



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**FORMAÇÃO DE BIOFILME E PERFIL DE RESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS E SANITIZANTES DE *Listeria monocytogenes*
ISOLADAS DE LEITE DE TANQUES DE EXPANSÃO**

FERNANDA MARIA LINO DE MOURA

**RECIFE-PE
2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**FORMAÇÃO DE BIOFILME E PERFIL DE RESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS E SANITIZANTES DE *Listeria monocytogenes*
ISOLADAS DE LEITE DE TANQUES DE EXPANSÃO**

FERNANDA MARIA LINO DE MOURA

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal Tropical.

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Sampaio de Medeiros (UFRPE)

**RECIFE-PE
2018**

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

M929f Moura, Fernanda Maria Lino de
Formação de biofilme e perfil de resistência a antimicrobianos e sanitizantes de *Listeria monocytogenes* isoladas de leite de tanques de expansão / Fernanda Maria Lino de Moura. – 2018.
85 f. : il.

Orientadora: Elizabeth Sampaio de Medeiros.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife, BR-PE, 2018.

Inclui referências.

1. Adesão bacteriana 2. Doenças transmitidas por alimentos
3. Listeriose 4. Micro-organismos patogênicos 5. Ordenha mecânica
6. Resistência 7. Saúde pública 8. Segurança de alimentos
I. Medeiros, Elizabeth Sampaio de, orient. II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

“Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.”

Fernanda Maria Lino de Moura

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elizabeth Sampaio de Medeiros (UFRPE)
Orientadora - Presidente

Profa. Dra. Alda Verônica de Souza Livera (UFPE)
Primeiro membro

Profa. Dra. Andréa Alice da Fonseca Oliveira (UFRPE)
Segundo membro

Profa. Dra. Erika Fernanda Torres Samico Fernandes Cavalcanti (UFRPE)
Terceiro membro

Profa. Dra. Maria Betânia de Queiroz Rolim (UFRPE)
Quarto membro

“Quando tudo nos parece dar errado, acontecem coisas boas que não teriam acontecido se tudo tivesse dado certo.”

Renato Russo

*À minha mãe Madalena Moura e à minha
“irmã” Luciana Moura pelo amor de
sempre. Por continuarem me guiando e
apoiando as minhas escolhas.*

Amo vocês, anjos da minha vida!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais esta conquista. Por me dar forças nos momentos difíceis e principalmente por me mostrar uma luz quando pensei que a única saída seria desistir.

À minha mãe Madalena Moura e à minha “irmã” Luciana Moura por tudo, por serem tão essenciais e incentivadoras em todas as etapas da minha vida acadêmica.

À amiga e irmã que ganhei durante a graduação, Yslane Carla. Por ser companhia e apoio em todos os momentos. Nós bem sabemos o que passamos ao longo desses anos na trajetória acadêmica. Nós conseguimos! Vencemos mais uma etapa, juntas.

A Ricardo Santos pela compreensão durante todo esse tempo dedicado ao doutorado. Principalmente pelo apoio nos momentos iniciais mais difíceis quando por muitas vezes me encorajou a não desistir.

À amiga que o mestrado me presenteou, Jacqueline Ellen, sempre solícita aos meus pedidos de socorro na parte experimental. Agradeço por ter sido o empurrão decisivo para a minha inscrição no doutorado.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical, especificamente ao prof. Anísio Soares e à profa Jaqueline Bianque, por me concederem a troca de orientação e por terem escolhido a profa Elizabeth Sampaio para dar continuidade.

À Helena Lôbo pelo acompanhamento imprescindível durante a troca de orientação. Você foi muito importante nessa fase.

À profa Elizabeth Sampaio por ter me recebido de olhos fechados e braços abertos. Obrigada por tudo, principalmente por ter confiado em mim e acreditado que daria certo. Sem o seu apoio provavelmente eu não teria continuado.

À Jéssica Martins, amiga que ganhei no momento conturbado da troca de orientação. Sem sua amizade e sua parceria na execução de nossos projetos com certeza teria sido bem mais difícil. Diante de tudo o que passamos tenho dúvidas se eu teria conseguido finalizar sem você.

À amiga Thayná Milena, nossa eterna mascotinha. Por ser companhia em todos os momentos e estar sempre disposta a ajudar. Com o nosso trio “Labzetes” tudo fica mais leve. Sem você também teria sido bem mais difícil.

A Marne Portela por ter mediado as coletas das amostras de leite nas propriedades leiteiras e aos produtores por terem colaborado para as coletas.

À Aila Peixoto e Karla Almeida pelo apoio em relação às coletas das amostras. Vocês foram muito importantes para a realização deste trabalho.

À Goretti Varejão e Roberta Estelita por toda a ajuda na parte experimental e pelos momentos de descontração no Laboratório de Inspeção de Carne e Leite (UFRPE).

Ao prof. Wilton Júnior, a Müller e a Marcos pela ajuda na leitura de resultados no Laboratório de Bacterioses (UFRPE).

A todos que torceram por mim, estando perto ou longe.

Por fim, a todos que eu não citei e que tenham contribuído para que fosse possível a realização deste trabalho.

FONTES FINACIADORAS

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior.

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Teste da caneca telada (A); Leite com grumos, caracterizando a ocorrência de mastite clínica (B). 22
- Figura 2.** Leite colocado na raquete utilizada no California Mastitis Test (A); Colocação do reagente (B); Homogeneização do conteúdo na raquete (C); Resultado negativo, leite sem viscosidade (D); Resultado positivo, leite com viscosidade (E). 23
- Figura 3.** Distribuição dos agentes etiológicos mais identificados em surtos de DTA no Brasil de 2000 a 2017. Fonte: Sinan/SVS, Brasil (2018). 28
- Figura 4.** Distribuição dos alimentos incriminados nos surtos de DTA no Brasil de 2000 a 2017. Fonte: Sinan/SVS, Brasil (2018). 29
- Figura 5.** Etapas de formação de biofilme microbiano. 40

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Perfil de resistência a antimicrobianos de *Listeria monocytogenes* isoladas de leite de tanques de expansão. 77
- Tabela 2.** Formação de biofilme e ação de sanitizantes utilizados no pré e pós-*dipping* sobre *Listeria monocytogenes* isoladas de leite de tanque de expansão. 79

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Produção leiteira no Brasil	16
2.2 Legislação no setor leiteiro nacional	17
2.3 Qualidade do leite no Brasil	18
2.4 Boas práticas na ordenha	21
2.5 Leite cru refrigerado	24
2.6 Psicotróficos na contaminação do leite cru refrigerado	26
2.7 <i>Listeria monocytogenes</i>	27
2.8 Mastite bovina por <i>Listeria monocytogenes</i>	30
2.9 Agentes sanitizantes no controle da mastite bovina	31
2.10 <i>Listeria monocytogenes</i> e a saúde pública	33
2.11 Antimicrobianos no tratamento da listeriose humana	36
2.12 Biofilmes microbianos	38
2.13 Biofilmes na área de alimentos	42
2.14 Resistência bacteriana a antibióticos e a sanitizantes	44
3. OBJETIVOS	47
3.1 Geral	47
3.2 Específicos	47
4. REFERÊNCIAS	48
5. ARTIGO I - <i>Listeria monocytogenes</i> em leites de tanques de expansão em municípios do estado de Alagoas – AL, Brasil.	62
6. ARTIGO II – <i>Listeria monocytogenes</i> formadoras de biofilme em tanque de expansão e perfil de resistência a antimicrobianos e sanitizantes.	72
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	85

RESUMO

Dentre os alimentos relacionados às doenças transmitidas por alimentos estão os lácteos, pois a qualidade do leite produzido em diversas regiões do Brasil ainda é insatisfatória, deixando-o sujeito a micro-organismos que afetam a produção leiteira e a saúde dos consumidores. Considera-se *Listeria monocytogenes* um sério problema na segurança de alimentos e diante da relevância da produção de leite no país e da obtenção de alimentos seguros, objetivou-se avaliar a formação de biofilme e o perfil de resistência a antimicrobianos e sanitizantes de *Listeria monocytogenes* isoladas de leite de tanques de expansão. As análises foram realizadas no Laboratório de Inspeção de Carne e Leite (LICAL) da UFRPE. Após isolamento e identificação a partir de características morfo-tintoriais e bioquímicas, colônias de *L. monocytogenes* foram submetidas a oito antimicrobianos, sendo estes penicilina G, ampicilina (10µg), cefalotina (30µg), cloranfenicol (30µg), ciprofloxacina (5µg), eritromicina (15µg), clindamicina (2µg) e tetraciclina (30µg), através do método de difusão em disco. Em seguida, realizou-se o teste de formação de biofilme utilizando-se placa de microdiluição de 96 poços e os isolados formadores de biofilme foram submetidos ao teste com os sanitizantes cloro a 2,5% e clorexidine a 2%. Detectou-se *Listeria monocytogenes* em 20% das amostras (6/30). Observou-se que 83,3% (5/6) e 16,6% (1/6) dos isolados apresentaram resistência e resistência intermediária a clindamicina, respectivamente e 16,6% (1/6) de resistência a cloranfenicol e eritromicina. 66,6% (4/6) dos isolados foram capazes de formar biofilme. Detectou-se ação mais eficaz do cloro em relação à capacidade de interferir nas células livres, pois em 50% (2/4) inibiu completamente a aderência e em 50% (2/4) a sua ação permitiu uma fraca aderência. O clorexidine permitiu aderência moderada em 100% dos isolados. Em relação ao biofilme consolidado o cloro foi 75% (3/4) mais eficaz na redução da aderência em relação ao clorexidine. Este trabalho foi pioneiro no isolamento de *Listeria monocytogenes* em leite proveniente de tanques de expansão individuais em municípios do estado de Alagoas. A ocorrência de *Listeria monocytogenes* nas amostras avaliadas representa um risco à saúde pública. A formação de biofilme e a resistência apresentada por estas cepas a produtos sanitizantes predispõem para a persistência deste micro-organismo na cadeia de produção de leite. Desta forma, faz-se necessário o monitoramento deste micro-organismo e da mastite no rebanho. Além disso, a realização de pré e pós-*dipping* de forma correta, a sanitização dos equipamentos e do tanque, a avaliação regular da eficiência dos sanitizantes utilizados e a coleta do leite pelo caminhão refrigerado no tempo adequado possuem relevância na garantia da qualidade do leite, sendo imprescindíveis para o fornecimento de alimentos seguros à população. A ocorrência de cepas resistentes a antimicrobianos pode comprometer o tratamento da listeriose humana. Evidencia-se a necessidade de realização de testes com antimicrobianos e de aderência periodicamente para monitoramento do perfil de resistência e da formação do biofilme por parte deste micro-organismo, com o intuito de promover o controle da *Listeria monocytogenes* no rebanho e de prevenir a contaminação do leite por micro-organismos patogênicos.

Palavras-chave: Adesão bacteriana; Doenças transmitidas por alimentos; Listeriose; Micro-organismos patogênicos; Ordenha mecânica; Resistência; Saúde pública; Segurança de alimentos.

ABSTRACT

Among foods related to foodborne diseases are dairy products, since the quality of milk produced in several regions of Brazil is still unsatisfactory, leaving it subject to microorganisms that affect milk production and consumer health. *Listeria monocytogenes* is considered a serious problem in food safety and due to the importance of milk production in the country and the obtaining of safe food, the objective to evaluate the biofilm formation and antimicrobial resistance profile and sanitizers of *Listeria monocytogenes* isolated from milk from expansion tanks. The analyzes were carried out at the Meat and Milk Inspection Laboratory (LICAL) of UFRPE. After isolation and identification from morpho-tinctorial and biochemical characteristics, *L. monocytogenes* colonies were submitted to eight antimicrobials: penicillin G (10U), ampicillin (10µg), cephalothin (30µg), chloramphenicol (30µg), ciprofloxacin 5µg), erythromycin (15µg), clindamycin (2µg) and tetracycline (30µg) by the disc diffusion method. Then, the biofilm formation test was performed using a 96-well microdilution plate and the biofilm forming isolates were tested with 2.5% chlorine sanitizers and 2% chlorhexidine. *Listeria monocytogenes* were detected in 20% of the samples (6/30). It was observed that 83.3% (5/6) and 16.6% (1/6) of the isolates presented resistance and intermediate resistance to clindamycin, respectively, and 16.6% (1/6) resistance to chloramphenicol and erythromycin. 66.6% (4/6) of the isolates were able to form biofilm. It was detected a more effective action of chlorine in relation to the ability to interfere in the free cells, because in 50% (2/4) it completely inhibited the adhesion and in 50% (2/4) its action allowed a poor adherence. Chlorhexidine allowed moderate adherence in 100% of the isolates. In relation to the consolidated biofilm, chlorine was 75% (3/4) more effective in reducing adherence to chlorhexidine. This work was pioneer in the isolation of *Listeria monocytogenes* in milk from the individual expansion tanks existing in the municipalities of Alagoas State. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in the samples evaluated represents a risk to public health. The biofilm formation and the resistance presented by these strains to sanitizing products predispose to the persistence of this microorganism in the milk production chain. Thus, it is necessary to monitor this microorganism and mastitis in the herd. In addition, the correct pre and post-dipping, the sanitation of the equipment and the tank, the regular evaluation of the efficiency of the sanitizers used and the collection of the milk by the truck refrigerated in the appropriate time have relevance in the guarantee of milk quality, being essential for the provision of safe food to the population. The occurrence of antimicrobial resistant strains may compromise the treatment of human listeriosis. It is evidenced the need to carry out antimicrobial tests and adhesion periodically to monitor the profile of resistance and biofilm formation by this microorganism, in order to promote the control of *Listeria monocytogenes* in the herd and to prevent contamination of milk by pathogenic microorganisms.

Key words: Bacterial adhesion; Foodborne diseases; Listeriosis; Pathogenic microorganisms; Mechanical milking; Resistance; Public health; Food safety.

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2013), a produção de leite no Brasil é um dos setores mais importantes para a economia do país. No ano de 2015 esta produção, estimada em 34 bilhões de litros, situou o Brasil no quarto lugar do ranking mundial de países produtores como Estados Unidos, Rússia, China, Argentina, México, dentre outros (IBGE, 2016a).

Porém, a qualidade do leite cru produzido em diversas regiões do Brasil ainda é considerada insatisfatória e isto se relaciona à presença de micro-organismos. Fatores como a má qualidade da água utilizada, higienização deficiente de utensílios e equipamentos de ordenha e dos tanques de refrigeração, além da estocagem em temperaturas inadequadas, corroboram a contaminação do leite e favorecem à ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTA) (ZENI et al., 2013; ÂNGELO et al., 2014).

Visando reformular a normatização da produção, estabelecer novos critérios e parâmetros de identidade e qualidade do leite desde a ordenha, substituindo a IN nº 51/2002, em 29 de dezembro de 2011, entrou em vigor a Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011), com prazos distintos de adequação que ocorrem ao longo dos anos para que todos os envolvidos se enquadrem nas exigências para melhorar a qualidade do leite e de seu produtos.

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2017) relata que uma em cada 10 pessoas adoece no mundo por ano devido a alguma DTA. De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2018), foram notificados 12.503 casos de surtos alimentares no país do ano de 2000 a 2017, sendo o leite e seus derivados relacionados a 3,21% dos casos.

Dentre estas doenças a listeriose é uma zoonose considerada questão de saúde pública crescente. É ocasionada pela *Listeria monocytogenes*, patógeno psicrotófico que, além de possuir ampla distribuição no ambiente, tolerar condições de anaerobiose e sucessivos processos de congelamento e descongelamento, suporta uma ampla faixa de temperatura, entre -0,4 a 50°C, o que favorece a sua multiplicação em tanques de refrigeração de leite (LIU, 2006; HARTMANN et al., 2009; CDC, 2017).

Em humanos *L. monocytogenes* pode causar desde sintomas gastrintestinais até infecções graves decorrentes de sua forma invasiva, tais como meningite, encefalite, endocardite e pneumonia. Em gestantes pode causar aborto, morte fetal, nascimento prematuro, septicemia e meningite neonatal (PARIHAR et al., 2008; FAI et al., 2011).

Diversos estudos têm relatado a presença deste micro-organismo em leite proveniente de tanques de refrigeração de leite, como no estudo realizado por Botsaris et al. (2016), sobre a prevalência de *L. monocytogenes* em tanques do Chipre. Assim, destaca-se a importância desse patógeno para a saúde pública.

Geralmente no tratamento da listeriose a *L. monocytogenes* mostra-se sensível à maioria das drogas empregadas no combate a bactérias gram-positivas, porém, observa-se um aumento no número de cepas resistentes, comprovando a importância do monitoramento do perfil de resistência deste micro-organismo a antimicrobianos (SAKARIDIS et al., 2011; WANG et al., 2013).

Devido a capacidade de formar biofilmes, estando presente nas etapas de produção de alimentos, este micro-organismo pode ter difícil eliminação, tornando-se mais resistente aos produtos utilizados para a limpeza e sanitização. Isto se dá em decorrência da formação da matriz exopolimérica que funciona como uma barreira protetora e dificulta a interação de agentes sanitizantes (CAIXETA et al., 2012; GRANDI, 2015).

No Brasil ainda não há a notificação oficial da listeriose humana, porém, na Europa dados foram estatisticamente registrados, destacando a necessidade de estudos relacionados à presença de *L. monocytogenes* em alimentos, assim como de sua investigação na cadeia produtiva (EFSA, 2015; BOTSARIS, 2016).

