

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE CRU PRODUZIDO NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ E OCORRÊNCIA DE *Listeria monocytogenes*

MICROBIOLOGIC QUALITY OF RAW MILK PRODUCED IN THE WEST REGION OF PARANA AND OCCURRENCE OF *Listeria monocytogenes*

W. HARTMANN^{1*}, U. V. C. ANDRADE¹, M. B. R. STEFFENS², M. S. HARTMANN³,
M. A. S. KADOWAKI³, M. L. MASSON⁴

RESUMO

Foram estudadas 34 propriedades rurais, no período de outubro a dezembro de 2006, com 68 amostras de leite coletadas em triplicata diretamente dos tanques resfriadores ou vasilhames equivalentes. Foi pesquisada a presença de *Listeria spp.*, comparando-se com o nível de contagem bacteriana total no leite de tanques. Foi utilizado agar-Aloa para isolamento de *Listeria spp.* e de *Listeria monocytogenes*, com confirmação por PCR. Das amostras de leite cru submetidas a pesquisa de *Listeria spp.* observou-se que 19 (27,9%) estavam contaminadas, e duas (2,9%) apresentaram resultado positivo para *L. monocytogenes*. A contagem bacteriana total apresentou média de 5,41 log UFC/mL ($\pm 0,57$), e 29,3% das amostras estavam acima do limite de $7,5 \times 10^5$ UFC/mL. Os resultados permitem afirmar que este patógeno deve ser pesquisado em amostras de leite cru por constituir um importante indicador de segurança alimentar e que os produtores rurais não têm conhecimento adequado sobre os riscos a que estão sujeitos ao manipularem e consumirem este produto.

PALAVRAS-CHAVE: Boas práticas. Leite cru. Segurança alimentar

SUMMARY

The presence of *Listeria spp.*, correlated at the level of total bacterial count in bulk tank milk was investigated, about 34 farms in the period of October to December 2006, with 68 triplicate samples of milk collected directly from the bulk tanks or equivalent containers. Aloa-agar was used for isolation of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes*, with confirmation by PCR (polymerase chain reaction). In the samples of raw milk subjected to search of *Listeria spp.*, it was observed that 19 (27.9%) were contaminated, and two (2.9%) were positive for *L. monocytogenes*. The total bacterial count showed an average of 5.41 log CFU/mL (± 0.57), and 29.3% of samples were above the limit of 7.5×10^5 CFU/mL. The results indicate that this pathogen should be studied in samples of raw milk cause it's an important indicator of food security and farmers don't have adequate knowledge about the risks they are subject to manipulate and consume this product.

KEY-WORDS: Food safety. Good practices. Raw milk

¹ Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal do Paraná. PPGTA - UFPR. Centro Politécnico, Setor de Tecnologia, Jardim das Américas. Cx. Postal 19011 – 81531-990. Curitiba-PR. Fone (41) 3361-3232

² Docente Permanente do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR

³ Laboratório de Fixação de Nitrogênio - UFPR

⁴ Docente Permanente/Orientadora do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da UFPR

INTRODUÇÃO

A contaminação do leite por microrganismos mesófilos, termófilos e psicotróficos, tem sido comprovada em leite cru, como também em leite pasteurizado, representando risco potencial para crianças e idosos e, também, possível meio de veiculação de outros enteropatógenos (CATÃO & CEBALLOS, 2001, SILVEIRA et al., 2003). Dentre os mesófilos com comportamento de psicotróficos, *Listeria monocytogenes* é um patógeno emergente, apresenta contínua adaptação ao meio, e aparece freqüentemente relacionada a surtos de infecções alimentares (CHEN et al., 2003, FDA, 2008). De acordo com Quinn et al. (2005), Liu (2006) e FDA (2007), pode crescer em condições de anaerobiose, e sobreviver à pasteurização, pois tem localização intracelular e é tolerante ao calor. São bacilos pequenos, microaerófilos ou aeróbios facultativos, capazes de se multiplicar em temperatura de refrigeração. Em humanos, causa septicemia, aborto, endocardite, conjuntivite, meningoencefalite, meningite e encefalite, infecções urinárias, e outras enfermidades (DIMAIO, 2000).

