dairy products.

Source	No. of Sample	Resistance to (%)							
		PN	ERI <sup>I</sup>	OXA	CEF	CLI <sup>I</sup>	GEN	SUT	VAN
Personnel	19	94.4	63.1	0	0	15.7	0	0	0
Raw milk	19	47.3	63.1	0	0	21.0	0	0	0
Dairy products	10	50	50	0	0	20	0	0	0

PN: penicillin, ERI: erythromycin, OXA: oxacillin, CEF: cephalothin, CLI: clindamycin, GEN: gentamicin SUT: sulfamethoxazole / trimethoprim, VAN: vancomycin.

I: Intermediary resistance.

**Table 3.** Profiles generated by susceptibility to antibiotics test (AST) of strains of *S. aureus* isolated from dairy processing plant.

Sample number and origin	Antibiotic susceptibility profile <sup>a</sup>	Phenotypic profile
1 <sup>P</sup> , 9 <sup>P</sup> , 12 <sup>P</sup> , 20 <sup>P</sup> , 26 <sup>P</sup> , 27 <sup>P</sup> , 34 <sup>P</sup> , 36 <sup>P</sup> , 101 <sup>M</sup> , 107 <sup>M</sup> , 117 <sup>M</sup> , 118 <sup>M</sup> , 213 <sup>FP</sup> , 214 <sup>FP</sup>	12333333	A
6 <sup>P</sup> , 17 <sup>P</sup> , 21 <sup>P</sup> , 23 <sup>P</sup> , 32 <sup>P</sup> , 48 <sup>P</sup> , 53 <sup>P</sup> , 94 <sup>M</sup> , 95 <sup>M</sup> , 110 <sup>M</sup> , 113 <sup>M</sup> , 197 <sup>FP</sup> , 212 <sup>FP</sup>	13333333	B
24 <sup>P</sup> , 35 <sup>P</sup> , 50 <sup>P</sup> , 98 <sup>M</sup> , 198 <sup>FP</sup> , 199 <sup>FP</sup>	12332333	C
15 <sup>P</sup> , 103 <sup>M</sup> , 105 <sup>M</sup> , 111 <sup>M</sup> , 114 <sup>M</sup> , 216 <sup>FP</sup>	32333333	D
93 <sup>M</sup> , 99 <sup>M</sup> , 200 <sup>FP</sup> , 201 <sup>FP</sup> , 215 <sup>FP</sup>	33333333	E
102 <sup>M</sup> , 109 <sup>M</sup> , 116 <sup>M</sup>	32332333	F
115 <sup>M</sup>	31332333	G