Diante do exposto, considerando a relevância da produção de leite no país, assim como a importância da obtenção de alimentos seguros, torna-se importante pesquisar *Listeria monocytogenes* em leites provenientes de tanques de expansão, assim como avaliar o perfil de resistência das cepas a sanitizantes e antimicrobianos e a capacidade de formação de biofilmes, já que este micro-organismo pode comprometer a qualidade final do produto, acarretar problemas econômicos, e representa um risco à saúde pública.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção leiteira no Brasil

A pecuária e as cadeias produtivas derivadas dela desempenham papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda e a presença da bovinocultura em todos os estados brasileiros evidencia a importância econômica e social desta atividade (BRASIL, 2013; ALAGOAS, 2017).

Ao longo das últimas décadas a produção de leite tem crescido com taxas superiores à do Produto Interno Bruto, denotando que tal comportamento histórico do setor tem superado a média da economia brasileira (CARVALHO e COSTA, 2016).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017), no ano de 2016 foram captados 23,17 bilhões de litros de leite por usinas de beneficiamento que atuam sob algum tipo de serviço de inspeção sanitária (Federal, Estadual ou Municipal), e no terceiro trimestre de 2017, esta captação situou-se em 6,16 bilhões de litros.

A produção de leite movimenta a economia de pequenas cidades, ajuda na distribuição de renda e gera emprego, principalmente no meio rural (EMBRAPA, 2011a). Entretanto, mesmo o país possuindo destaque no setor leiteiro, os sistemas de produção são heterogêneos, com baixo nível de produtividade e tecnologia. Estima-se que 90% dos produtores são considerados pequenos, com baixo volume de produção diária, baixa produtividade por animal e pouco uso de tecnologias (ALAGOAS, 2017).

Apesar de alguns grupos de produtores serem eficientes, a produção média das vacas no Brasil é em torno de 1609 litros/vaca/ano, e a maioria continua com baixos índices de eficiência técnica e econômica (IBGE, 2016b).

Em um cenário mundial o setor leiteiro vem passando por mudanças que indicam uma acelerada modernização tecnológica nos processos de produção. Porém, a cadeia produtiva do país ainda enfrenta obstáculos na obtenção do leite, principalmente em relação às condições higiênico-sanitárias (FREITAS et al., 2005; EMBRAPA, 2011a).

As características da produção de leite no país dificultam o seu desenvolvimento, pois, por ser realizada predominantemente por pequenos produtores estes geralmente investem pouco na atividade. Além disso, possuem baixo conhecimento técnico, resultando em falta de controle sanitário dos animais e pouca higiene durante a ordenha, conservação e transporte do leite (NERO et al., 2009).

A cadeia de produção do leite envolve fatores determinantes da qualidade, segurança e integridade que incluem desde o solo da fazenda de produção, passando pela água, alimentos do gado, estado sanitário do rebanho e de cada vaca em lactação, práticas de ordenha, armazenamento na fazenda, nível socioeconômico do produtor, transporte, beneficiamento na indústria, até o ponto de venda e o destino final (DERETI e BONNET, 2017).

2.3 Legislação no setor leiteiro nacional

Juntamente com os atores da cadeia produtiva do leite, o Brasil vem tentando modernizar o setor através de atualizações referentes à legislação que atende esse nicho mercadológico. Assim, em um breve resumo histórico, pode-se começar citando o Decreto nº 30.691 assinado em 29 de março de 1952, aprovando Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Publicado no Diário Oficial da União, na data de 07 de julho de 1952, com seus quase 1000 artigos, consolidou o primeiro código higiênico-sanitário do Brasil (BRASIL, 2017b).

Com o intuito de melhorar a qualidade do leite produzido no Brasil, iniciou-se na década de 1990 a estocagem do leite cru refrigerado. Em 1996 foi formado um grupo de trabalho na Embrapa Gado de Leite, integrado por pesquisadores, universidades e representantes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com o objetivo de elaborar diagnósticos e formular estratégias para melhoria da qualidade do leite, caracterizando a elaboração do Programa Nacional da Qualidade do Leite (PNQL) (DURR, 2004).

A partir disso, regulamentando a estocagem do leite cru refrigerado, foi publicada pelo MAPA a Instrução Normativa IN nº 51/2002 (BRASIL, 2002), aprovando Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado, do leite cru refrigerado e da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Assim, reduzindo os prejuízos por deterioração do leite por atividade acidificante das bactérias mesófilas.

Anteriormente a publicação da IN nº 51/2002 não havia no Brasil padrões mínimos de CCS (Contagem de Células Somáticas) e de CBT (Contagem Bacteriana Total) para o leite tipo C e exigência legal de resfriamento do leite na fazenda. Desta forma, esta Instrução Normativa estabeleceu um calendário de redução gradual destes

limites, objetivando colocar os critérios mínimos de qualidade do leite cru do Brasil em condições de igualdade aos de países da Europa e dos EUA (VILELA, 2016).

Visando reformular a normatização da produção, estabelecer novos critérios e parâmetros de identidade e qualidade do leite, substituindo a IN nº 51/2002, em 29 de dezembro de 2011, entrou em vigor a Instrução Normativa nº 62 também do MAPA aprovando os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do leite tipo A, do leite cru refrigerado, do leite pasteurizado e da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Assim, prorroga os prazos e limites para a redução de CBT e CCS até o ano de 2016 e suprime os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos leites tipos B e C (BRASIL, 2011).

Em 3 de maio de 2016, o MAPA publicou a IN nº 7, que altera a IN nº 62/2011, estendendo os prazos em relação à CCS e CBT em leite cru refrigerado. Com isso, as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste deverão se adequar às normas relacionadas à CBT e CCS até 2018, e as regiões Norte e Nordeste em 2019 (BRASIL, 2016).

Após várias modificações e atualizações, em 29 de março de 2017, entrou em vigor o Decreto nº 9.013, que Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, e revoga o Decreto nº 30.691/1952 (BRASIL, 2017a).

De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), leite é, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. Assim, o leite de outras espécies deve ser denominado de acordo com a espécie da qual proceda (BRASIL, 2017a).

2.4 Qualidade do leite no Brasil

Qualidade, segurança e integridade são conceitos por si só desafiadores devido a sua abrangência e complexidade sob o ponto de vista da ciência de alimentos; e o desafio torna-se maior quando esses conceitos se aplicam aos produtos lácteos (DERETI e BONNET, 2017).

Além de garantir a segurança do produto ao consumidor, o controle de qualidade do leite visa estabelecer um sistema de produção em que seja preconizada a obtenção de um produto competitivo, capaz de atender às exigências do mercado (ROSA et al., 2017).

Basicamente o leite para ser considerado de qualidade, ou seja, seguro para a saúde daqueles que o consomem, deve apresentar as seguintes características: baixas contagens bacterianas; ausência de micro-organismos patogênicos; ausência de resíduos de medicamentos veterinários; mínima contaminação com produtos químicos ou toxinas microbianas (GRACINDO e PEREIRA, 2010).

Estudos preliminares apontam que o grau de tecnificação da produção do leite nas propriedades está diretamente relacionado à sua qualidade (TAFFAREL et al., 2013), portanto, pode-se dizer que o leite cru produzido por pequenos produtores brasileiros pouco tecnificados apresenta baixa qualidade microbiológica (NERO et al., 2007; BELOTI et al., 2011; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2013).

Desta forma, a qualidade do leite cru produzido no Brasil ainda é um sério problema na produção de derivados lácteos, já que a matéria-prima deve apresentar qualidade microbiológica boa ou satisfatória a fim de oferecer maior rendimento industrial e gerar derivados nobres. Além disso, um produto com alta qualidade proporciona o aumento da lucratividade de indústrias e cooperativas, fato esse que deve beneficiar também ao produtor (CASTRO et al., 2014; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2014).

Um dos parâmetros analisados para verificação da qualidade do leite é o seu perfil microbiológico, que pode ser caracterizado por micro-organismos indicadores de higiene e patogênicos (PEREIRA, 2010).

Dentre os indicadores, a pesquisa do grupo coliforme também é importante tanto na matéria-prima como na água, pois indica falhas higiênico-sanitárias grosseiras ao longo do processo produtivo, visto estar associado à contaminação fecal recente, direta ou indireta. Além de serem os coliformes deteriorantes em si, indicam a possível presença de patógenos entéricos graves como *Salmonella* spp. (DERETI e BONNET, 2017).

Os aeróbios mesófilos são de extrema importância no ambiente de ordenha e estão amplamente difundidos no ambiente. Altas contagens estão associadas às falhas na higienização dos equipamentos, no manejo da ordenha ou problemas na refrigeração do leite (RIBEIRO NETO et al., 2012).

Em relação aos patogênicos, as bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. podem ser encontradas na pele dos tetos, camas, mãos do ordenhador, equipamentos e utensílios de ordenha. O grupo é composto por uma variedade de espécies associadas a infecções em seres humanos e animais (PHILPOT e NICKERSON, 1991).

A qualidade microbiológica do leite cru é então relacionada ao número inicial de bactérias existentes no úbere do animal e no ambiente externo no ato da ordenha

(RODRIGUES et al., 2013). Vários aspectos devem ser levados em consideração, como a qualidade da água utilizada na desinfecção de equipamentos, de ordenha e do animal, uso correto de sanitizantes, higiene do ordenhador e das instalações (LANGONI, 2013; SILVEIRA e BERTAGNOLLI, 2014).

Outros fatores contribuem para que o leite apresente baixa qualidade, tais como localização geográfica, relacionada à distância entre o local de coleta e o de beneficiamento e a temperatura em que o leite permanece em todo o trajeto (ZENI et al., 2013).

Componentes do leite como proteínas, carboidratos, lipídeos, minerais e vitaminas, constituem um ótimo substrato para o crescimento de vários grupos de micro-organismos (SOUZA et al., 2009; YAMAZI et al., 2010). Quando obtido ou processado em condições higiênico-sanitárias não satisfatórias, o leite pode propiciar a multiplicação de micro-organismos deterioradores que diminuem a sua qualidade e a sua vida de prateleira e, conseqüentemente de seus derivados, além de veicular micro-organismos patogênicos (MIGUEL et al., 2014).

Utilizada para avaliar a qualidade do leite, a contagem total de bactérias, ou Contagem Bacteriana Total (CBT), é o número de bactérias contidas no leite e reflete a higiene do animal, do ambiente, dos equipamentos, dos procedimentos de ordenha e do resfriamento. Esta contagem é de extrema importância já que, considerando o potencial de se multiplicarem, as bactérias do leite podem causar alterações, tais como a degradação de gorduras, proteínas ou carboidratos, podendo tornar o produto impróprio para o consumo e processamento industrial (EMBRAPA, 2011b).

Já como indicativo da sanidade da glândula mamária utiliza-se a Contagem de Células Somáticas (CCS) do leite, por estas se tratarem de células de defesa no combate de agentes causadores de mastite ou células de descamação do epitélio glandular. Uma alta contagem destas células no leite indica que provavelmente existe infecção em pelo menos um quarto mamário do úbere (PHILPOT e NICKERSON, 1991; ROSA et al., 2009).

A CCS é um exame laboratorial específico que expressa o número de células somáticas por mililitro de leite. Analisada individualmente é um método de diagnóstico da mastite subclínica, porém quando analisada no leite proveniente de tanques de expansão pode servir como indicativo do padrão de qualidade do leite cru (WICKSTRÖM et al., 2009; EMBRAPA, 2011b).

Em relação ao leite cru refrigerado, além do CCS e CBT, deve-se atender também os requisitos físico-químicos, como gordura, densidade relativa, acidez titulável, índice crioscópico e proteína, análises que colaboram para a correção de falhas na obtenção do leite (BRASIL, 2011).

Apesar da IN nº62/2011 do MAPA (BRASIL, 2011) ter entrado em vigor no Brasil, ainda se verificam propriedades com baixa eficiência produtiva e altas contagens de CCS e CBT (ROSA et al., 2017). Apenas com a vigência da legislação sem associação com outras medidas em relação aos sistemas de inspeção, capacitação do produtor, assistência técnica e pagamento por qualidade, não houve a melhoria esperada (SILVA, 2016). Assim a IN nº 7/2016 do MAPA (BRASIL, 2016) representa uma nova tentativa de adequação aos valores de CCS e CBT em leite cru refrigerado e de melhorar a qualidade do leite produzido no Brasil.

Não há diferença entre o leite ordenhado manualmente e o leite ordenhado mecanicamente no que diz respeito à qualidade, sendo a escolha pelo tipo de ordenha baseada em informações como infraestrutura da propriedade, número de animais, produtividade animal (kg/dia de leite) e número de funcionários (EMBRAPA, 2011b).

De forma geral o controle higiênico-sanitário dos rebanhos, a obtenção do leite de vacas sadias e em condições higiênicas adequadas, o seu resfriamento no tempo e temperatura adequados e um manejo adequado da ordenha até a indústria são medidas fundamentais e primárias para garantir a qualidade e a segurança do leite e de seus derivados (ARCURI et al., 2006; ALMEIDA et al., 2013).

2.5 Boas práticas na ordenha

Durante o processo de ordenha uma série de práticas devem ser observadas visando a sanidade do úbere da vaca, um menor número de descarte de vacas com mastite, menor gasto com medicamentos e assistência veterinária para o rebanho, assim como a produção do leite de forma higiênica, dentre outros benefícios que favorecem a boa qualidade do leite (EMBRAPA, 2008).

Neste sentido, as boas práticas de ordenha envolvem obrigatoriamente três fatores: o ordenhador, o ambiente em que os animais permanecem antes, durante e depois da ordenha, e a rotina de ordenha. Aconselha-se que seja realizada uma “linha de ordenha”, ou seja, começar com os animais sadios e depois seguir com aqueles que apresentam mastite subclínica, de forma a auxiliar o controle da doença (ZAFALON et al., 2008).

Além disso, Rosa et al. (2009) descrevem que com a finalidade de evitar a transmissão da mastite contagiosa no momento da ordenha, deve-se iniciar com vacas primíparas sem mastite, seguindo-se com vacas pluríparas que nunca tiveram mastite; vacas que já tiveram mastite, mas que foram curadas; vacas com mastite subclínica; e por último, vacas com mastite clínica.

De acordo com Oliveira (2011), a rotina básica do manejo pré e pós-ordenha consiste nas seguintes etapas: teste da caneca telada, *pré-dipping*, secagem dos tetos e *pós-dipping*. Assim, no teste da caneca telada retira-se, manualmente, três jatos de leite de cada teto, direcionando-os para uma caneca telada a fim de verificar a ocorrência de mastite clínica (Figura 1). No *pré-dipping* há a imersão de cada teto em solução antisséptica apropriada, deixando agir por 30 segundos antes da secagem dos tetos, que deve ser feita com papel toalha descartável, um para cada teto. Para finalizar, no *pós-dipping* há imersão de cada teto em solução antisséptica apropriada logo após o término da ordenha.



Figura 1: Teste da caneca telada (A); Leite com grumos, caracterizando a ocorrência de mastite clínica (B).

O *pré-dipping*, procedimento de desinfecção dos tetos antes da ordenha, tem como objetivo a prevenção da mastite ambiental, já o *pós-dipping*, procedimento de desinfecção dos tetos após a ordenha, tem como finalidade a proteção dos tetos contra microorganismos causadores da mastite (ROSA et al., 2009). Segundo Acosta et al. (2016), nos dois processos necessita-se de conhecimento por parte do responsável pela ordenha para que de fato seja reduzida a carga microbiana no *pré-dipping* e para que se evite a contaminação do úbere no *pós-dipping*.

Após o *pré-dipping* deve-se secar criteriosamente as tetas para evitar a transferência de resíduos dos produtos utilizados para o leite. Além disso, deve-se proceder o *pós-dipping* imediatamente após a ordenha e manter os animais em pé por

tempo suficiente para que o esfíncter da teta volte a fechar, recomendando-se oferecer a alimentação no cocho (BRASIL, 2011).

Além do teste da caneca telada, outros testes podem ser realizados antes do início da ordenha, como o California Mastitis Test (CMT) e a contagem de células somáticas (CCS). O CMT é utilizado para o diagnóstico da mastite subclínica, além de fazer uma estimativa do número de células somáticas do leite proveniente das glândulas mamárias. Já a contagem de células somáticas (CCS) é um teste geralmente realizado nas unidades de beneficiamento, porém pode ser feito na fazenda, já que é um indicador da qualidade do leite (ROSA et al., 2009). A CCS é usada como ferramenta para avaliação e monitoramento da saúde do úbere nos programas de controle e prevenção de mastite em vários países (EMBRAPA, 2011b).

Para a realização do CMT, utiliza-se um equipamento chamado de raquete e um reagente composto por um detergente e um indicador de pH, que atua sobre os leucócitos e outras células presentes no leite causando o rompimento da parede celular. A partir disso há liberação do material genético das células, promovendo a formação de viscosidade da mistura do leite com o reagente, como pode-se observar na Figura 2. Quanto maior for a quantidade de células somáticas no leite, tanto maior será a viscosidade da mistura (ZAFALON et al., 2008).

A leitura do CMT leva em consideração a reação do leite na presença do reagente e o diagnóstico deve ser sempre realizado por pessoa capacitada, sob orientação de um veterinário. As reações observadas no teste variam de negativo, falso positivo a positivo, sendo este último representado pela presença de cruze: (+) fracamente positivo, (++) positivo e (+++) fortemente positivo (ROSA et al., 2009).



Figura 2: Leite colocado na raquete utilizada no California Mastitis Test (A); Colocação do reagente (B); Homogeneização do conteúdo na raquete (C); Resultado negativo, leite sem viscosidade (D); Resultado positivo, leite com viscosidade (E).