De acordo com Freitas (2008), o consumo de leite sem inspeção no Brasil, é da ordem de 30%. Assim, a contaminação deste por *Listeria monocytogenes* constitui uma grande preocupação, devido aos surtos alimentares serem associados ao consumo de leite cru, queijos (particularmente queijos moles) e leite pasteurizado (SUTHERLAND et al, 2003, BULL et al., 2005). Diversos surtos de alta gravidade já foram registrados, como o da Filadélfia em 1987, e o de Massachussets (E.U.A.) em 2007 com altos índices de mortalidade, e muitos deles tendo origem em leite pasteurizado e em queijos, onde o microrganismo pode se multiplicar mesmo em baixas temperaturas (FDA, 2007; CDC, 2008). Aproximadamente 2,5 mil casos de listeriose são registrados anualmente nos Estados Unidos, sendo que 90% deles levam a hospitalizações e 20% a óbitos (CDC, 2008). Tendo em vista a importância deste microrganismo em relação à segurança alimentar, em outros países há planos governamentais específicos para reduzir os riscos de surtos alimentares (FDA, 2005).

No Brasil não há estatísticas oficiais sobre casos de listeriose, pois sua notificação não é obrigatória.

O objetivo do presente trabalho foi investigar a ocorrência de contaminação por *Listeria monocytogenes* em leite cru refrigerado, por se tratar de um microrganismo que oferece risco direto e grave à saúde dos consumidores, e verificar sua presença em propriedades rurais que adotem ou não boas práticas de produção.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido na bacia leiteira da região oeste do Paraná, nos municípios de Toledo e Marechal Cândido Rondon.

As amostras foram coletadas diretamente nos tanques refrigeradores ou recipientes nas propriedades

rurais, acompanhando os caminhões de transporte de leite, de outubro a dezembro de 2006.

Caracterização das propriedades

A região oeste constitui a quarta maior produtora de leite do país, com a produção anual de 319 milhões de litros em 2007 (PARANÁ, 2008). Os rebanhos leiteiros da região são caracterizados por animais de raças especializadas, sendo 49,5% da raça Holandesa, 12,2% da raça Jersey, 5,8% Pardo-Suiça, 13% Girolanda e 19,5% mestiços. Predominam os pequenos produtores, assim, em 2006, dos 18.600 produtores de leite da região, 38,9% produziam menos de 50 litros de leite por dia; 25,4% entre 51 e 100; 25,9% entre 101 e 250; 6,2% de 251 a 400 e 3,4% acima de 401 (BRAGA et al., 2006). São encontrados três sistemas de ordenha distintos: ordenha manual (32%), ordenhadeira balde ao pé (50%) e ordenhadeira canalizada (18%); e no que se refere ao sistema de resfriamento, 39% dos produtores não possuem resfriadores adequados, 34,5% possuem resfriadores de imersão e 26,4% dos produtores possuem tanques resfriadores de expansão (IPARDES-EMATER, 2008). O presente estudo foi realizado em 34 propriedades de leite da região, representativas desta bacia leiteira, sendo: 12 com menos de 60 litros/dia, 18 entre 61 e 500 litros e 4 com 501 a 1500 litros, todas com duas ordenhas diárias.

Avaliação higiênico-sanitária das propriedades rurais

Nas visitas técnicas às propriedades foram verificados os seguintes aspectos, referentes às boas práticas de produção de leite, de acordo com a Resolução RDC nº. 275, de 21 de outubro de 2002 (ANVISA, 2002):