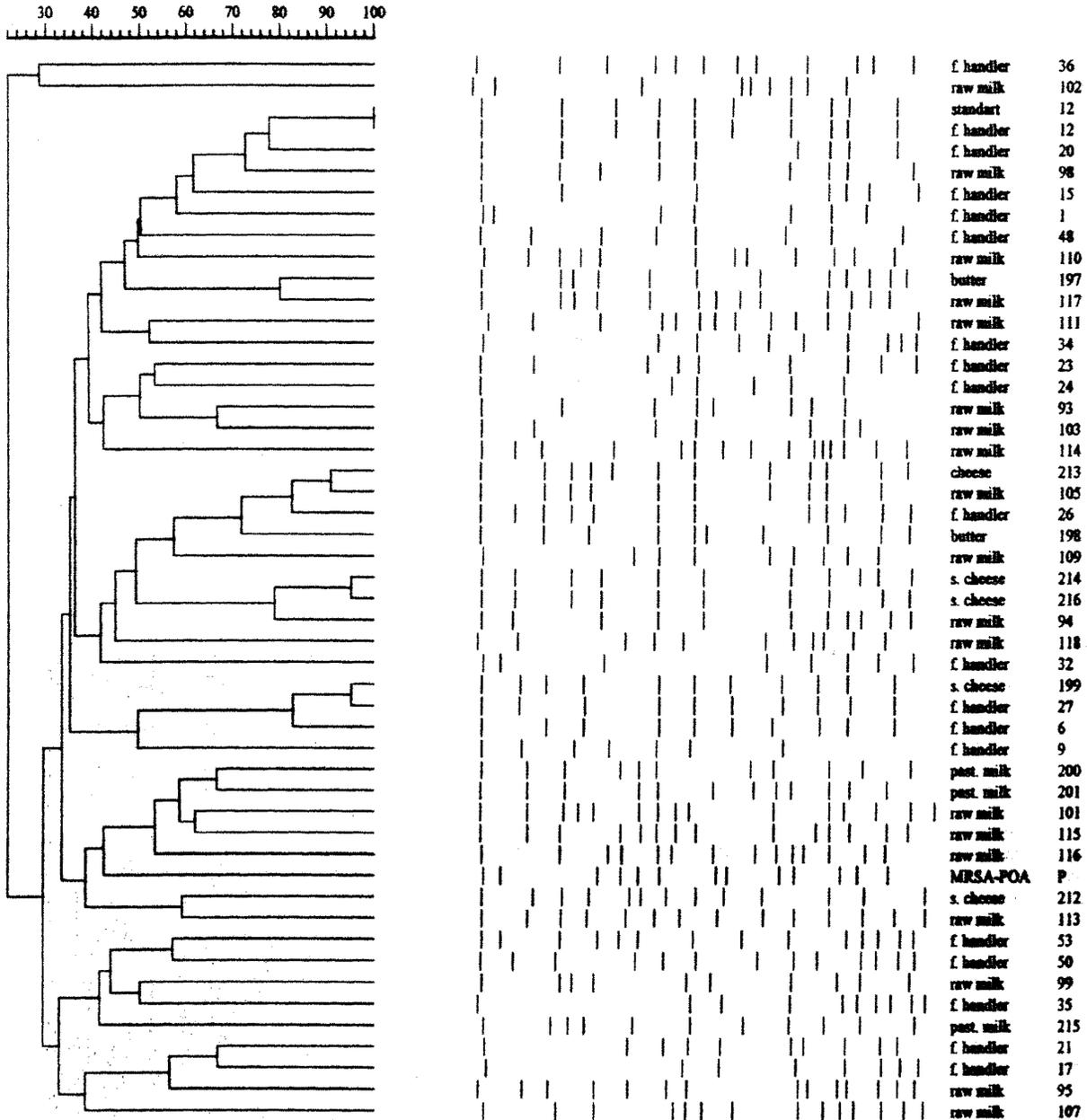
<sup>a</sup>Susceptibility profiles are given as a numeric based on the resistance (1), intermediate (2), and susceptible (3) to the antibiotic; penicillin, erythromycin, oxacillin, cephalothin, clindamycin, gentamicin, sulfametoxazole / trimethoprim, and vancomycin.

P: personnel; M: raw milk., FP: final product.

**Table 4.** Final products contamination with *S. aureus* and their probable sources of contamination based on PFGE analysis.

final products (strain number)	Probable source of contamination (strain number)
Butter (197)	Raw milk (117)
Cheddar cheese (213)	Raw milk (105)
Soft cheese (214)	Raw milk (94)
Soft cheese (216)	Raw milk (94)
Soft cheese (199)	Food handler (27)
Butter (198)	ND
Pasteurized milk (200)	ND
Pasteurized milk (201)	ND
Soft cheese (212)	ND
Pasteurized milk (215)	ND

ND: not determinated.



**Figure 1.** Similarity of DNA PFGE patterns from *S. aureus* isolated from raw milk, food handlers, and final dairy products of a dairy processing plant. Past. milk: pasteurized milk. S. cheese: soft cheese. MRSA-POA: Epidemic brazilian methicillin resistant *S. aureus* isolated from hospitals of Porto Alegre. Far right line: strain number.