Quando a obtenção do leite é feita por meio de ordenhadeira mecânica, se a colocação das teteiras não for bem feita, pode comprometer todas as etapas posteriores,

inclusive a qualidade do leite. Além disso, o tempo decorrido do momento em que o animal entra na sala de ordenha até a colocação das teteiras deve ser o menor possível, sendo o recomendável que o tempo entre a estimulação dos tetos até a colocação das unidades de ordenha seja de aproximadamente um minuto (ZAFALON et al., 2008).

A limpeza do equipamento de ordenha e do equipamento de refrigeração do leite deve ser feita de acordo com instruções do fabricante, usando-se material e utensílios adequados, bem como detergentes inodoros e incolores (BRASIL, 2011). A rotina de limpeza eficiente deve ocorrer imediatamente após a ordenha, para remover totalmente os resíduos de leite (principalmente a gordura), e ainda as bactérias ou leveduras. A temperatura e o pH das soluções de limpeza são muito importantes para determinar a eficiência na higiene (EMBRAPA, 2011b).

A higiene pessoal dos ordenhadores é outro fator importante, pois de acordo com estudo desenvolvido por Molineri et al. (2012), sobre a associação entre práticas de ordenha e contagem de bactérias psicotróficas em leite de tanque a granel, fazendas onde os ordenhadores não lavavam as mãos durante o período de ordenha foram mais propensas a apresentarem maior contagem de psicotróficos.

Tratando-se de ordenha mecânica, é necessário ainda trocar periodicamente as borrachas que entram em contato com o leite, tais como as mangueiras curtas, as mangueiras longas e principalmente as teteiras, as quais, quando gastas e envelhecidas, podem fazer com que os tetos não sejam massageados corretamente, causando congestão e edema com conseqüente aparecimento de lesões. O uso constante de produtos químicos durante a lavagem do sistema provoca pequenas rachaduras nas borrachas e essas aumentam progressivamente (OLIVEIRA, 2011).

A aplicação de Boas Práticas de Produção (BPP) ou Agropecuárias (BPA) ou de Fabricação (BPF) e o sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) na bovinocultura leiteira são uma alternativa para minimizar os riscos de contaminação nas diferentes etapas do processo de produção. Visando a exclusão, remoção, eliminação, inibição da multiplicação de micro-organismos indesejáveis e/ou corpos estranhos, devem ser implantadas em toda cadeia produtiva (VALLIN et al., 2009).

2.5 Leite cru refrigerado

Entende-se por leite cru refrigerado o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas, descansadas;

refrigerado e mantido em temperatura igual ou inferior a 4°C, transportado em carro tanque isotérmico da propriedade rural para um posto de refrigeração de leite ou estabelecimento industrial adequado, para ser processado (BRASIL, 2011). O tanque refrigerador de leite a granel é o equipamento para refrigeração a granel e armazenagem a granel de leite cru fresco, até o seu transporte pelo carro isotérmico (BRASIL, 2016).

De acordo com a Instrução Normativa IN nº 53/2002, do MAPA, o tanque e os equipamentos associados deverão ser projetados de maneira a fornecer resistência mecânica suficiente para permitir seu transporte e manuseio e proporcionar uma operação satisfatória e segura sob condições normais. Também deverão ser construídos de forma a evitar qualquer contaminação do leite e qualquer corrosão dos materiais constitutivos e de maneira tal que a limpeza, desinfecção e inspeção sejam realizadas sem dificuldade (BRASIL, 2016).

Assim, no transporte a granel, o leite vai diretamente do tanque de refrigeração por expansão direta até o tanque localizado no caminhão. São requisitos deste processo a existência de local próprio e específico para a instalação do tanque de refrigeração e para a armazenagem do leite (ZAFALON, 2008).

No entanto, a manutenção da qualidade desses produtos torna-se um desafio, pois não se pode garantir um produto com vida útil prolongada se não for dada atenção à produção e à estocagem da matéria-prima (ZENI et al., 2013).

O crescimento do setor de lácteos fez surgir a necessidade do armazenamento prolongado, possibilitando a redução de custos operacionais de produção e evitando perdas dessa matéria-prima pela atividade acidificante de bactérias mesófilas, responsáveis pela acidificação e instabilidade térmica das proteínas do leite (MARTINS et al., 2005).

Porém, o armazenamento por períodos prolongados sob refrigeração em torno de 4-7°C, pode resultar em queda de qualidade dos produtos lácteos, pois permite o crescimento de micro-organismos psicrotróficos, os quais produzem enzimas termorresistentes que continuam agindo mesmo após a pasteurização e o tratamento UHT (SANTANA et al., 2001; ZENI et al., 2013).

Desta forma, além do grau de contaminação inicial e do binômio tempo/temperatura em que o leite permanece desde a ordenha até o processamento, as condições higiênico-sanitárias de obtenção e armazenamento do leite, assim como o transporte até o seu posterior beneficiamento na fábrica de laticínios exercem grande influência na sua qualidade (PEREIRA et al., 2010).

2.6 Psicrotróficos na contaminação do leite cru refrigerado

Os principais gêneros de bactérias psicrotróficas relacionadas à contaminação do leite cru refrigerado normalmente não são patogênicos, como por exemplo, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*. Entretanto, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* são associadas a doenças transmitidas por alimentos (DTA) após consumo de leite ou produtos lácteos contaminados (BRITO, 2003).

Bactérias psicrotróficas apresentam capacidade de crescimento em temperaturas em torno de 7°C, seja qual for sua temperatura ótima de crescimento. Os psicrotróficos encontrados no leite podem ser de várias origens, como ambientais, provenientes do solo, água, vegetação, teto/úbere e de equipamentos de ordenha higienizados inadequadamente (SANTANA et al., 2001; SHIRAI, 2010).

Assim, de acordo com a Instrução Normativa nº 62/2011, do MAPA (BRASIL, 2011), em se tratando de tanque de refrigeração por expansão direta, é preconizado que este deve ser dimensionado de modo tal que permita refrigerar o leite até temperatura igual ou inferior a 4°C no tempo máximo de 3 horas após o término da ordenha, independentemente de sua capacidade. Além disso, deve haver local próprio e específico para a instalação do tanque de refrigeração e armazenagem do leite, e este deve ser mantido sob condições adequadas de limpeza e higiene.

Os psicrotróficos são termolábeis, porém apresentam a capacidade de produzir diversas exoenzimas termorresistentes, lipases e proteases, responsáveis por grandes perdas econômicas e problemas tecnológicos para a indústria, pois as enzimas proteolíticas e lipolíticas produzidas por esse grupo de micro-organismos estão relacionadas à perda de qualidade e à redução de vida de prateleira do leite UHT e de outros lácteos (SORHAUG e STEPANIAK, 1997; ZENI et al., 2013).

A termorresistência dessas enzimas dá-se pela capacidade de reorganização da estrutura terciária, danificada durante a pasteurização, tornando-as ativas, sendo assim capazes de deteriorar os alimentos. Lipases hidrolisam a gordura do leite promovendo a liberação de ácidos graxos de cadeia curta, com produção de sabor e odores desagradáveis no leite, e proteases degradam caseína causando cor cinzenta, sabor amargo, além de gelificação de produtos submetidos à esterilização (BRAUN e SUTHERLAND, 2005).

Como medida preventiva, de acordo com a IN 62/2011 (BRASIL, 2011), o tempo transcorrido entre a ordenha inicial e seu recebimento no estabelecimento que vai

beneficiá-lo deve ser no máximo de quarenta e oito horas, recomendando-se como ideal um período de tempo não superior a vinte e quatro horas.

Porém, segundo Brito et al. (2003) a coleta a granel e o consequente armazenamento nas indústrias, em alguns casos, faz com o leite seja processado apenas em alguns dias depois da ordenha, e esse período de estocagem, sob refrigeração, leva ao aumento no número dos micro-organismos psicrotróficos.

Além da multiplicação de psicrotróficos, práticas higiênico-sanitárias inadequadas podem promover a formação de biofilmes em tanques de armazenamento, favorecendo a persistência de micro-organismos no local (FRANCO et al., 2000; HAUN, 2004).

2.7 *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* spp. é composto por seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshmeri*, *L. seeligeri* e *L. grayi*, com 16 sorovares, sendo 15 antígenos somáticos “O” e cinco antígenos flagelares “H”. Apenas a *L. monocytogenes* é considerada consistentemente patogênica para o homem, embora infecções ocasionais por outras espécies venham sendo relatadas (CHAMBEL et al. 2007; HITCHINS, 2012).

Listeria monocytogenes, um micro-organismo psicrotrófico, caracteriza-se por pequenos bastonetes gram-positivos, não formadores de esporos e de cápsula, anaeróbios facultativos e móveis a 30°C, devido à presença de flagelos peritríquios. Por ser um micro-organismo ubíquo, o solo é um nicho crucial para sua persistência e transmissão para plantas e animais, favorecendo assim a contaminação de alimentos (VIVANT et al., 2013).

É geralmente patogênica, com um genoma de aproximadamente 2,94 Mbp (GLASER et al., 2012). Existem 13 diferentes sorotipos de *L. monocytogenes*, mas apenas três (1/2a, 1/2b, 4b) têm sido frequentemente isolados em doenças humanas (NELSON et al., 2004).

Este micro-organismo suporta uma ampla faixa de pH (4.7-9.2), altas concentrações de sal (10-12 %), suportando 25,5% de NaCl e baixas temperaturas (-0,4 a 50 °C). Além de se multiplicar com crescimento ótimo a 30-37 °C e possuir atividade de água ótima de >0,97, com a mínima variando entre 0,90 - 0,93 (LIU, 2006; HARTMANN et al., 2009).

As espécies de *Listeria* spp. podem ser encontradas em animais domésticos e selvagens, insetos, solo, esgoto e vegetação. Além disso, são disseminadas nas fezes de

animais portadores, podendo também ser isoladas das fezes de indivíduos saudáveis (JEMMI e STEPHAN, 2006; RAMASWAMY et al., 2007).

Caracterizando-se como intracelular facultativo, resiste à morte intracelular quando é fagocitada pelos macrófagos. Além disso, possui a capacidade de invadir e se multiplicar em vários tipos de células pela produção de fatores de virulência, os quais são codificados cromossomicamente e estão organizados em ilhas de patogenicidade (LIU et al., 2006; ALHO, 2012).

Em estudo desenvolvido por Kramarenko et al. (2013), que ao estudarem a prevalência de *Listeria monocytogenes* em alimentos na Estônia, observou-se 2,6% de amostras contaminadas (554/21.574), sendo dentre elas, carne (18,7%), leite (18,1%) e peixe (8,8%). Andrade (2018) pesquisou a presença de *L. monocytogenes* em presuntos fatiados obtidos em supermercados da cidade do Recife-PE, e identificou o micro-organismo em 25% (10/40) do total de amostras analisadas.

Nos EUA a *Listeria monocytogenes* está entre os principais patógenos que causam 9,4 milhões de casos de doenças transmitidas por alimentos anualmente. Porém, no Brasil não se tem estes dados oficialmente (BARANCELLI et al., 2011; SCALLAN et al., 2011).

De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2018), dentre os agentes etiológicos mais identificados em surtos de DTA nos anos de 2000 a 2017 estão as bactérias, porém, não há dados relacionados à *L. monocytogenes*, como pode-se observar na Figura 3.

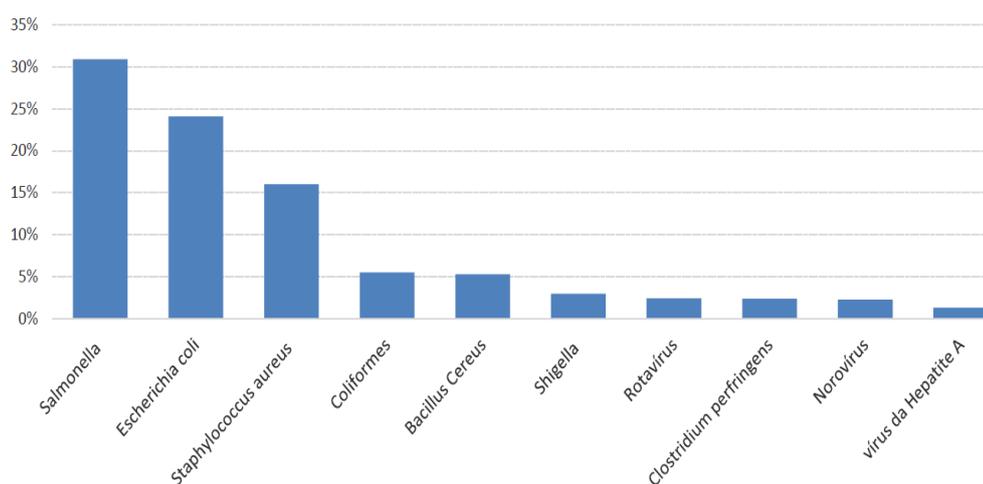


Figura 3: Distribuição dos agentes etiológicos mais identificados em surtos de DTA no Brasil de 2000 a 2017. Fonte: Sinan/SVS, Brasil (2018).

Entretanto, diversos estudos no Brasil demonstram a ocorrência de *L. monocytogenes* em alimentos de origem animal, incluindo os lácteos. Como exemplo, Barancelli (2010), pesquisando *Listeria monocytogenes* em indústrias de queijo do estado de São Paulo-SP, isolou *L. monocytogenes* em amostras de leite cru, leite pasteurizado e queijos. Nesse contexto, os lácteos possuem destaque no desencadeamento de DTA no país, e isto pode ser comprovado na Figura 4, que ilustra os alimentos mais incriminados em casos de surtos de 2000 a 2017 (BRASIL, 2018).

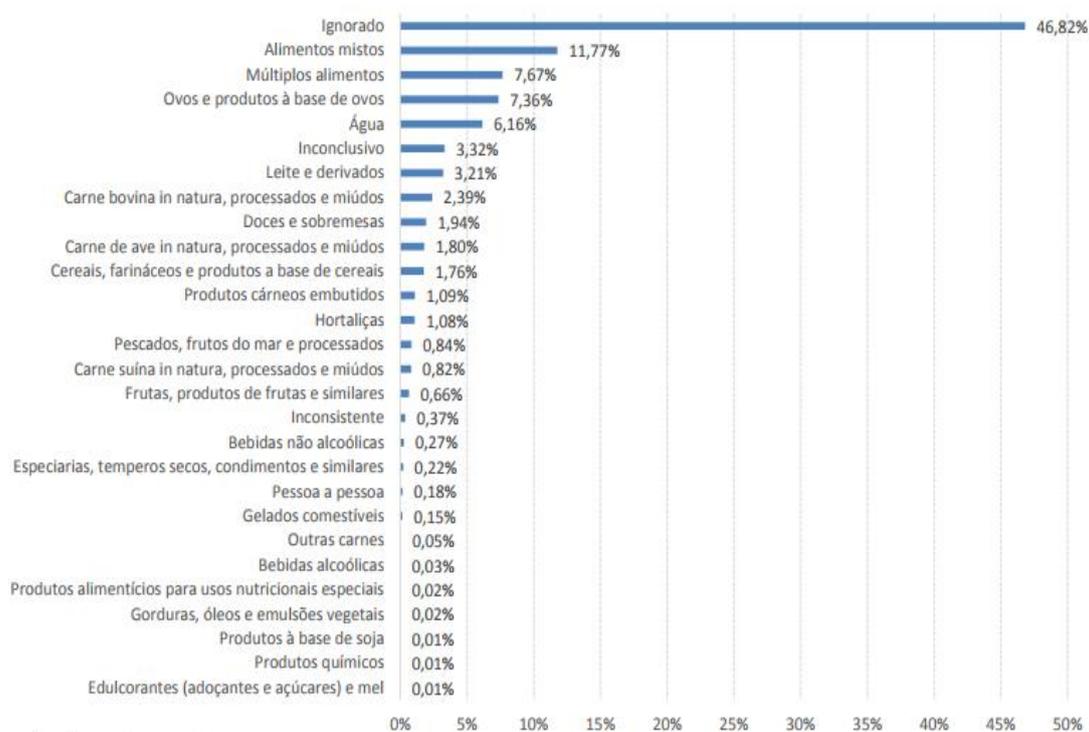


Figura 4. Distribuição dos alimentos incriminados nos surtos de DTA no Brasil de 2000 a 2017. Fonte: Sinan/SVS, Brasil (2018).

As estratégias adotadas no controle do micro-organismo apresentam variações. Nos Estados Unidos não é permitida a presença de *L. monocytogenes* em produtos prontos para consumo, incluindo os lácteos. Já na Europa, nos alimentos prontos para consumo susceptíveis à multiplicação de *L. monocytogenes*, exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais, é permitida uma contagem até 1×10^2 UFC/g. Na indústria, nos alimentos suscetíveis à multiplicação deste micro-organismo, é preconizada a ausência em 25g no momento em que o alimento deixa de estar sob o controle da empresa que o produziu (PITA, 2012).

No Brasil, a RDC nº 12/2001 ANVISA (BRASIL, 2001), que estabelece os padrões microbiológicos para alimentos, define o limite para *L. monocytogenes* apenas para alguns tipos de queijos, sendo preconizada a ausência em 25g do alimento.

Evoluções ocorridas na produção de alimentos fazem com que as práticas de higiene ideais tornem-se um desafio no processamento de alimentos. Apesar dos avanços nas tecnologias de controle de micro-organismos, as doenças transmitidas por alimentos ainda representam um relevante problema de saúde pública em todo o mundo (LUNGU et al., 2011).