- Sistema de criação dos animais: extensivo, semi-intensivo, intensivo;
- Local de permanência das vacas durante o período da noite: no pasto, no estábulo;
- Fornecimento de silagem de milho às vacas em produção;
- Existência de vacas deitadas em área de formação de barro na propriedade;
- Condições de limpeza dos úberes das vacas ao entrarem na sala de ordenha: limpos, intermediários, sujos com barro;
- Realização do teste preventivo do caneco de fundo preto;
- Limpeza dos tetos antes da ordenha com água clorada em todas as ordenhas;
- Realização do pre-dipping (pré-imersão dos tetos) com solução antisséptica antes da ordenha;
- Secagem dos tetos antes da ordenha;
- Realização do pos-dipping (pós-imersão dos tetos) com solução antisséptica após a ordenha;
- Destino correto dos dejetos e águas residuárias;
- Origem da água utilizada para lavar os equipamentos de ordenha e utensílios;
- Sistema utilizado para a refrigeração do leite: tanque refrigerador de expansão direta, refrigerador de imersão em água gelada, geladeira residencial, congelador (freezer);

- Sistema de ordenha: ordenhadeira canalizada; ordenhadeira com balde-ao-pé; não possui ordenhadeira;
- Correta lavagem dos equipamentos (em propriedades que possuem ordenhadeira).

Amostras de leite cru

As amostras de leite cru (25 mL) foram coletadas assepticamente nas propriedades rurais estudadas, em frascos estéreis, diretamente dos tanques refrigeradores ou recipientes, durante a coleta efetuada pelos transportadores de leite cru, transportadas sob refrigeração em caixas isotérmicas (FDA, 2006).

Os procedimentos laboratoriais realizados foram: Isolamento das colônias

As amostras de leite de tanques foram homogeneizadas e em seguida transferidas para um recipiente contendo 225 mL de caldo Fraser. Permaneceram incubadas neste meio por 24 horas a 30°C. Em seguida foram transferidas para a superfície do agar-Aloa (Laborclin, Pinhais-PR)⁵. Permaneceram por 24 horas em estufa bacteriológica a 35°C, com a finalidade de se observar o desenvolvimento de colônias azuladas com formação de halo (QUINN et al., 2005).

Reação de PCR

As colônias típicas de *Listeria monocytogenes* no agar-Aloa foram submetidas ao método de PCR (reação da polimerase em cadeia, também chamada *polimerase chain reaction*) no Laboratório de Fixação de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, com base nos protocolos previamente descritos por Goldsteyn Thomas et al. (1991), Blais & Phillippe (2002) e por Gows & Liedemann (2005). Colônias isoladas foram diluídas em 50 µL de 1x tampão PCR em um micro-tubo de 2 mL. Foram adicionados 50 µL de solução de Triton X a 2% nesta suspensão celular e então centrifugada. Em um dos tubos não foi inserida amostra, sendo o tubo negativo. A mistura foi aquecida a 100°C por 10 minutos e resfriada à temperatura ambiente, e em seguida, centrifugada a 2.000 rpm por um minuto. Para reação de amplificação foram utilizados 5 µL deste lisado celular.

Os primers utilizados foram:

•LL-5: [5'ACCTATCCAGGTGCTC3'] para a amplificação da região bp 520 do gen *hly* produzido por Invitrogen (Carlsbad, CA, E.U.A.). E o *primer* reverso LL-4: [5'GCCACACTTGAGATAT3'].

•16S-5: [5'CGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATC[A/C]TGG3'] para a amplificação da região bp 520 do gen *hly* produzido por Invitrogen (Carlsbad, CA, E.U.A.).

E o *primer* reverso 16S-3:

[5'CCGGGATCCAAGTTTACCTTGTTACGACTT3'].

As condições de amplificação para o *primer* LL foram otimizadas pelo ciclo térmico, pelo seguinte procedimento: 80°C por 10 minutos, uma desnaturação

inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, continuação a 45°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. As condições de amplificação para o *primer* 16S foram otimizadas pelo ciclo térmico, pelo seguinte procedimento: 90°C por 10 minutos, uma desnaturação inicial a 94°C por 30 segundos, 25 ciclos de desnaturação a 42°C por 30 segundos, continuação a 72°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 5 minutos. Nos 2 casos, o DNA amplificado foi analisado por eletroforese em gel agarose 1,2% coradas com brometo de etídio (3 µL/100 mL), de acordo com Czajka et al. (1993).