Por ser a *L. monocytogenes* uma das principais preocupações da indústria alimentícia e dos órgãos de saúde, pela habilidade de sobreviver e multiplicar-se em condições tecnicamente indicadas para conservação de alimentos como temperatura de refrigeração; aliado à sua resistência ao congelamento, ao calor e aos diversos antibióticos, tornou-se micro-organismo emergente e de grande importância entre os patógenos transmitidos por alimentos (LAPENDA, 2010).

L. monocytogenes é frequentemente exposta a diversos agentes durante o processamento de alimentos ou procedimentos de limpeza e desinfecção e os efeitos de tais estresses ambientais podem influenciar a sua resposta e capacidade de persistir nesses ambientes (MAGALHÃES et al., 2016).

2.8 Mastite bovina por *Listeria monocytogenes*

Apesar de ser considerado estéril na glândula mamária de animais sadios, o leite pode sofrer contaminação por micro-organismos patogênicos a partir do momento da ordenha. Além disso, a contaminação bacteriana do leite cru pode ocorrer no próprio animal se este estiver acometido por enfermidades como a mastite (FUSCO e QUERO, 2014; SILVEIRA e BERTAGNOLLI, 2014).

Dentre as principais fontes contaminantes do leite estão a superfície de equipamentos utilizados na ordenha e do tanque, superfície externa dos tetos e do úbere. Assim, são vários os aspectos que devem ser abordados ao se utilizar boas práticas na ordenha, tais como a qualidade da água utilizada na desinfecção de equipamentos, de ordenha e do animal, uso correto de sanitizantes, higiene do ordenhador e das instalações (MOLINERI et al., 2012; LANGONI, 2013).

Responsável por grandes perdas econômicas, a mastite, inflamação das glândulas mamárias, dependendo de sua manifestação esta doença pode ser classificada como clínica, diagnosticada por alterações no leite e no úbere, ou subclínica, diagnosticada pela

presença de elevadas contagens de células somáticas no leite. A forma subclínica é importante devido a maior prevalência nos rebanhos, e é de difícil detecção e longa duração, tornando os animais reservatórios de micro-organismos para o rebanho (SÁ et al., 2000; DIAS, 2007).

Além disso, com base no tipo de patógeno, a mastite pode ser ainda contagiosa ou ambiental. Dentre os patógenos mais frequentes nos casos de mastite, estão *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium bovis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. e outros, como *Mycoplasma* spp., *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus* e *Listeria monocytogenes* (LANGONI et al., 1998; MARTINS et al., 2010).

Nos ruminantes, as infecções por *L. monocytogenes* podem ser assintomáticas ou causar doenças invasivas e, em ambos os casos, os animais excretam a bactéria nas fezes. Desta forma, os micro-organismos contaminam o meio ambiente e aumentam o risco de transmissão dentro do rebanho, disseminando o agente para outros rebanhos que compartilham as pastagens (HUTCHISON et al., 2004; HURTADO et al., 2017).

Em estudo desenvolvido por Sunitha et al. (2016), sobre a prevalência de *L. monocytogenes* em leite de vacas com mastite e ambientes de fazendas na Índia, observou-se uma prevalência significativa (5,60%) de *L. monocytogenes* em leite com mastite e no ambiente de produção leiteira.

Assim, de acordo com Ivanek et al. (2006), ruminantes podem perpetuar os ciclos de transmissão da *L. monocytogenes* e altas cargas da bactéria oriundas de ambientes rurais podem representar uma fonte de introdução do patógeno na cadeia de produção de leite e derivados.

2.9 Agentes sanitizantes no controle da mastite bovina

O controle da mastite e um adequado manejo de ordenha dependem da utilização de produtos eficientes. Nesse contexto, na escolha do sanitizante deve-se considerar natureza, concentração, espectro de ação, atoxicidade, ação irritante aos tecidos, custo e propriedades físico-químicas (RAMALHO et al., 2012; LOPES et al., 2013; MARGATHO et al., 2014).

O processo de sanitização visa a destruição de micro-organismos a níveis toleráveis, eliminando células vegetativas de micro-organismos. Desta forma, o produto

a ser utilizado deve ter sua atividade antimicrobiana comprovada na pele do teto, além de não ter sua atividade germicida afetada pela presença de matéria orgânica como leite, fezes ou urina (ZAFALON et al., 2008; CAIXETA et al., 2012).

A ação do sanitizante é afetada tanto pelas características físico-químicas da superfície, tais como tipos de resíduos, concentração, tempo e temperatura de contato, pH, quanto pelo tipo e concentração dos micro-organismos contaminantes, como por exemplo os esporos que são mais resistentes que as células vegetativas ou ainda sanitizantes que sejam mais efetivos sobre bactérias gram-negativas ou gram-positivas (ANDRADE, 2008).

Dentre os princípios ativos mais utilizados no pré e pós-*dipping* estão o cloro e o clorexidine (MEDEIROS et al., 2009). A ação do cloro se dá com a destruição da cápsula bacteriana de proteção e oxidação do protoplasma celular exercendo sua ação sanitizante, também formando cloraminas tóxicas que alteram a permeabilidade celular e impedem a regeneração enzimática. Através da desnaturação de proteínas da membrana celular dos micro-organismos, o cloro interfere no transporte de nutrientes e promove a perda de componentes celulares (MORÃO et al., 2015).

Apesar do baixo custo e facilidade de preparo e aplicação, o cloro é altamente corrosivo, podendo reagir com matéria orgânica, irritar a pele, mucosa e vias respiratórias dos manipuladores onde for utilizado. É um produto de amplo espectro, e em concentrações altas pode transmitir sabores e odores indesejáveis na área aplicada bem como irritabilidade para olhos e pele (SILVA et al., 2010).

Um dos usos do clorexidine é no tratamento de infecções superficiais de tetos em vacas devido ao seu efeito cumulativo e contínuo, permanecendo na pele no mínimo por seis horas, além de ser de fácil aplicação e econômico (SPINOSA et al., 2002). De acordo com Phillips et al. (1991) o clorexidine causa menor reação tecidual nas diluições recomendadas quando comparado ao iodo.

O clorexidine é bastante utilizado no pré e pós-*dipping* por possuir amplo espectro de ação e não ser inativado por pequenas quantidades de matéria orgânica, como sangue, leite, pus e fluidos teciduais. Porém alguns fatores podem interferir na sua eficácia, como a utilização de água dura, pois nessas condições há formações de sais insolúveis a partir da clorexidina (SANTOS e FONSECA, 2007).

O efeito antimicrobiano do clorexidine ocorre pela atração e adsorção de suas moléculas catiônicas à superfície celular dos micro-organismos, promovendo a alteração da permeabilidade da membrana celular e resultando na perda dos componentes

intracelulares e no desequilíbrio osmótico da célula. A quantidade adsorvida é proporcional à saída dos constituintes celulares e em pH neutro, é rapidamente adsorvida à superfície celular dos micro-organismos (VITALIS, 2012).

O clorexidine possui ação tanto em bactérias aeróbias e anaeróbias, e ainda em gram-positivas e gram-negativas, com ação bactericida ou bacteriostática dependendo da concentração usada. Soluções mais concentradas são bactericidas, onde ocorre o rompimento da membrana citoplasmática da bactéria, já em concentrações baixas tem efeito bacteriostático a qual impede a síntese de ATP da bactéria (MICHELOTTO et al., 2008).

Cruz et al. (2012) avaliaram, “*in vitro*”, a citotoxicidade das soluções de clorexidina de 2,5% a 5% e concluíram que as soluções a 2,5%, 3%, e 3,5% comportaram-se como não citotóxicas, as soluções de 4% e 4,5% foram moderadamente citotóxicas e a de 5% foi severamente citotóxica, equivalente ao hipoclorito de sódio a 5%.

Devido a diversidade dos agentes infecciosos envolvidos nos casos de mastite torna-se importante a utilização de produtos que em uma única concentração possa atuar no pré e pós-*dipping*, mantendo suas propriedades desinfetantes, sem causar danos à saúde do animal ou a qualidade do produto (COUTINHO et al., 2012).

A concentração de sanitizante a ser utilizado deve ser capaz de eliminar o micro-organismo mais resistente no intervalo de tempo desejado. Assim, além de levar em consideração o tempo de contato nas superfícies a serem higienizadas, faz-se necessário o controle da concentração do produto através de acompanhamentos laboratoriais para garantir sua efetividade (NASCIMENTO et al., 2010).

2.10 *Listeria monocytogenes* e a saúde pública

A listeriose é uma zoonose causada pela ingestão de alimentos contaminados por *L. monocytogenes* e é considerada uma questão de saúde pública crescente (CDC, 2017). Por muitos anos a epidemiologia da listeriose foi uma incógnita e os isolados da bactéria em laboratórios não passavam de poucos achados, sem grande importância (LOW e DONACHE, 1997).

No início da década de 1980 o aumento da ocorrência de surtos de listeriose nos EUA e Europa demonstraram tratar-se de uma doença de grande importância para a saúde pública, deixando de ser considerada apenas doença que acomete animais (VASQUEZ-BOLAND et al., 2001; HOF, 2003).

Na Europa dados sobre listeriose foram estatisticamente registrados. Em 2014, foram relatados 2.161 casos confirmados de listeriose humana na União Europeia, destacando a necessidade de estudos relacionados à presença e sobrevivência de *L. monocytogenes* em alimentos, assim como de sua investigação na cadeia produtiva de alimentos (EFSA, 2015; BOTSARIS, 2016).

No Brasil, dentre os anos de 2000 e 2017 ocorreram 12.503 surtos por doenças transmitidas por alimentos (BRASIL, 2018), porém ainda não há dados oficiais a respeito da listeriose. O fato de muitos casos de DTA não serem notificados e investigados pode mascarar a real ocorrência das doenças transmitidas por alimentos (WHO, 2017).

A Portaria nº 204/2016 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2016), estabelece que surtos de DTA constituem Eventos de Saúde Pública (ESP) e estão sujeitos a notificação compulsória imediata. Entretanto, mesmo sendo de grande relevância na saúde pública, no Brasil a listeriose não se enquadra na lista de notificação obrigatória, sendo escassos os relatos de casos de surtos dessa doença, sendo estes subdiagnosticados e/ou subnotificados (CRUZ et al., 2008; BARANCELLI et al., 2011).

A listeriose apresenta como principal grupo de risco gestantes, recém nascidos, imunocomprometidos e idosos, por serem os mais suscetíveis a formas invasivas da doença (OXARAN et al., 2017; WIECZOREK e OSEK, 2017).

O período de incubação da listeriose varia de horas a semanas, contudo a dose infectante de *L. monocytogenes* para causar a doença ainda não está bem definida. A dose aproximada, relatada de casos, varia de 10^2 a 10^9 UFC/g ou mL e também em função da virulência da cepa e da suscetibilidade do indivíduo (DALTON et al., 1997).

A listeriose possui duas formas de manifestação clínica: a invasiva, que acomete predominantemente pessoas do grupo de risco para a doença e caracteriza-se por septicemia e/ou meningite em não grávidas, abortamento e morte fetal, em gestantes, nascimento prematuro, septicemia ou meningite neonatal, encefalite, endocardite e pneumonia. Em casos associados com gravidez possui altas taxas de letalidade (20 a 30%); e a forma não invasiva, que é autolimitada e manifestada através de uma gastroenterite febril (SWAMINATHAN et al., 2007; BRITO et al., 2008; GASCHIGNARD et al., 2011; LAMONT et al., 2011).

No início da infecção, a listeriose assemelha-se a um resfriado comum, acompanhado de febre, dores musculares e distúrbios gastrointestinais. Quando a infecção atinge o sistema nervoso, podem ocorrer sintomas como dor de cabeça, torcicolo, confusão mental, perda de equilíbrio e convulsões (VASQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Geralmente sem infecção localizada a septicemia é caracterizada por febre, náusea, vômito e mal estar. O tropismo pelo cérebro e medula justifica a alta incidência de meningite e meningoencefalite nos casos de infecção do sistema nervoso central, acompanhado de febre alta, rigidez na nuca e desordens motoras (VASQUEZ-BOLAND et al., 2001).

A *L. monocytogenes* pode ainda causar infecções localizadas como conjuntivite, dermatite e linfadenite, podendo dar origem a complicações como peritonite, hepatite, pleurite, abscesso esplênico, pericardite, osteomielite, dentre outras. Pacientes com infecção localizada geralmente são portadores assintomáticos do patógeno (DOGANAY, 2003).

A sobrevivência intracelular é essencial para que o patógeno persista nas células epiteliais e em células como macrófagos, responsáveis em eliminá-lo, sendo assim *L. monocytogenes* utiliza alguns mecanismos para escapar da resposta imune do hospedeiro. Este micro-organismo pode infectar as células por dois mecanismos, invasão direta ou propagação célula a célula (VASQUEZ-BOLAND et al., 2001; POSFAY-BARBE e WALD, 2009).

Após entrar no organismo hospedeiro por via oral, *L. monocytogenes* atinge o trato intestinal, aderindo e invadindo a mucosa. A partir do momento que alcança a corrente sanguínea, a célula bacteriana é fagocitada por macrófagos e após a lise do fagossoma, é liberada no citoplasma da célula hospedeira onde se multiplica rapidamente. O patógeno usa a polimerização de filamentos de actina para se mover intracelularmente e se espalhar de célula a célula infectando uma vasta extensão de tecidos hospedeiros, sendo o fígado o principal sítio da infecção (VASQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Cada passo da infecção requer a expressão de fatores de virulência específicos. As internalinas são responsáveis pela invasão das células epiteliais e pelo tropismo ao tecido. A listeriolisina O (LLO) e duas fosfolipases C (fosfotidilinositol – PI-PLC e fosfotildicolina – PC-PLC) responsáveis pela lise dos fagossomos da célula e pela multiplicação intracelular do patógeno. A proteína act-A é responsável pela propagação célula a célula e motilidade. Além desses, há a proteína de ligação da fibronectina, responsável pelo processo de colonização do fígado e intestino, lecitinases e proteases (POSFAY-BARBE e WALD, 2009).

A internalina A (*InlA*), proteína específica para *Listeria monocytogenes*, é a responsável por induzir a sua fagocitose e permitir a invasão celular e a presença de *inlC*

e *inlJ* tem sido usada para diferenciar cepas virulentas de cepas não virulentas (LIU et al., 2002).

O diagnóstico pode ser feito por exame bacteriológico do material proveniente do foco infeccioso. O cultivo primário da bactéria proveniente de sangue, liquor aspirado de medula óssea e secreção de garganta pode ser facilitado pelo crioenriquecimento, com manutenção do meio semeado a 4°C, e subcultivos repetidos em ágar-sangue. Além disso, também pode ser feito pelo isolamento do agente infeccioso na placenta, mecônio, lavado gástrico ou fezes (SÃO PAULO, 2009).

A sorotipagem pode ser utilizada para o diagnóstico da listeriose, porém apresenta limitações em relação ao tempo exigido para obtenção de resultados e principalmente em relação à sua eficiência na detecção de todos os sorotipos presentes nas amostras analisadas, dificultando assim, as investigações de surtos, além dos procedimentos de diagnóstico, terapêutica e prevenção (BYUN et al., 2001; BEUMER et al., 2003).

Observa-se um grande avanço na precisão e rapidez para a obtenção de dados relativos ao patógeno, no que se refere ao entendimento de sua biologia, fatores de virulência, evolução, diferenças fenotípicas e, conseqüentemente, nas ações de diagnóstico e prevenção decorrente do uso de técnicas moleculares de sequenciamento genético e principalmente as análises genéticas comparativas (BYUN et al., 2001; VASQUEZ-BOLAND et al., 2001; BEUMER et al., 2003).

2.11 Antimicrobianos no tratamento da listeriose humana

A listeriose humana é tratada principalmente por terapia de suporte. Porém, devido ao elevado risco de mortalidade decorrente da infecção, a listeriose é tratada juntamente com antibióticos e, geralmente, mostra-se sensível a maioria das drogas empregadas no combate a bactérias gram-positivas, como penicilinas, ampicilina e cefalotina (β -lactâmicos); tetraciclina (Tetraciclina); eritromicina (Macrolídeo); cloranfenicol (Cloranfenicol); ciprofloxacina (Quinolona); clindamicina (Lincosamídeo); gentamicina (Aminoglicosídeo); vancomicina e teicoplanina (Glicopeptídeos), dentre outras (SAKARIDIS et al., 2011).

Os β -lactâmicos são a classe mais prescrita em todo o mundo e possuem em comum na sua estrutura o anel β -lactâmico. Fazem parte deste grupo 4 grandes subgrupos: Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenemes e Monobactamos. O mecanismo de ação interfere com a síntese do peptidoglicano que é responsável por manter a integridade da

parede bacteriana. Em bactérias gram-positivas o polímero de peptidoglicano encontra-se mais à superfície da célula, permitindo que o antibiótico se ligue mais facilmente as PBP's (Penicillin Binding Proteins) (TIPPER, 1985; BRASIL, 2007; FERES, 2012).

Associações de penicilinas a inibidores das β -lactamases permitem aumentar o espectro de ação e tornam o antimicrobiano mais eficaz, uma vez que a inativação por β -lactamases não ocorre. Alguns exemplos são associações de Amoxicilina com Ácido clavulânico e Piperacilina com Tazobactam. A associação de amoxicilina com ácido clavulânico permite aumentar a ação contra micro-organismos resistentes aos derivados da penicilina (INFARMED, 2012).

Os glicopeptídeos são outra classe de antibióticos, representados por vancomicina e teicoplanina também possui como mecanismo de ação a interferência com a síntese do peptidoglicano. A vancomicina produzida pelo fungo *Streptomyces orientalis* é o fármaco de preferência no tratamento de infecções graves por gram-positivos como *S. aureus* ou *S. epidermidis* resistentes à meticilina (BRASIL, 2007; INFARMED, 2012).

Os macrolídeos são um grupo de antimicrobianos quimicamente constituídos por um anel macrocíclico de lactona, ao qual se ligam um ou mais açúcares. Seu mecanismo de ação ocorre pela inibição da síntese de proteínas, por intermédio da ligação reversível aos receptores localizados na porção 50S de ribossomos bacterianos, em especial na molécula 23S do RNA, impedindo as reações de transpeptidação e translocação. Quando usados em concentrações elevadas apresentam efeito bactericida (GUERRANT et al., 2001; BRASIL, 2007; LOGUE et al., 2010).

Descobertas na década de 1940, as tetraciclina têm atividade contra micro-organismos gram-negativos e gram-positivos. Devido ao seu intenso uso na medicina humana e veterinária, a resistência generalizada limitou um pouco o seu uso. Os membros mais utilizados desta classe são tetraciclina e doxiciclina (CHOPRA e ROBERTS, 2001; BRASIL, 2007).

Ação das tetraciclina sobre as células é conferida por difusão em um processo dependente de gasto de energia. Ligam-se, de maneira reversível, à porção 30S do ribossomo, bloqueando a ligação do RNA transportador, impedindo a síntese proteica. (BRASIL, 2007; ZILBAUER et al., 2008).

O cloranfenicol é um antibiótico inibidor da síntese proteica bacteriana com efeito bacteriostático e bactericida. O espectro de ação engloba bactérias anaeróbias, bactérias gram positivas, incluindo a maioria das espécies de MRSA. Exerce a sua atividade ligando-se reversivelmente à subunidade 50S do ribossoma impedindo a ligação do

RNAt, evitando a codificação do novo aminoácido e seu efeito bactericida acontece na presença de concentrações elevadas (BRASIL, 2007; GUEDES et al., 2008).

A clindamicina exerce a sua ação bacteriostática impedindo a elongação das proteínas pela ligação à subunidade 50S do ribossoma. Por outro lado alteram a superfície bacteriana, facilitando a opsonização, fagocitose e destruição intracelular dos microorganismos (INFARMED, 2012).

As quinolonas possuem atividade bactericida resultante da inibição do DNA girase ou topoisomerase II, enzima essencial à replicação e transcrição do DNA bacteriano. A inibição desta enzima impede o super-enrolamento do DNA, não ocorrendo a separação de suas e assim inibindo a transcrição e a síntese proteica (BRASIL, 2007; GUEDES et al., 2008).

Por muitos anos não houve grandes mudanças no perfil de sensibilidade de *L. monocytogenes* aos antibióticos. Entretanto alguns relatos têm descrito cepas resistentes a cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina, tetraciclina, vancomicina e trimetropina, inclusive em cepas isoladas de alimentos (AURELI, 2003). Wang et al. (2013) relatam que em 1988 houve o primeiro isolado de *L. monocytogenes* resistente a esses antimicrobianos e, desde então, observa-se aumento no número de cepas resistentes.

Nesse contexto, é necessário o monitoramento da suscetibilidade antimicrobiana de *L. monocytogenes*, uma vez que a emergência de cepas resistentes pode trazer consequências graves à saúde pública (SAKARIDIS et al., 2011).

2.12 Biofilmes microbianos

Biofilmes são agrupamentos estruturados de bactérias aderidas umas às outras por meio de uma matriz extracelular, que é um componente essencial dos biofilmes bacterianos e geralmente representa mais de 90% da sua matéria seca. Composta principalmente por polissacarídeos, a matriz é considerada a estrutura fundamental do biofilme (COSTERTON et al., 1999; FLEMMING e WINGENDER, 2010).

De acordo com Costerton et al. (1999), a partir da década de 1970 iniciaram-se os estudos com intuito de identificar e entender sua formação, porém muito antes Leeuwenhoek retirou uma amostra do biofilme da placa de seus dentes e, com seu microscópio primitivo, observou comunidades microbianas.

Estas estruturas, constituídas de células livres (planctônicas) que se aderem a uma superfície, proliferam e se acumulam em camadas (células sésseis). As primeiras colônias

facilitam a chegada de outras células, favorecendo locais de adesão mais numerosos e iniciando o processo de construção da matriz que contém o biofilme (DONLAN e COSTERTON, 2002).

Além de ser constituída por polissacarídeos, proteínas e lipídeos, a matriz exopolissacarídica pode conter também água e ácidos nucleicos. Já o biofilme como um todo, é formado também por água e resíduos do ambiente (biótico ou abiótico) em que as células microbianas se aderem (SUTHERLAND, 2001; CAPELLETI, 2006; LUCCHESI, 2006).

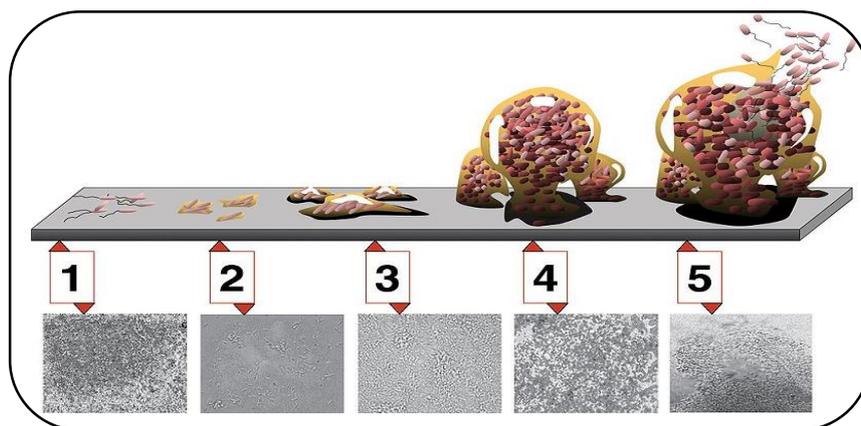
Dentre os micro-organismos que podem participar de processos de adesão pode-se citar *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus* sp., *Enterococcus faecium*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* e *Listeria monocytogenes* (CAPELLETTI, 2006; LUCCHESI, 2006; CAIXETA et al., 2012).

Biofilmes podem ser formados por apenas um tipo de micro-organismo, ou monoespécie, sendo estes mais relacionados a tecidos orgânicos, como válvulas cardíacas, ou multiespécie, que são mais comuns na área de alimentos, onde se utilizam de outras superfícies (O'TOOLE et al., 2000).

Apenas algumas espécies são capazes de aderir a uma superfície por conta própria. Outras são apenas capazes de ancorar à matriz ou às colônias anteriores. Uma vez que a colonização tenha iniciado, o biofilme cresce através de uma combinação de divisão celular e recrutamento de novos micro-organismos (COSTERTON et al., 1999).

A adesão e a formação do biofilme são dependentes de características do micro-organismo, como expressão de fatores de virulência e produção da cápsula exopolimérica. A superfície aderente e outros fatores como pH, temperatura, tempo de agitação, dentre outros, também influenciam na formação destas estruturas (FLACH et al., 2005; CAIXETA et al., 2012).

Como pode-se observar na Figura 3, as principais etapas envolvidas na formação de um biofilme microbiano são: formação do filme condicionador; adesão inicial dos micro-organismos; produção de substâncias poliméricas extracelulares; maturação e despreendimento de porções. Assim, a formação do filme condicionador ocorre a partir da adsorção da matéria orgânica na superfície e a adesão dos micro-organismos primários é controlada principalmente por interações iônicas entre a parede celular dos micro-organismos e macromoléculas do filme condicionador (CAPELLETTI, 2006).



Fonte: www.blogdobiomolgroup.com

Figura 5: Etapas de formação de biofilme microbiano.

Após a adesão inicial, o crescimento e a divisão celular favorecem a formação do biofilme, que ocorre em aproximadamente duas horas. A partir disso, há um rearranjo estrutural, a redistribuição das bactérias e o aparecimento de canais e poros onde há difusão de nutrientes, produção de grandes quantidades de substâncias poliméricas extracelulares e aumento da densidade celular, caracterizando a maturação do biofilme (CAPELLETTI, 2006; CHENG et al., 2007).

Porções do biofilme maduro se desprendem por mecanismos que podem ser físicos, como a erosão superficial, abrasão ou formação de gases; químicos, que envolvem a participação de agentes antimicrobianos, mudanças de pH e variações nas propriedades químicas do substrato; ou biológica, que pode ocorrer pela transição das células sésseis a planctônicas provocada pela escassez de nutrientes, que pode ser relacionada a fatores como aumento da densidade do biofilme, da divisão celular com a excreção de enzimas por algumas espécies ou pelo ataque de predadores, como os protozoários (STOODLEY et al., 2002; MORAES, 2009).

Em todas as etapas de formação do biofilme as bactérias se comunicam através do *Quorum-sensing*, um sistema que por meio de sinais químicos secretados pelas células bacterianas, participa na capacidade de percepção da densidade populacional e promove a regulação da expressão genética (MILLER e BASSLER, 2001; KELLER e SURETTE, 2006).

De acordo com Renner e Weibel (2011), o *Quorum-sensing* é o exemplo mais caracterizado de comunicação química entre os micro-organismos, sendo responsável por modular uma variedade de funções celulares, incluindo a formação do biofilme, a

patogênese, a aquisição de nutrientes, a motilidade e a produção de metabólitos secundários.

Este mecanismo é realizado através da produção de moléculas autoindutoras (AIS) pelas células bacterianas, que atravessam as células por difusão e acumulam-se no ambiente em quantidade proporcional ao crescimento celular, conseguindo ativar os genes e expressando fenótipos em questão. Por meio deste mecanismo a bactéria é capaz de detectar a concentração de autoindutores e assim ter a percepção do tamanho ou *quorum* da população (RUMJANEK et al., 2004; GERA e SRIVASTAVA, 2006; BEHLAU e GILMORE, 2008).

Em *Listeria monocytogenes*, o gene *luxS* é precursor da molécula autoindutora 2 (AI-2), que é considerada um sinalizador na comunicação entre espécies microbianas (BASSLER et al. 1994). O papel de *luxS* em *L. monocytogenes* ainda não está esclarecido, porém foi demonstrado que a inativação de *luxS* resultou em um aumento na formação do biofilme (SELA et al., 2006). Assim, de acordo com Belval (2006) o gene *LuxS* pode estar envolvido no processo de regulação na formação de biofilme.

De acordo com Chen et al. (2008), o gene *inlA*, além de codificar a internalina A, responsável pela penetração de *L. monocytogenes* nas células, parece desempenhar um papel na sua fixação em superfícies. Chen et al. (2008) e Chen et al. (2009) relataram uma correlação entre a expressão do gene *inlA* e a capacidade de ligação de *L. monocytogenes* a superfícies de vidro.

Porém, Yang (2012), em estudo avaliando o mecanismo antimicrobiano de água neutra eletroquimicamente ativada sobre patógenos transmitidos por alimentos e seus biofilmes, observou que cepas de *L. monocytogenes* que não possuíam o gene *inlA* foram capazes de formar biofilmes, e concluiu que esse gene não foi fator decisivo para a formação de biofilmes nas cepas estudadas.

Os flagelos podem ser relacionados à adesão dos micro-organismos em superfícies, pois no início formação de biofilmes facilitam o contato com o substrato superando as forças de repulsão eletrostática. *L. monocytogenes* apresenta motilidade a partir de flagelos peritríquios em temperaturas até 30°C, com a transcrição do gene flagelar *MogR*, o que também pode ser relacionado à sua capacidade de adesão (HERALD e ZOTTOLA, 1988; VATANYOOPAIARN et al., 2000; LIU et al., 2002; FOLSOM et al.; 2006).

Os fatores Sigma são subunidades de proteínas dissociáveis que direcionam holoenzimas de RNA polimerase bacteriana para o reconhecimento da sequência do dos

genes antes do início da transcrição (RYAN et al., 2008). O fator Sigma σ_B , codificado por *sigB*, é uma molécula essencial nas respostas ao estresses ambientais em diversas bactérias gram-positivas, incluindo *L. monocytogenes*, sendo relatado como fator relacionado à produção de biofilmes (RAENGPRADUB, et al., 2008).

2.13 Biofilmes na área de alimentos

Quando em forma de biofilme, os micro-organismos são mais resistentes aos materiais utilizados para a limpeza e sanitização. Relaciona-se a isto a membrana exopolimérica formada, que pode funcionar como uma barreira protetora à possível interação entre o agente antimicrobiano com a matriz (CAIXETA et al., 2012).

Além disso, o biofilme serve como proteção para diversas mudanças ambientais como exposição à radiação ultravioleta, à ácidos e à dissecação (DONLAN e COSTERTON, 2002).

Assim, nos biofilmes, as bactérias estão protegidas das condições adversas do ambiente como temperatura, estresse oxidativo, privação de nutrientes, ação de antimicrobianos, dentre outros, auxiliando na sua perpetuação (BROWN et al., 2014).

A presença de biofilmes em indústrias de alimentos se deve, primeiramente, pelo depósito de material orgânico em superfícies de processamento, as quais facilitam o desenvolvimento de comunidades bacterianas (OLIVEIRA et al., 2010).

Os biofilmes podem acumular-se em uma variedade de substratos, a exemplo do aço inox, vidro, borracha, polipropileno, fôrmica, ferro, poliestileno de baixa densidade e policarbonato (KASNOWSKI et. al., 2010).

Dessa forma, podem acarretar vários problemas na área de alimentos, já que a colonização das superfícies em indústrias pode contaminar os produtos, alterando suas características, além de possibilitar uma DTA, representando riscos à saúde do consumidor e prejuízos financeiros à indústria (FLACH et al., 2005).

Teixeira et al. (2008), avaliaram a formação de biofilme de *L. monocytogenes* em materiais normalmente usados em cozinhas e observaram a formação da estrutura em aço inoxidável, mármore, granito, vidro, polipropileno e silestone. No estudo de Kadam et al. (2013) houve formação de biofilme por este micro-organismo em polipropileno.

Reis-Teixeira et al. (2017), avaliaram crescimento, viabilidade e arquitetura de biofilmes de *Listeria monocytogenes* em superfícies abióticas e observaram que as cepas aderiram a cupons de aço inoxidável e vidro. Já Andrade (2018) constatou que 20%

(02/10) das cepas de *L. monocytogenes* isoladas de presuntos fatiados foram capazes de formar de biofilmes em placa de poliestireno.

Na indústria de beneficiamento de leite, práticas inadequadas de manejo e de higienização em equipamentos de ordenha e no beneficiamento, assim como a conservação inadequada, tornam o leite suscetível à contaminação. Além disso, estas práticas inadequadas podem promover a formação de biofilmes em tanques de armazenamento e trocadores de calor, e ainda, adesão de esporos na superfície de embalagens (FRANCO et al., 2000; HAUN, 2004).

Locais onde ocorrem a manipulação e o contato com alimentos merece atenção redobrada, pois micro-ranhuradas e microfendas podem favorecer a formação de biofilmes, já que dificultam a higienização no local. Além disso, o desprendimento de células pode desencadear a formação de novo biofilme, aumentando os focos de contaminação (CAIXETA et al., 2012).

Assim, em tanques de resfriamento de leite a contínua liberação de células aderidas para o alimento torna-se um problema, já que representa um importante foco de contaminação e muitas vezes de contaminação por bactérias resistentes (SALISBURY et al., 2002; TEALE, 2002; MARQUES et al., 2012).

Outro fator importante em relação aos biofilmes na cadeia produtiva do leite é que a habilidade de algumas bactérias de aderirem à superfície do epitélio da glândula mamária está associada à produção destas estruturas. Desta forma, se não houver o emprego adequado das boas práticas de ordenha, o leite poderá ser fonte de contaminação de micro-organismos patogênicos (MELO et al., 2012).

Como o sistema de comunicação entre as bactérias pode desencadear a expressão genética, relaciona-se a participação de moléculas sinalizadoras autoindutoras na regulação de fenótipos envolvidos na deterioração de alimentos e no desencadeamento de toxinfecções alimentares (CHRISTENSEN et al., 2003; SMITH et al., 2004; VIANA, 2006).

De forma geral, os biofilmes podem acarretar vários problemas na área de alimentos, já que a colonização das superfícies em indústrias pode contaminar os produtos, alterando suas características, além de possibilitar uma DTA, representando riscos à saúde do consumidor e prejuízos financeiros à indústria com a diminuição do tempo de vida útil dos produtos (FLACH et al., 2005).

2.14 Resistência bacteriana a antibióticos e a sanitizantes

Têm se observado um aumento significativo da resistência aos antibióticos, particularmente entre as bactérias zoonóticas, que é provavelmente, consequente do uso indiscriminado das drogas. Há Também correlação entre a resistência aos antimicrobianos e a utilização destes na produção animal, já que de acordo com estudos na União Europeia, 70% dos antibióticos produzidos no mundo são utilizados em fazendas (BEBELL et al., 2014; LEE et al., 2015).

Considera-se que uma bactéria é resistente a um ou vários antibióticos, quando este perde a capacidade de controlar o crescimento bacteriano. O agravamento do nível de resistências é relacionado à sua utilização excessiva e muitas vezes de forma errada praticada ao longo de décadas. Assim, o uso indiscriminado permitiu que os micro-organismos conseguissem se adaptar, por mecanismos de aquisição e transferência de genes de resistência aos antibióticos presentes em plasmídeos e transposons, diminuindo a eficácia dos antimicrobianos (SEAN, 2005; CDC, 2015).