Todo o material que entrou em contato com as amostras foi anteriormente autoclavado. Os reagentes foram preparados em cabine de fluxo laminar com a finalidade de evitar contaminação. A solução para reação de PCR foi preparada utilizando-se reagentes, como demonstrado na Tabela 1.

A solução tampão utilizada era composta por KCl 500 mM, tris-HCl 100 mM (pH 9,0) e Triton X-100 a 1%.

Eletroforese em gel agarose

Inicialmente foi preparada a solução de agarose (1,2%) com tampão TBE (Tris-Borato-EDTA). A agarose foi aquecida até o ponto de fusão, em seguida foi resfriada, e então colocada na cuba para gel. As amostras foram preparadas para eletroforese em microtubos, com 5 µL de corante. Em seguida o reservatório foi recoberto com o tampão TBE, até o gel ficar submerso em uma camada de 5 mm de espessura. Foram preenchidas as células no gel submerso com 8 µL de amostra. O aparelho foi conectado a 90 volts, aguardando-se aproximadamente 1 hora, e verificando-se o deslocamento realizado pela eletroforese. Em seguida as amostras foram removidas do recipiente e mergulhadas em solução de brometo de etídio por 15 minutos. A placa de gel foi lavada para a remoção do brometo de etídio, e as amostras foram observadas em lâmpada ultravioleta.

Interpretação dos resultados

A amplificação gerada pelas seqüências do gen *L. monocytogenes hlyA* é um fragmento duplo de DNA de 520 bp de comprimento. O teste de PCR é considerado positivo quando aparece uma banda intensa na placa de gel agarose. Quando não se identifica uma banda visível, o teste é considerado negativo.

Contagem bacteriana total

As amostras foram coletadas em frascos estéreis de 70 mL, adicionando-se azidiol® (BS Pharma, Belo Horizonte)⁶. As análises foram realizadas no Laboratório do Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná, em um prazo não superior a 24 horas após a coleta, no equipamento IBC (BENTLEY INSTRUMENTS INC.), segundo as normas FIL 100B: 1991 (BRASIL, 2001). Os resultados foram transformados em logaritmo na base 10 (COELHO et al., 2001, SANTOS, 2002).

⁶ azidiol: composto por 0,11975mg de azida de sódio e 0,005 mg de cloranfenicol por mL.

⁵ Registrado na ANVISA sob no. 10097010134

Tabela 1- Reagentes utilizados para o preparo da solução de PCR

SOLUÇÃO	VOLUME POR MICROTUBO (µL)
Água destilada estéril	32,5
Tampão PCR 10x	5,0
MgCl ₂ 25 mM	4,0
Primer U – 100 µM	0,5
Primer R – 100 µM	0,5
20 mM dNTP (dCTP, dATP, dTTP, dGTP)	0,5 (cada)
Volume final	44,5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 68 amostras submetidas à pesquisa de *L. monocytogenes* em placa de agar-Aloa, duas (2,9%) apresentaram resultado positivo (Tabela 2). Estes resultados foram confirmados pela execução da reação de PCR, com a utilização do *primer* LL.

Foram inferiores aos resultados descritos por Van Kessel et al. (2004), que estudando a prevalência de bactérias zoonóticas em tanques refrigeradores nos Estados Unidos, encontraram taxa de 6,5% para *L. monocytogenes*. E foram semelhantes aos resultados encontrados por D'Amico et al. (2008) nos Estados Unidos, que isolaram *L. monocytogenes* em três amostras (2,3%) de um total de 133 amostras coletadas em 11 fazendas leiteiras.