Os mecanismos microbianos de resistência podem ser intrínsecos ou adquiridos por transmissão de material genético ou mutação. A resistência natural é uma característica intrínseca de um micro-organismo, que ocorre sem uma exposição prévia ao antibiótico. O conhecimento da resistência intrínseca das diferentes espécies ajuda a escolher as estratégias de tratamento (RICE e BONOMO, 2005).

Existem quatro grandes mecanismos de resistência aos antibióticos que são: a alteração da permeabilidade da membrana microbiana; a alteração do local de ação do antibiótico; a bomba de efluxo, onde ocorre o transporte ativo dos antibióticos do meio intracelular para o meio extracelular; e o mecanismo enzimático que altera a estrutura química do antibiótico (DZIDIC et al., 2007).

L. monocytogenes apresenta resistência natural a alguns antibióticos, tais como: cefalosporinas de terceira geração, ácido pipemídico, aztreonam, fosfomicina e sulfametoxazol (CHARPENTIER et al., 1999).

Por outro lado, a heterogeneidade genética de *Listeria* spp., indica que a transferência horizontal de genes é relativamente comum e que provavelmente os bacteriófagos possuem um papel importante na plasticidade de *Listeria* spp. (BERTRAND et al., 2005).

Da mesma forma, *L. monocytogenes* pode adquirir ou transferir genes de resistência a antibióticos, a partir de plasmídeos e transposons de outras espécies bacterianas quer “*in vitro*” ou “*in vivo*” no trato intestinal (OSAILI et al., 2011).

Situações como mutação espontânea ou aquisição de informação genética de outros micro-organismos através de troca de plasmídeos por conjugação no interior do biofilme também relacionam-se ao fato de alguns micro-organismos tornarem-se resistentes a antimicrobianos. A conjugação (mecanismo de transferência de plasmídeos) ocorre numa taxa maior entre as células em biofilme, pois há uma maior proximidade física entre as células, favorecendo a passagem dos plasmídeos (O'TOOLE, 2000; DONLAN e COSTERTON, 2002).

De acordo com Hof (2003), a ação intracelular da bactéria é uma das principais causas que dificultam a terapêutica por meio de antibióticos. Outro fator relevante é a capacidade de formação de biofilme, já que a matriz exopolimérica pode interferir na penetração do antimicrobiano.

Assim, biofilmes podem influenciar na resistência bacteriana, já que nestas formações, há proteção das bactérias à ação dos antibacterianos, pois impedem fisicamente a entrada das moléculas, e ainda, favorecem as trocas gênicas. Assim, podem contribuir também para a natureza crônica das infecções (DAVIES, 2003; MOREAU-MARQUIS et al., 2008; VUOTTO et al., 2014).

Os micro-organismos no interior de um biofilme expressam diferentes características fenotípicas quando comparadas com seus homólogos de vida livre, sendo essa transferência horizontal de genes importante para a evolução e diversidade genética das comunidades microbianas (KOKARE et al., 2009).

Em relação aos sanitizantes, geralmente estes agentes são escolhidos por hábito de uso, facilidade de aplicação ou preço. Entretanto, devem-se avaliar as praticidades e as limitações de cada desinfetante, dado que o uso inadequado, por períodos prolongados e baixas concentrações dos desinfetantes levam a uma seleção natural de cepas resistentes em uma população microbiana (PEDRINI e MARGATHO, 2003).

A persistência de *L. monocytogenes* em ambientes de processamento de alimentos está associada a sua constante exposição a condições subletais de fatores estressantes como antimicrobianos, pH e temperatura, fato que induz seu desenvolvimento e crescimento condicionado ao estresse, tornando-a fisiologicamente mais tolerante a níveis aumentados do mesmo ou de diferentes fatores estressantes (SOUZA et al., 2015). Em *L.*

monocytogenes, o fator σB por proteger de estresses ambientais é essencial para a resistência a alguns agentes utilizados na sanitização (RYAN et al., 2008).

Segundo Medeiros et al. (2009), variações apresentadas no perfil de suscetibilidade bacteriana frente a desinfetantes fazem com que sejam necessárias avaliações periódicas dos produtos. Para Margatho et al. (2014), realizar rodízio entre as substâncias ativas é recomendável para evitar que os micro-organismos tornem-se resistentes a determinado produto.

Práticas inapropriadas no uso dos produtos, assim como o uso em concentrações abaixo das recomendadas pelos fabricantes, proporcionam a resistência das cepas aos princípios ativos. Outro fator que favorece a resistência microbiana é o uso excessivo de desinfetantes em equipamentos e utensílios utilizados na ordenha (LANGSRUD et al., 2003).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a formação de biofilme e o perfil de resistência a antimicrobianos e sanitizantes de *Listeria monocytogenes* isoladas de leite de tanques de expansão.

3.2 Específicos

- Isolar e identificar cepas de *Listeria monocytogenes*;
- Avaliar “*in vitro*” o perfil de resistência de *L. monocytogenes* a antimicrobianos;
- Avaliar “*in vitro*” a capacidade de *L. monocytogenes* formar biofilme;
- Avaliar “*in vitro*” o perfil de resistência de *L. monocytogenes* a sanitizantes.

4. REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A. C.; SILVA, L. B. G.; MEDEIROS, E. S.; PINHEIRO-JÚNIOR, W.; MOTA, R. A. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, n.7, p.565-573, 2016.
- ALAGOAS. Secretaria de Estado do Planejamento, Gestão e Patrimônio. **Estudo sobre Pecuária Leiteira de Alagoas/Alagoas**. Secretaria de Estado do Planejamento, Gestão e Patrimônio. – Maceió: SEPLAG, 2017. 37p.
- ALHO, M. P. **Caracterização molecular, susceptibilidade a antibióticos e pesquisa de factores de virulência em *Listeria* spp. de alimentos e superfícies**. Dissertação (Mestrado). Universidade de Lisboa, 2012. 55f.
- ALMEIDA, V.M.; PEREIRA, L.S.; COSTA, F.N *Listeria* spp., coliformes, bactérias mesófilas e psicrotróficas no leite *in natura* e pasteurizado tipo C. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 72, n. 1, p. 104-9, 2013.
- ANDRADE, J. M. ***Listeria monocytogenes* formadoras de biofilmes em presuntos fatiados e sua sensibilidade aos sanitizantes**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2018. 43f.
- ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos – Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo (SP): Varela, 2008. 410p.
- AURELI, P. et al. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 325-30, 2003.
- ÂNGELO, F. F. et al. Bactérias psicrotróficas em leite cru refrigerado. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, Ano XII, n. 22, 2014.
- ARCURI, E. F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M; ÂNGELO, F.F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.440-446, 2006.
- BARANCELLI, G. V. **Ocorrência e caracterização sorológica e genotípica de *Listeria monocytogenes* em indústrias de queijo do estado de São Paulo**. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, 2010. 117f.
- BARANCELLI, G.V.; SILVA-CRUZ, J.V.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C.A.F. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n.1, p.155-68. 2011.
- BASSLER, B. L.; WRIGHT, M.; SILVERMAN, M. R. Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. **Molecular Microbiology**, v.13, p.273–286, 1994.
- BEBELL, L. M.; MUIRU, A. N. Antibiotic use and emerging resistance: how can resource-limited countries turn the tide? **Global Heart**, v. 9, n. 3, p. 347-358, 2014.
- BEHLAU, M.; GILMORE, M.S. Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease. **Archives of Ophthalmology**, v. 126, n. 11, p. 1572-81, 2008.

BELOTI, V. et al. Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado produzido no município de Sapopema/PR. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 16, p. 02-18, 2011.

BELVAL, S. C.; GAL, L.; MARGIEWES, S.; GARMYN, D.; PIVETEAU, P.; GUZZO, J. Assessment of the roles of *luxS*, S-ribosyl homocysteine, and autoinducer 2 in cell attachment during biofilm formation by *Listeria monocytogenes* EGD-e. **Applied Environmental Microbiology**, v.72, p.2644-2650, 2006.

BERTRAND S, HUYS G, YDE M, D'HAENE K, TARDY F, VRINTS M, SWINGS J, COLLARD JM. Detection and characterization of tet(M) in tetracyclineresistant *Listeria* strains from human and food-processing origins in Belgium and France. **Journal of Medical Microbiology**, v.54, p.:1151-1156, 2005.

BEUMER, R.R.; HAZELEGER, W.C. *Listeria monocytogenes*: diagnostic problems. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.35, p. 191-197, 2003.

BOTSARIS, G.; NIKOLAOU, K; LIAPI, M.; PIPIS, C. Prevalence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in cattle farms in Cyprus Using bulk tank milk samples. **Journal of Food Safety**, 00, 00–00, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Antimicrobianos: bases teóricas e uso clínico**. Brasília, 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/antimicrobianos.htm>, Acesso em: 20. jan. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Bovinocultura**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos> Acesso em: 20. mai. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017**. 2017a. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Diário Oficial da União: Brasília, 29 de março de 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa IN nº 7, de 03 de maio de 2016**, prorroga os prazos para valores de CCS e CBT aprovados pelo Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial da União: Brasília, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa IN nº 51, de 18 de Setembro de 2002**. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado, do leite cru refrigerado e da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Diário Oficial da União: Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa IN nº 53, de 16 de agosto de 2002**. Aprova o Regulamento Técnico para Fabricação,

Funcionamento e Ensaio de Eficiência de Tanques Refrigeradores de Leite a Granel, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. Diário Oficial da União: Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62, de 29 de Dezembro de 2011**. Aprova o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. Diário Oficial da União: Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Modernização do RIISPOA**. 2017b. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animais/modernizacao-do-riispoa>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 204 de 17 de fevereiro de 2016**. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências. Diário Oficial da União: Brasília, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Dispõe sobre o Regulamento técnico dos padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 03 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. Brasília, 2018.

BRAUN P, SUTHERLAND JP. Predictive modelling of growth and measurement of enzymatic synthesis and activity by a cocktail of selected Enterobacteriaceae and *Aeromonas hydrophila*. **Int J Food Microbiol.**,105 (2):257-66, 2005.

BRITO, J. R. et al. Retail survey of Brazilian milk and Minas Frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n.15, p. 4954-4961, Aug. 2008.

BYUN, S.; JUNG, S.C.; YOO, H. S. Random amplification of polymorphic DNA typing of *Listeria monocytogenes* isolated from meat. **Int J Food microbiol**, v. 69, p. 227-235.

CAIXETA, D.S.; SCARPA, T.H.; BRUGNERA, D.F.; FREIRE, D.O.; ALVES, E.; ABREU, L.R.; et al. Chemical sanitizers to control biofilms formed by two *Pseudomonas* species on stainless steel surface. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.1, p.142-50, 2012.

CAPELLETTI, R. V. **Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais**. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2006. 81p.

CARVALHO, G. R.; COSTA, V. J. F. **Cenário continua adverso para a produção de leite**. Panorama do Leite, ano 8, n. 84. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2016.

CASTRO, K. A. et al. Efeito da contagem de células somáticas sobre a qualidade dos queijos prato e mussarela. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 8, n. 1, p. 1237-1250, 2014.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **About Antimicrobial Resistance: A Brief overview.** Atlanta, 2015. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>>, Acesso em: 10 jan. 2018.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Listeria (Listeriosis).** 2017. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/listeria/index.html>>; Acesso em: 20 jan.2018.

CHAMBEL, L. et al. Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 1, p.52-63, 2007.

CHARPENTIER, E; COURVALIN, P. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.43, p.2103-2108, 1999.

CHEN, B. Y., KIM, T. J., JUNG, Y. S., & SILVA, J. L. Attachment strength of *Listeria monocytogenes* and its internalin negative mutants. **Food Biophysics**, v.3, p. 329-332, 2008.

CHEN, B. Y., KIM, T. J., SILVA, J. L., & JUNG, Y. S. Positive correlation between the expression of *inlA* and *inlB* genes of *Listeria monocytogenes* and its attachment strength on glass surface. **Food Biophysics**, v.4, p.304-311, 2009.

CHENG, G. et al. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. **Biomaterials**, v. 28, p. 4192- 4199, 2007.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.65, p. 232 – 260, 2001.

CHRISTENSEN, A. B.; RIEDEL, K.; EBERL, L.; FLODGAARD, L. R.; MOLIN, S. GRAM, L., G. M. Quorum-sensing-directed protein expression in *Serratia proteamaculans* B5a. **Microbiology**, 149, p. 471-483, 2003.

COSTERTON, J. W. et al. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

COUTINHO, L. C. A.; MEDEIROS, E. S.; SILVEIRA, N. S.S.; SILVA, L. B. G.; MOTA, R. A. Eficácia *in vitro* de desinfetantes utilizados na antisepsia dos tetos frente a leveduras isoladas do leite de vaca com mastite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.1, p.61-65, 2012.

CRUZ, C. D. et al. *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.2, p. 195-206. 2008.

CRUZ, L.M.M.; NASCIMENTO, A.G.S.; SILVA, L.E.; LEAL, B.; KALIL, M.T.A.C.; ALMEIDA, H.C.C. Avaliação da citotoxicidade das soluções de clorexidina nas concentrações de 2,5% a 5%. **International Journal of Science Dentistry**, n. 38, 2012.

DALTON, C. B. et al. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. **New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 2, p. 100-105, 1997.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 114-122, 2003.

DERETI, R.; BONNET, M. **Evolução da pesquisa em pecuária leiteira. Qualidade, segurança e integridade em lácteos no Brasil: desafios e perspectivas**. Brasília, DF: Embrapa, 2017. 76 p.

DIAS, R.V.C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinária Brasileira**, v.1, n.1, p. 23-27, 2007.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DZIDIC, S., SUSKOVIC, J., KOS, B. Antibiotic resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technology Biotechnology**, v.46, n. 11, p. 11-21, 2008.

DURR, J. W. **Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite: PNQL**. In: DURR, J. W.; CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. O compromisso com a qualidade do leite. Passo Fundo: Editora UPF, 2004. p. 38-55.

EFSA. European Food Safety Authority. European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. **EFSA Journal**, v. 13, n. 1, p. 3991, 2015.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **A dinâmica da produção nos últimos 20 anos**. 2011a. Disponível em: <<http://www.cnp.gl.embrapa.br/sistemaproducao/4122-produ%C3%A7%C3%A3o-total-nos-pa%C3%ADses-principais-produtores>>. Acesso em: 05. jan. 2018.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Boas práticas na ordenha manual. Procedimentos para assegurar a qualidade do leite e derivados**. Embrapa Acre: CGPE: 2008.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Práticas para a produção de leite com qualidade**. 2011b. Disponível em: <<http://www.cnp.gl.embrapa.br/sistemaproducao/book/export/html/276> >. Acesso em: 07. abr. 2018.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Limpeza dos utensílios e equipamentos de ordenha**. Disponível em: <<http://www.cnp.gl.embrapa.br/sistemaproducao/473142-limpeza-dosutens%C3%ADlios-e-equipamento-de-ordenha>>. Acesso em: 07. abr. 2018.

FAI, A. E. C. et al. *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza (CE, Brasil): fator de risco para a saúde pública. **Ciência e Saúde Coletiva [online]**, v. 16, n. 2, p. 657-662, 2011.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Food and Agricultural commodities production**. 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 15. jul. 2017.

FERES, M. et al. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. **Journal of Applied Oral Science**, v.3, p. 297 – 309, 2012.

FLACH, J. et al. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n.3, p. 291-296, 2005.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.8, p. 623–633, 2010.

FRANCO, R. M. et al. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. **Higiene Alimentar**, v.14, n.68, p.70-77, 2000.

FREITAS, M. F. L. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus coagulase positivos* isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 2, p. 171 – 177, 2005.

FOLSOM, J.P., SIRAGUSA, G.R.; FRANK, J.F. Formation of biofilm at different nutrient levels by various genotypes of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection** v.69, p. 826–834, 2006.

FUSCO, V.; QUERO, G. M. Culture-dependent and culture-independent nucleic-acid based methods used in the microbial safety assessment of milk and dairy products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 493-537, 2014.

GERA, C.; SRIVASTAVA, S. Quorum-sensing: the phenomenon of microbial communication. **Curr Sci.**, v. 90, p. 666–676, 2006.

GLASER, P. et al. Analysis of microbial contamination levels of fruits and vegetables at retail in Monterrey, Mexico. **Journal of Food Agriculture & Environment.**, v.10, p.152-156, 2012.

GRACINDO, A. P. A. C.; PEREIRA, G. F. **Produzindo leite de alta qualidade**. Natal: EMPARN, 2010. 36p.

GRANDI, A. Z. **Influência de moléculas autoindutoras produzidas por *Escherichia coli* na formação de biofilme por *Listeria monocytogenes***. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2015. 88f.

GUEDES, M. E. S.; PACHECO, M. J. A.; FERNANDO, S. I. A. **Cloranfenicol, toxicologia mecanística**. 2008. Disponível em: <http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g7_cloranfenicol/>. Acesso em: 20. Jun. 2016.

GUERRANT, R. L. et al. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. **Clinical Infectious Diseases**, 1;32(3):331-51, 2001.

HARTMANN, W. Qualidade microbiológica do leite cru produzido na Região Oeste do Paraná e ocorrência de *Listeria monocytogenes*. **Ars Veterinaria**, v.25, n.2, p.072-078, 2009.

HAUN, M. A. D. **Avaliação da eficiência de um esterilizador a plasma na inativação de *Pseudomonas fluorescens***. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, SP, 2004. 71f.

HERALD, P. J.; ZOTTOLA, E. A. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. **Journal of Food Science**, v.53, p.1549-1552, 1988.

HITCHINS, A. D. Food and Drug Administration (FDA)/Center for Food Safety & Applied Nutrition (CFSAN). Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. **Bacteriological Analytical Manual**. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/ebam/bam-10.html>. Acesso em: 10. jul. 2017.

HOF, H. History and epidemiology of listeriosis. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 35:199-202, 2003.

HURTADO, A.; OCEJO, M.; OPORTO, B. Salmonella spp. and *Listeria monocytogenes* shedding in domestic ruminants and characterization of potentially pathogenic strains. **Veterinary Microbiology**, v. 210, p. 71–76, 2017.

HUTCHISON, M. L.; WALTERS, L. D.; MOORE, A.; CROOKES, K. M.; AVERY, S. M. Effect of length of time before incorporation on survival of pathogenic bacteria present in livestock wastes applied to agricultural soil. **Appl. Environ. Microbiol.** v.70, p. 5111–5118, 2004.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE, Estatística da Produção Pecuária** 2016. Rio de Janeiro: MPOG, 2016a.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE, Estatística da Produção Pecuária, Caderno 3**, 2017. Rio de Janeiro: MPOG, 2017.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Municipal dos Municípios**. Rio de Janeiro: MPOG, 2016b.

INFARMED, Prontuário terapêutico 11. 1ª ed. 2012. Lisboa: Infarmed, Ministério da Saúde. Disponível em: <http://www.infarmed.pt/prontuario/frameprimeiracapitulos.html>, Acesso em: 10/01/2018.

IVANEK, R.; GRÖHN, Y.T.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* in multiple habitats and host populations: review of available data for mathematical modeling. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.3, n.4, p.319-336, 2006.

JEMMI, T.; STEPHAN, R. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. **Revue Scientifique et Technique**, v.25, n. 2, p. 571-580, 2006.

KADAM, S. R. et al. Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin. **Int J Food Microbiol.**, v.165, p.259–264, 2013.

KASNOWSKI, M. C.; MANTILLA, S. P. S.; OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.3, n.15, 2010.

KELLER, L.; SURETTE, M. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. **Nature Reviews in Microbiology**, v. 4, n. 4, p.248-258, 2006.

KOKARE, C. R. et al. Biofilm: Importance and applications. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 159-168, 2009.

KRAMARENKO, T.; ROASTO, M.; MEREMÄE, K.; KUNINGAS M.; PÕLTSAMA, P.; ELIAS, T. *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. **Food Control**, v. 30, p.24-29, 2013.

LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 5, p. 620-626, 2013.

LANGONI, H.; SILVA, A.V.; CABRAL, K.G.; DOMINGUES, P.F. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.20, p.204-209, 1998.

LAPENDA, A. M.V.S. **Ocorrência de *Listeria spp.* em embutidos resfriados comercializados na cidade do Recife-PE**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010. 86f.

LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p. 645–659, 2006.

LIU, S.; GRAHAM, J. E.; BIGELOW, L.; MORSE, P. D.; WILKINSON, B. J. Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. **Applied Environmental Microbiology**, v.68, n.4, p.1697-1705, 2002.

LOGUE, C. M. et al. Repeated therapeutic dosing selects macrolide-resistant *Campylobacter spp.* in a turkey facility. **Journal of Applied Microbiology**, v.; 109, n. 4, p. 1379-1388, 2010.

LOPES, L. O.; LACERDA, M. S.; RONDA, J. B. Eficiência de desinfetantes em manejo de ordenha em vacas leiteiras na prevenção de mastites. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 21(1):1-9, 2013.

LOW, J. C.; DONACHE, W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. **The Veterinary Journal**, v.153, p.9-29, 1997.

LUCCHESI, E. G. **Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes *in vitro* e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, SP, 2006. 77f.

MAGALHÃES, R., FERREIRA, V., BRANDÃO, T.R.S., PALENCIA, R.C., ALMEIDA, G., TEIXEIRA, P. Persistent and non-persistent strains of *Listeria monocytogenes*: A focus on growth kinetics under different temperature, salt, and pH conditions and their sensitivity to sanitizers. **Food Microbiology**, v.57, p.103–108, 2016.

MARGATHO, L. F. F.; PEDRINI, S. C. B.; CURCI, V. C. M. Mastite bovina e o uso de antissépticos. **Pesquisa & Tecnologia**, v.11, n. 1, p.1-7, 2014.

- MARQUES, S. C.; EVANGELISTA, S. R.; PICCOLI, R. H. Diversidade e resistência a antibióticos de bactérias psicrotólicas isoladas de tanques coletivos de resfriamento de leite. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.71, n.4, p.670-6, 2012.
- MARTINS, M. L. ARAÚJO, E. F.; MANTOVANI, H.C.; MORAES, C. A. Detection of the *apr* gene in proteolytic psychrotrophic bacteria isolates from refrigerated raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 203-211, 2005.
- MARTINS, R.P.; SILVA, J.A.G.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; ALMEIDA FILHO E.S. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciênc. Anim. Bras.** 11:181-187, 2010.
- MEDEIROS, E. S. et al. Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n.7, p. 569-574, 2009.
- MELO, P.C.; FERREIRA, L.M.; NADER-FILHO, A.; ZAFALON, L.F.; VICENTE, H.I.G. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. **Biosciência Journal**, 28(1): 94-99, 2012.
- MICHELOTTO ALC, ANDRADE BM, SILVA JUNIOR JA, SYDNEY GB. Chlorhexidine in Endodontic Therapy. **Revista Sul Brasileira de Odontologia**, 5(1), 2008.
- MIGUEL, E. M. et al. Formação de biofilmes em trocadores de calor e seus efeitos em leite e derivados. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 1, p 53-63, 2014.
- MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.55, p.165-199, 2001.
- MOLINERI, A. I. et al. Association between milking practices and psychrotrophic bacterial counts in bulk tank milk. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 44, p. 187-194, 2012.
- MORAES, J. E. **Estudo da corrosão microbiológica no aço inoxidável 316 em na2so4 0,5 mol l-1**. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO, Guarapuava, PR, 2009. 96f.
- MOREAU-MARQUIS. S.; STANTON, B. A.; O'TOOLE, G. A. Pseudomonas aeruginosa biofilm formation in the cystic fibrosis airway. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 21, n. 4, p. 595-599, 2008.
- MORÃO et al. Produtos convencionais e extratos de plantas medicinais utilizados na higienização de tetos de bovinos leiteiros. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 7, n.1. Jan/abr. Suplemento 1. 2015.
- NASCIMENTO, H.M.; DELGADO, D.A.; BARBARIC, I.V. Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. **Revista Ceciliana**, v.2, n.1, p.11-13, 2010.
- NELSON, K. E. et al. Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. **Nucleic Acids Research**, 32:2386-2395, 2004.

- NERO, L. A. et al. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 391-393, 2007.
- NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 386-390, 2009.
- OLIVEIRA, A. B. A et al. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, v. 30, n. 3, p. 279 – 285, 2010.
- OLIVEIRA, A. P. **Qualidade e segurança da produção de leite**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2011.
- OXARAN, V. et al. *Listeria monocytogenes* incidence changes and diversity in some Brazilian dairy industries and retail products. **Food Microbiology**, v.68, p.16-23, 2017
- O'TOOLE, G. et al. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review Microbiology**, v. 54, p. 49-79, 2000.
- OSAILI, T.M.; OBEIDAT, B.A.; ABU JAMOUS, D.O.; BAWADI, H.A. Food safety knowledge and practices among college female students in North of Jordan. **Food Control**, v. 22, n.2, p. 269-276 2011.
- PARIHAR, V. S. et al. Characterization of human invasive isolates of *Listeria monocytogenes* in Sweden 1986-2007, **Journal of Foodborne Pathogens and Disease**, v.5, n.6, p. 755-761, 2008.
- PEDRINI, S.C.B.; MARGATHO, L.F.F. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Arquivos do Instituto Biológico**,70(4):391-395, 2003.
- PEREIRA, F. E. V. **Isolamento e caracterização de microrganismos em leite cru refrigerado e leite UHT no estado de Goiás e desenvolvimento de filme ativo antimicrobiano para inibição de *Bacillus sporothermodurans***. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010. 211f.
- PHILLIPS, M.F.; VASSEUR, P.B.; GREGORY, C.R. 1991. Clorhexedinediacetate versus povidone-iodine for preoperative preparation of the skin: a prospective randomized comparison in dogs and cats. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.** 27:105-108.
- PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. Mastitis: counter ttack. Naperville, Babson Bros, 1991. In: BELOTI, V. et al. Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado produzido no município de Sapopema/PR. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 16, p. 02-18, 2011.
- PITA, J. S. M. **Surto de listeriose entre 2009 e 2011 em Lisboa e Vale do Tejo - investigação e medidas implementadas pela ASAE**. Dissertação (Mestrado), Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Veterinária, Lisboa, 2012. 119p.
- POSFAY-BARBE, K.M.; WALD, E.R. Listeriosis. **Semin Fetal Neonatal Med** v.14, n.4, p. 228-233, 2009.

- RAENGPRADUB, S., M. WIEDMANN, AND K. J. BOOR. Comparative analysis of the sigma (B)-dependent stress responses in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains exposed to selected stress conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, 74:158-171, 2008.
- RAMALHO, A.C.; SOARES, K.D.A.; SILVA, D.F.; BARROS, M.R.C.; PINHEIRO JR, J.W.; OLIVEIRA, J.M.B.; MOTA, R.A.; MEDEIROS E.S. Eficácia *in vitro* de desinfetantes comerciais utilizados no *pré e pós-dipping* frente a *Staphylococcus* spp. isolados em rebanhos leiteiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 32(12):1285-1288, 2012.
- RAMASWAMY, V.; CRESENCE, V. M.; REJITHA, J. S.; LEKSMI, M.U.; DHARSANA, K. S.; PRASAD, S.P.; VIJILA, H. M. *Listeria*: review of Epidemiology and pathogenesis. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 40, n.1, p. 4-13, 2007.
- REIS-TEIXEIRA, F.B.; ALVES, V.F.; MARTINIS, E. C.P. Growth, viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, 48:587-591, 2017.
- RENNER, L. D.; WEIDEL, D. B. Physicochemical regulation of biofilm formation. **MRS Bull.**, v. 36, n. 5, p. 347-355, 2011.
- RIBEIRO JÚNIOR, J. C. et al. Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado produzido na região de Ivaiporã, Paraná. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 392, p. 5-11, 2013.
- RIBEIRO JÚNIOR, J. C. et al. Influência de boas práticas de higiene de ordenha na qualidade microbiológica do leite cru refrigerado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 6, p. 395-404, 2014.
- RIBEIRO NETO, A. C. et al. Qualidade do leite cru refrigerado sob inspeção federal na região Nordeste. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 5, p. 1343-1351, 2012.
- RICE, L.; BONOMO, R. Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial. Viçlor Lorian, M. D. (Eds). **Antibiotics in Laboratory Medicine**, 5 ed., p. 441-476, 2005.
- RODRIGUES, E.; CASTAGNA, A. A.; DIAS, M. T.; ARONOVICH, M. **Qualidade do leite e derivados: processos, processamento tecnológico e índices**. Niterói: Programa Rio Rural, 2013. 53p.
- ROSA, J. F. et al. Pontos críticos de contaminação na produção leiteira. **Expressa Extensão**, v.22, n.1, p. 90-103, 2017.
- ROSA, M. S. et al. **Boas Práticas de Manejo – Ordenha**. Jaboticabal: Funep, 2009. 43 p.: il.
- RUMJANEK, N. G.; FONSECA, M. C. C. XAVIER, G. R. Quorum sensing em sistemas agrícolas. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 33, 2004.
- RYAN, E. M., C. G. M. GAHAN, AND C. HILL. A significant role for Sigma B in the detergent stress response of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, 46:148-154, 2008.

SÁ, M.E.P.; MOTA, R.A.; SOUZA, M.I.; OLIVEIRA, A.A.F. Etiologia da mastite subclínica em bovinos leiteiros do agreste meridional do Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, 07(2):100-103, 2000.

SAKARIDIS, I. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated in chicken slaughterhouses in Northern Greece. **Journal of Food Protection**, 74 (6), 1017–1021, 2011.

SALISBURY JG, NICHOLLS TJ, Lammerding AM, Turnidge J, Nunn M. A risk analysis framework for the long-term management of antibiotic resistance in food-producing animals. **Int J Antimicrob Agents.**, 20(3):153-64, 2002.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PEREIRA, M. S. Microrganismos psicrotóxicos em leite. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 88, p. 27-33, 2001.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para o controle de mastites e melhoria da qualidade do leite**. Manole, Barueri/SP, p.47-54, 2007.

SÃO PAULO. Secretaria de Saúde, Centro de Vigilância Epidemiológica. **Manual das doenças transmitidas por alimento**. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/listeria.pdf>, Acesso em: 20 jan. 2018.

SELA, S.; FRANK, S.; BELAUSOV, E.; PINTO, R. A Mutation in the *luxS* gene influences *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Appl Environ Microbiol.**, v. 72, n.8, p.5653-8, 2006.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWSON, M. A.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P. M. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 17, n. 1, p. 7-15, 2011.

SHIRAI, M. A. **Conservação do leite cru pela aplicação de dióxido de carbono**. Dissertação (Mestrado), Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010. 75f.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; NOVAK, J. S. Quorum sensing: A primer for food microbiologists. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 5, p. 1053-1070. 2004.

SILVA, R. O. P. Sobre a nova instrução normativa n. 7 para a qualidade do leite. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, v. 11, n. 7, 2016.

SILVEIRA, M. L. R.; BERTAGNOLLI, S. M. M. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado informalmente em feiras livres no município de Santa Maria-RS. **Vig. Sanit. Debate**, v. 2, n. 2, p. 75-80, 2014.

SORHAUG T, STEPANIAK L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends Food Sci Technol.**, v.8, n.2, p.35-41, 1997.

SOUZA G.N. et al. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.5, p.1015-1020, 2009.

- SOUZA, E.R.N.; TEBALDI, V.M.R.; PICCOLI, R.H. Adaptação e adaptação cruzada de *Listeria monocytogenes* aos compostos eugenol e carvacrol. **Rev. Bras. Pl. Med**, v.17, n.4, p.528-533, 2015.
- SPINOSA H.S.; GORNIAC S.L.; BERNADINI M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 489p.
- STOODLEY, P.; et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.
- SUNITHA, R. et al. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in bovine mastitic milk and dairy farm environment. **International Journal of Science, Environment and Technology**, v.5, n. 2, 638 – 643, 2016.
- SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**, n.5, v.9, p. 222-227, 2001.
- SWAMINATHAN, B. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). Food microbiology, fundamentals and frontiers. 2nd ed., Washington D. C.: ASM, 2001. chap. 18, p. 383-409.
- TAFFAREL, L. E. et al. Contagem bacteriana total do leite em diferentes sistemas de ordenha e de resfriamento. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 1, p. 7-11, 2013.
- TEALE CJ. Antimicrobial resistance and the food chain. **J Appl Microbiol**, v. 92, n.1, p.85-9, 2002.
- TEIXEIRA P., LIMA J., AZEREDO J., OLIVEIRA R. Adhesion of *Listeria monocytogenes* to materials commonly found in domestic kitchens. **Int J Food Sci Technol**, 43 (7):1239–1244, 2008.
- TIPPER, D. J. Mode of action of β -lactam antibiotics. **Pharmacology & Therapeutics**, 27: 1-35, 1985.
- VALLIN, V. M. et al. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 181-188, 2009
- VASQUEZ-BOLAND, J. A. et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clin Microbiol Rev**, 14:584-640, 2001.
- VATANYOOPAISARN, S.; NAZLI, A.; DODD, C. E.; REES, C. E.; WAITES, W. M. Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.860-863, 2000.
- VIANA, E. S. **Moléculas sinalizadoras de quorum sensing em biofilmes formados por bactérias psicrotróficas isoladas de leite**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006. 176f.
- VILELA, D. **Desafios e oportunidades para a pecuária de leite no Brasil**. In: VILELA, D.; FERREIRA, R. de P.; FERNANDES, E. N.; JUNTOLLI, F. V. (Ed.). Pecuária de leite no Brasil: cenários e avanços tecnológicos. Brasília, DF: Embrapa, 2016. p. 127-144.