A contagem bacteriana total apresentou média de 5,41 log UFC/mL (\pm 0,57), e 29,3% das amostras estavam acima do limite de 750.000 UFC/mL. Nas propriedades com maiores contagens bacterianas observou-se maior frequência de contaminação por *Listeria spp.*

Nas primeiras coletas realizadas, 8 amostras apresentaram resultado positivo para *Listeria spp.* Destas, 5 amostras (n° 4, 10, 16, 31 e 33) apresentaram formação de colônias azuis em meio agar-Aloa, porém sem formação de halos, caracterizando não se tratar de *Listeria* patogênica. Estas foram submetidas à técnica PCR com *primer* 16S para identificar *Listeria spp.*, e apresentaram resultado negativo. Outras 3 amostras positivas para colônias azuis, uma com formação de halo (n° 27), e 2 com halo pouco definido (n° 21 e 24), foram submetidas a PCR com o *primer* LL. Destas, a primeira foi positiva, na propriedade 27 (Figura 1).

Das coletas realizadas após dois meses, 11 estavam contaminadas com *Listeria spp.* Destas, 8 amostras (n° 4, 13, 16, 18, 21, 24, 30 e 32) formaram colônias azuis em agar-Aloa sem desenvolver halos. Foram negativas em PCR com *primer* 16S. Uma amostra que formou colônias azuis com halos (n° 6) e 2 amostras que formaram colônias azuis com halos pouco definidos (n° 33 e 34), foram submetidas a PCR com *primer* LL. Destas, a primeira apresentou resultado positivo

(Figura 2). A propriedade n° 27 apresentou resultado positivo para *L. monocytogenes* em agar-Aloa e na técnica de PCR. Nesta propriedade a higiene ambiental estava inadequada, com grandes áreas de formação de barro, onde as vacas deitavam. Na saída da sala de ordenha, as vacas passavam por uma área sempre encharcada, onde havia acúmulo de barro e fezes. O produtor não possuía sistema de resfriamento adequado, e o leite permanecia em um vasilhame na geladeira de uso familiar. O recolhimento do leite era realizado a cada 2 dias, e a produção diária era de 15 litros. A ordenha era manual, e havia falhas nas práticas de higiene, com ausência de sanitizantes na lavagem dos tetos.

Na propriedade rural n° 6, cuja amostra apresentou resultado positivo para *L. monocytogenes* em agar-Aloa e na técnica de PCR, o trabalho efetuado por ocasião das visitas técnicas demonstrou que a higiene ambiental estava inadequada (lixo, entulhos, dejetos, vazamentos de bebedouros), os procedimentos de ordenha eram parcialmente adequados (não havia ordem estabelecida para a entrada das vacas na sala de ordenha). Apesar de a propriedade ser bem equipada para a atividade leiteira, e produzir 250 litros de leite por dia, observou-se que havia muito a ser melhorado sob o ponto de vista higiênico.

A baixa incidência de *L. monocytogenes* em leite cru não impõe problema para leite pasteurizado nem produtos lácteos, mas é significativo para consumidores de leite cru (JAYARAO e HENNING, 2001). Os riscos da contaminação pós-processamento também devem ser observados (LUNDEN et al., 2004). O fato de *L. monocytogenes* ter sido isolada em leite cru refrigerado, tendo em vista sua classificação como microrganismo emergente de baixa prevalência mas de alta letalidade, e considerando-se também o alto índice de consumo de leite não pasteurizado, causa grande preocupação para o segmento de lácteos. Produtores rurais, que consomem o leite produzido em suas propriedades, e as populações urbanas que adquirem leite cru e produtos derivados elaborados com leite não pasteurizado, compõem o grupo diretamente sob risco para listeriose.

Tabela 2 - Contagem bacteriana total e resultados do teste de agar-Aloa, nas coletas de amostras de leite cru, diretamente dos tanques refrigeradores.

Propriedades	Média de CBT (log UFC/mL)	agar-Aloa®	
		Outubro	Dezembro
1	3,69	-	-
2	4,99	-	-
3	5,78	-	-
4	5,69	+ ^b	+ ^b
5	5,74	-	-
6	5,13	-	+ ^a
7	4,68	-	-
8	3,84	-	-
9	4,83	-	-
10	5,06	+ ^b	-
11	5,11	-	-
12	5,54	-	-
13	5,16	-	+ ^b
14	5,50	-	-
15	5,02	-	-
16	5,83	+ ^b	+ ^b
17	5,93	-	-
18	6,07	-	+ ^b
19	5,76	-	-
20	5,77	-	-
21	5,45	+ ^c	+ ^b
22	5,26	-	-
23	5,69	-	-
24	6,26	+ ^c	+ ^b
25	5,50	-	-
26	5,34	-	-
27	6,19	+ ^a	-
28	6,00	-	-
29	5,44	-	-
30	5,39	-	+ ^b
31	5,64	+ ^b	-
32	5,36	-	+ ^b
33	6,07	+ ^b	+ ^c
34	5,24	-	+ ^c
média	5,41		

Nota: +, positivo; -, negativo; a, formação de halos; b, não houve formação de halos; c, halo pouco definido
CBT: contagem bacteriana total

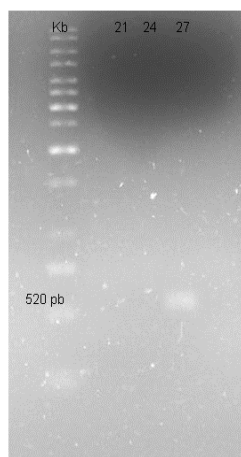


Figura 1- Resultado do teste de pcr da amostragem realizada no mês de outubro/2006 com primer II.

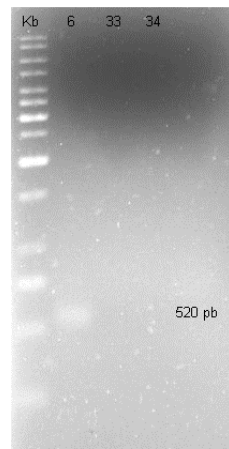


Figura 2 - Resultado do teste de pcr da amostragem realizada no mês de dezembro/2006 com primer II.

CONCLUSÕES

Em propriedades com os padrões higiênico-sanitários classificados como precários, foi identificada a presença de *Listeria monocytogenes*. Os resultados permitem afirmar que este patógeno deve ser pesquisado em amostras de leite cru por constituir um importante indicador de segurança alimentar, e que produtores rurais não têm conhecimento adequado sobre os riscos a que estão sujeitos ao manipularem e consumirem este produto.

RECOMENDAÇÃO

Tendo em vista as conseqüências graves a que as pessoas estão sujeitas, as indústrias de laticínios deveriam estabelecer monitoramento sobre a prevalência deste patógeno nos rebanhos, com acompanhamento das suas áreas técnicas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laborclin – Produtos para Laboratórios Ltda.

REFERÊNCIAS

- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º 275, de 21 de outubro de 2002. Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. 2002.
- BLAIS, B. W., PHILLIPPE, L. M. Identification of presumptive positive *Listeria monocytogenes* from foods and environmental samples by the polymerase chain reaction. **Health Canada's. Laboratory Procedure.** 2003.
- BRAGA, G. G., BRIETZKE, A. L., ARAÚJO, J. S., GARCIA, R. C., PEIXOTO, E. C. T. M. Contagem de células somáticas em leite formal de produtores de Marechal Cândido Rondon-PR. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 3, p. 80-85, ISSN: 1517-784X. 2006.
- BRASIL. **Normas de Lácteos.** Editora Milkbizz, São Paulo, 2001.
- BULL, M. K., HAYMAN, M. M., STEWART, C. M., SZABO, E. A., KNABEL, S. J. Effect of prior growth temperature, type of enrichment medium, and temperature and time of storage on recovery of *Listeria monocytogenes* following high pressure processing milk. **International Journal of Food Microbiology**, n. 101, p.53, 2005.
- CATÃO, R. M. R., CEBALLOS, B. S. O. *Listeria spp.*, coliformes totais e fecais e *E. Coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, 2001.
- CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Outbreak of *Listeria monocytogenes* infections associated with pasteurized milk from a local dairy – Massachussets, 2007. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v. 57 (40) p. 1097-1100, 2008.
- CHEN, H, HOOVER, D. G. Modeling the combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v. 4, p. 25-34, 2003.
- COELHO, P. S., SILVA, N., BRESCIA, M. V. Avaliação da qualidade microbiológica do leite UAT integral comercializado em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol.53, no.2, p.1-7. ISSN 0102-0935. Belo Horizonte, 2001.
- CZAJKA, J., BSAT, N., PIANI, M., RUSS, W., SULTANA, K., WIEDMANN, M., WHITAKER, R., BATT, C. A. Differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by 16S rRNA genes and intraspecies discrimination of *Listeria monocytogenes* strains by random amplified polymorphic DNA polymorphisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 304-308, 1993.
- D'AMICO, D. J., GROVES, E., DONNELLY, C. W. Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 8, p. 1580-1589. 2008.
- DIMAIO, H. *Listeria* infection in women. **Primary Care Update for Obstetricians and Gynecologists-Elsevier**. v. 7, n. 1, 2000.
- FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2005. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Centers for Disease Control and Prevention. *Reducing the Risk of Listeria monocytogenes FDA/CDC 2003 Update of the Listeria Action Plan.*
- FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2006. Center for Food Safety and Applied Nutrition. *Rapid Methods for Detecting Foodborne Pathogens.*
- FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2007. Center for Food Safety and Applied Nutrition. *Listeria monocytogenes. Bad Bug Book.*
- FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2008. Food Agency and Inspection Service. U.S. Department of Agriculture. **Food Safety**, Healthy People 2010. p. 10/4.
- FREITAS, M. R. Brasileiro consome 30% de leite sem qualquer inspeção. 2008. Disponível em: <http://www.oesteinforma.com.br/news.php?news=31416>. Acesso em 26.02.09.

- GOLDSTEYN THOMAS, E. J., KING, R. K., BURCHAK, J., GANNON, V. P. J. Sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* in milk and ground beef with the polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2576-2580, 1991.
- GOUWS, P. A., LIEDEMANN, I. Evaluation of Diagnostic PCR for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Food Products. **Food Technologic Biotechnology** 43 (2), 201-205, 2005.
- IPARDES-EMATER. Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. **Caracterização socioeconômica da atividade leiteira no Paraná**. 183 p. 2008.
- JAYARAO, B. M., HENNING, D.R. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**. v. 84, p. 2157-2161, 2001.
- LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 645-659, 2006.
- LUNDEN, J., TOLVANEN, R., KORKEALA, H. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. **Journal of Dairy Science**. v. 87 (E6-E11), 2004.
- PARANÁ -SECRETARIA DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO- Departamento de Economia Rural. **Análise da Conjuntura Agropecuária-Leite**. SEAB: Curitiba, 2008. 13 p.
- QUINN, P. J., MARKEY, B. K., CARTER, M. E., DONELLY, W. J., LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- SANTOS, D. Influência da temperatura durante o transporte, na qualidade microbiológica do leite recebido por uma indústria de laticínios no planalto catarinense. Dissertação de Mestrado (Inspeção de Produtos de Origem Animal). 80f. Programa Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária, Porto Alegre – UFRGS. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 30, p. 67-68, 2002.
- SILVEIRA, I. A., CARVALHO, E. P., TEIXEIRA, D. **Influência de microrganismos psicrotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado**. 2003. Disponível em <www.laticinio.net> Acesso em 06.07.2008
- SUTHERLAND, P. S., MILES, D. W., LABOYRIE, D. A. *Listeria monocytogenes*. In: HOCKING, A. D. **Foodborne Pathogens of Public Health Significance**, 6^a. ed. Food Microbiology Group, Sydney, Australia, p. 381. 2003.
- VAN KESSEL, J. S., KARNS, J. S., GORSKI, L., MCCLUSKEY, B. J., PERDUE, M. L. Prevalence of Salmonellae, *L. monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 2822-2830, 2004.