- VITALIS, G.S. **Utilização de nanopartículas de clorexidina como alternativa de medicação intracanal**. Dissertação (Mestrado), Centro Universitário Franciscano de Santa Maria, Santa Maria, 2012. 115f.
- VIVANT, A.L.; GARMYN, D.; PIVETEAU, P. 2013. *Listeria monocytogenes*, a down-to-earth pathogen. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v.3, p. 1-10, 2013.
- VUOTTO, C. et al. Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, v. 3, n. 3, p. 743-758, 2014.
- YAMAZI, A.K. et al. Práticas de produção aplicadas no controle de contaminação microbiana na produção de leite cru. **Biosciência Journal**, v. 26; n. 4; p. 610- 618, 2010.
- WANG, X. et al. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from retail raw foods. **Food Control**, v.32, p.153-158, 2013.
- WICKSTRÖM, E. et al. Relationship between somatic cell count, polymorphonuclear leucocyte count and quality parameters in bovine bulk tank milk. **Journal of Dairy Research**, v.76, n.2, p.195-201, 2009.
- WIECZOREK, K.; JACEK OSEK, J. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh and smoked fish in Poland. **Food Microbiology**, v. 64, p. 164-171, 2017.
- World Health Organization. **The burden of foodborne diseases is substantial**. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferginfoographics.pdf?ua=1> Acesso em 10. jul. 2017.
- YANG, H. **Evaluating the antimicrobial mechanism of neutral electrochemically activated water on foodborne pathogens and their biofilms**. Dissertation, Faculty of the Graduate School of the University of Minnesota, Minnesota, 2012.
- ZAFALON, L. F. et al. **Boas práticas de ordenha**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2008.
- ZENI, M. P.; MARAN, M.H.S.; SILVA, G.P.R.; CARLI, E.M.; PALEZI, S.C. Influência dos microrganismos psicrotóxicos sobre a qualidade do leite refrigerado para produção de UHT. **Unoesc & Ciência - ACET**, v. 4, n. 1, p. 61-70, 2013.
- ZILBAUER, M.; DORRELL, N.; WREN, B. W.; BAJAJ-ELLIOTT, M. *Campylobacter jejuni* mediated disease pathogenesis: an update. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.120, p. 123-129, 2007.

5. ARTIGO I

***Listeria monocytogenes* em leites de tanques de expansão em municípios do estado de Alagoas – AL, Brasil**

RESUMO

As doenças transmitidas por alimentos representam um problema mundial de saúde pública. Dentre os alimentos relacionados a estas doenças estão os lácteos, pois a qualidade do leite produzido em diversas regiões do Brasil é insatisfatória, deixando-o sujeito a micro-organismos. Considera-se *Listeria monocytogenes* um sério problema na segurança de alimentos, que no caso do leite representa um perigo potencial por, dentre outras características, poder resistir a temperaturas de conservação de alimentos. Diante da relevância da produção de leite no país, da considerável participação do estado de Alagoas-AL nesse setor, e da importância de obtenção de alimentos seguros, objetivou-se pesquisar *Listeria monocytogenes* em leites de tanques de expansão em municípios do estado de Alagoas-AL. Foram coletadas amostras de leite em tanques de 30 propriedades que fornecem leite para uma unidade de beneficiamento, e transportadas até o Laboratório de Inspeção de Carne e Leite (LICAL - UFRPE). Para as análises, seguiu-se o método ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004, com adaptações e colônias azuladas com ou sem formação de halo foram identificadas através de características morfo-tintoriais e bioquímicas. Detectou-se *Listeria monocytogenes* em 20% das amostras (6/30), o que representa um risco à saúde pública. Assim, o monitoramento do micro-organismo e da mastite no rebanho, a realização de pré e pós-*dipping*, a sanitização dos equipamentos e do tanque de armazenamento e a coleta do leite pelo caminhão refrigerado no tempo adequado possuem relevância na prevenção da contaminação do leite, sendo imprescindíveis para o fornecimento de alimentos seguros à população.

Palavras-chave: Doenças transmitidas por alimentos; Laticínios; Micro-organismos patogênicos; Saúde pública.

INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2017) relata que uma em cada 10 pessoas adoece no mundo por ano devido à ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTA). A partir de dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017), pode-se observar que foram relatados 7.170 casos de surtos alimentares no país do ano de 2000 a junho de 2017, sendo o leite e seus derivados relacionados a 2,8% dos casos. No que diz

respeito aos doentes, foram aproximadamente 1000 mil pessoas com algum tipo de sintoma relacionado a estas doenças.

Dentre os micro-organismos relacionados a casos de DTA, a *Listeria monocytogenes* é um patógeno psicotrófico que pode se multiplicar em temperaturas entre -0,4 a 50°C e possui ampla distribuição no ambiente. Este micro-organismo pode crescer em condições de anaerobiose e é tolerante ao calor, além de ser capaz de tolerar sucessivos processos de congelamento e descongelamento (HARTMANN et al., 2009; LIU, 2006).

Dados sobre listeriose em humanos foram estatisticamente registrados na Europa, o que destaca a necessidade de estudos relacionados à presença e sobrevivência do organismo em alimentos, assim como de sua investigação na cadeia produtiva de alimentos (BOTSARIS, 2016; EFSA, 2015). Estando presente nas etapas de produção de alimentos, este micro-organismo pode ter difícil eliminação devido a sua capacidade de formar biofilmes, tornando-se mais resistente aos materiais utilizados para a limpeza e sanitização (GRANDI, 2015).

No Brasil, a RDC nº 12/01 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2001), que estabelece os padrões microbiológicos para alimentos, não define o limite para *L. monocytogenes* em leite cru, apenas para alguns tipos de queijos, sendo preconizada a ausência em 25g do alimento.

Apesar de ser considerado estéril na glândula mamária de animais sadios, o leite pode sofrer contaminação por micro-organismos patogênicos a partir do momento da ordenha. Além disso, sua presença no trato gastrointestinal de vários animais pode contaminar o leite e seus derivados. Dentre as principais fontes contaminantes do leite estão a superfície de equipamentos utilizados na ordenha e do tanque, superfície externa dos tetos e do úbere (FUSCO; QUERO, 2014; MOLINERI et al., 2012).

No que diz respeito à produção de leite, a Região Nordeste foi responsável por 5,1% da produção nacional sob inspeção em 2016, representando 1,18 bilhões de litros de leite, e até março de 2017 foram produzidos mais de 10 mil litros em Alagoas (CONAB, 2017).

Porém, estes números não demonstram a realidade da cadeia produtiva do país, que enfrenta obstáculos em relação à obtenção do leite, principalmente em relação às condições higiênico-sanitárias. A qualidade do leite cru produzido em diversas regiões do Brasil ainda é considerada insatisfatória e este fator está relacionado à taxa de

multiplicação de micro-organismos (FREITAS et al., 2005; SOUZA et al., 2009; ZENI et al., 2013).

Diante do exposto, considerando a relevância da produção de leite no país, assim como da participação do estado de Alagoas-AL nesse setor, e a importância da obtenção de alimentos seguros, objetivou-se pesquisar *Listeria monocytogenes* em leites de tanques de expansão em municípios do estado de Alagoas-AL.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 30 amostras de leite provenientes de rebanhos bovinos em 30 propriedades localizadas em 10 municípios pertencentes à bacia leiteira do estado de Alagoas- AL (Mar Vermelho, Viçosa, Chã Preta, Minador do Negrão, Palmeira dos Índios, Cajueiro, Major Isidoro, Arapiraca, Jacaré dos Homens e Monteirópolis), que utilizam ordenha mecânica e são fornecedoras de leite para uma unidade de beneficiamento sob inspeção federal.

Coletou-se assepticamente 50 mL de leite, de acordo com a Circular Técnica 92 da Embrapa Gado de Leite (BRITO et al., 2007), com o auxílio de um coletor de aço inoxidável e frascos tipo Falcon estéreis, diretamente dos tanques de refrigeração por expansão direta das propriedades. Em seguida as amostras foram transportadas sob refrigeração a aproximadamente 4°C em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável até o Laboratório de Inspeção de Carne e Leite (LICAL- UFRPE), onde foram realizadas as análises.

Para o isolamento do micro-organismo, foi utilizado o método ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004 (ISO, 2004), com adaptações, onde as amostras de leite foram homogeneizadas e 25 mL de cada uma foram transferidos para frascos com tampa contendo 225 mL de caldo para pré-enriquecimento Demi Fraser (Acumedia) suplementado com 1g de Citrato de Ferro e Amônio III puríssimo (Vetec), para incubação por 24 horas a 30°C. Em seguida, de cada frasco foi transferido 0,1 mL para tubos com tampa contendo 10 mL de caldo para enriquecimento Fraser (Merck) suplementado com 0,5g Citrato de Ferro e Amônio III puríssimo (Vetec), e estes foram incubados por 24 horas a 37°C. Posteriormente, de cada tubo foi feita semeadura por esgotamento em placas de Petri contendo ágar Chromocult Listeria Seletivo, de acordo com Ottaviani e Agosti - Aloa (Merck), suplementado com 5mg de Anfotericina B (Cristália) e 10mg de Ceftazidima (ABL), e as placas foram incubadas por 48 horas a 37°C, com a finalidade

de se observar o desenvolvimento de colônias azuladas com ou sem formação de halo, caracterizando *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes*, respectivamente.

A partir disso, colônias sugestivas de *Listeria* spp. e de *Listeria monocytogenes* foram identificadas através de suas características morfo-tintoriais (coloração de Gram) e bioquímicas, utilizando-se os testes de catalase, motilidade e teste CAMP, de acordo com Barrow; Feltham (1993).

Utilizou-se como controle positivo de *L. monocytogenes* a cepa American Type Culture Collection (ATCC 19115), fornecida pelo Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO-PE, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, mantida em ágar estoque e renovada mensalmente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Constatou-se *Listeria* spp. em 23,3% das amostras (7/30), enquanto que 76,7% das amostras (23/30) não apresentaram colônias sugestivas do micro-organismo.

Durante as coletas, observou-se que em nenhum dos tanques a higiene era totalmente adequada, e em 66,6% (20/30) das propriedades, os tanques apresentavam-se extremamente sujos, em condições higiênico-sanitárias inadequadas para o armazenamento do leite, inclusive com a presença de moscas. Em relação a isso, observou-se que as amostras positivas para *Listeria* spp. e para *Listeria monocytogenes* foram provenientes dos tanques em que as condições higiênico-sanitárias eram as mais críticas. Práticas higiênico-sanitárias inadequadas podem promover a formação de biofilmes em tanques de armazenamento, favorecendo a persistência do micro-organismo no local (FRANCO et al., 2000; HAUN, 2004).

No entanto as características de produção de leite no país dificultam o desenvolvimento da atividade, pois, por serem na maioria pequenos produtores, geralmente investem pouco na atividade, possuem baixo conhecimento técnico, com falta de controle sanitário dos animais e pouca higiene durante a ordenha, conservação e transporte, podendo resultar em baixa qualidade da matéria-prima (NERO; VIÇOSA; PEREIRA, 2009).

Outro fator que pode ser relacionado à presença de *Listeria* spp. e de *L. monocytogenes* em leite, é a ocorrência de mastite no rebanho. De acordo com Ivanek; Gröhn; Wiedmann (2006), ruminantes podem perpetuar os ciclos de transmissão da *L. monocytogenes* e altas cargas da bactéria oriundas de ambientes rurais podem representar uma fonte de introdução do patógeno na cadeia de produção de laticínios.

Em estudo sobre a qualidade microbiológica de leites provenientes da bacia leiteira do Médio Mearim/MA, Almeida; Pereira; Costa (2013), encontraram contaminação por esse micro-organismo em 10% das amostras, resultado inferior ao encontrado no presente estudo. Contrariando estes valores, Gelinski; Baseggio (2013) não encontraram amostras positivas para *Listeria* spp. em leite cru armazenado sob refrigeração em propriedades rurais em Santa Catarina- SC.

Araújo (2015), avaliou a qualidade microbiológica de leite cru produzido na Zona da Mata e Agreste do Estado de Alagoas -AL, coletado durante a ordenha, e verificou a presença de *Listeria* spp. em 83,33% das amostras avaliadas. Ao investigar a qualidade microbiológica do leite *in natura* no estado da Paraíba-PB, também durante a ordenha, Catão e Ceballos (2001) verificaram em 73,3% das amostras a presença de *Listeria* spp.

De acordo com Miguel et al. (2014), quando é obtido ou processado em condições higiênicas não satisfatórias, o leite pode veicular micro-organismos patogênicos. Além disso, pode propiciar a multiplicação de deterioradores que diminuem a sua qualidade e a sua vida de prateleira e, conseqüentemente, de seus derivados. Segundo Barancelli et al. (2011), a presença de *Listeria* spp. no leite cru é preocupante, pois existe o hábito de consumi-lo ou utilizá-lo na produção de derivados sem nenhum tratamento térmico, principalmente quando contaminado por espécies de risco à saúde pública, como no caso de *Listeria monocytogenes*.

No que diz respeito à presença de *L. monocytogenes* no presente estudo, em 20% das amostras (6/30) detectou-se esta espécie. Resultado inferior foi observado por Mansouri-Najand et al. (2015), que avaliando a prevalência de *Listeria monocytogenes* em leite cru provenientes de tanques no Iran, obtiveram positividade em 5% das amostras. Waak; Tham; Danielsson-Tham (2002), avaliando a prevalência de *L. monocytogenes* em tanques de fazendas na Suécia, obtiveram resultado positivo em 1% das amostras. Resultado semelhante foi encontrado por Botsaris et al. (2016), estudando a prevalência de *Listeria monocytogenes* em tanques do Chipre, encontraram o micro-organismo em 0,98% das amostras.

Já Agostini et al. (2012), ao avaliarem amostras de leite *in natura* coletados da região do Vale do Taquari, RS, não observaram contaminação por *L. monocytogenes*. Da mesma forma, Arcuri et al. (2006), pesquisando este micro-organismo em amostras de leite de tanque de refrigeração nas regiões Sudeste de Minas Gerais e Norte do estado do Rio de Janeiro, não obtiveram resultados positivos.

Entretanto, comparar resultados em relação à ocorrência de *Listeria* spp. e de *Listeria monocytogenes* pode ser dificultado pela variedade de métodos analíticos utilizados, bem como diferenças no meio de cultura, padrões de amostragem adotados em cada caso e nos resultados alcançados, o que pode resultar em diferentes níveis de detecção. Além disso, as diferenças nos dados também podem ser explicadas pelas diferenças entre as áreas geográficas e pela especificidade geográfica da distribuição do gênero *Listeria* (BOTSARIS, 2016).

Para Barancelli et al. (2011), a quantidade de amostras avaliadas pode influenciar na probabilidade de presença ou ausência de *L. monocytogenes*. Ou seja, na análise de poucas amostras, a ausência de *L. monocytogenes* não significa, necessariamente, que o micro-organismo não esteja presente no lote. Por outro lado, uma ou duas amostras positivas podem representar uma alta porcentagem de ocorrência. Além disso, enfatiza que na comparação de dados de ocorrência, é preciso considerar que, durante os anos 1990, houve considerável aperfeiçoamento dos métodos de isolamento de *L. monocytogenes*, facilitando sua identificação.

A detecção deste micro-organismo em alimentos pode ser influenciada, seja pela presença de alta população da microbiota competitiva, por baixo nível de contagem do patógeno, ou ainda por interferências de componentes alimentares inibidores (NORTON, 2000). Segundo Meyer-Broseta et al. (2003), *L. monocytogenes* encontra-se nos alimentos em baixas concentrações, e no caso do leite, normalmente em contagens inferiores a 10 UFC/mL, seu crescimento pode ser inibido por outros micro-organismos.

Em estudo realizado por Padilha et al. (2001), *L. monocytogenes* não foi detectada nas amostras de leite cru analisadas. Entretanto, as análises microbiológicas evidenciaram a presença de outros micro-organismos gram positivos e gram negativos dos gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* e *Bacillus*. Os autores associaram a não detecção de *Listeria monocytogenes* à competição com os outros micro-organismos encontrados.

O leite cru contaminado pode ser fonte de contaminação cruzada para os produtos lácteos processados pela contaminação do ambiente na indústria (ARCURI et al., 2006). Em relação a isso, na Suécia, Waak; Tham; Danielsson-Tham (2002) relataram a ocorrência de *Listeria* spp. em tanques de leite das fazendas e silos de armazenamento de leite, provenientes de uma indústria de laticínios. Neste contexto, Chambel et al. (2007), avaliaram ocorrência deste micro-organismo em amostras de *swabs* coletados em laticínios de Portugal e encontraram *L. monocytogenes* em 40% das amostras testadas.

A presença de *Listeria* spp. e de *Listeria monocytogenes* no leite pasteurizado pode indicar um processo de pasteurização ineficiente ou contaminação pós-processamento do leite, ou ainda, a ocorrência de ambos os fenômenos (ALMEIDA; PEREIRA; COSTA, 2013). Neste contexto, a obtenção do leite de vacas sadias, em condições higiênicas adequadas, e o seu resfriamento imediato à temperatura adequada são medidas fundamentais e primárias para garantir a qualidade e a segurança do leite e seus derivados (ARCURI et al., 2006).

Nesse estudo, no que diz respeito à temperatura de refrigeração nos tanques de expansão, observou-se que em 96,6% das propriedades (29/30) os tanques estavam de acordo com a Instrução Normativa 62/11, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011) em relação à temperatura de armazenamento do leite, que é de 4 °C. Ao contrário disso, em 3,4% (1/30) observou-se a temperatura de armazenamento em desacordo, pois encontrava-se acima de 4 °C.

De acordo com Barancelli et al. (2011), o controle da *L. monocytogenes* torna-se dificultado pois o controle de patógenos tradicionalmente é centrado na higiene de ordenha e pasteurização do leite. Porém, para esse micro-organismo, somente essas medidas não são, necessariamente, suficientes na sua prevenção, pois, se não houver boas práticas de fabricação, recontaminações poderão ocorrer.

Segundo Rodrigues; Sá; Melo (2017), faz-se necessário identificar as doenças que afetam a população e a presença de agentes patogênicos em alimentos para então estabelecer medidas de mitigação de risco.

CONCLUSÃO

Observou-se a ocorrência de *Listeria monocytogenes* nas amostras de leite dos tanques de expansão avaliados, o que representa um risco à saúde pública. Assim, o monitoramento do micro-organismo e da mastite no rebanho, a realização de pré e pós-*dipping*, a sanitização dos equipamentos e do tanque de armazenamento e a coleta do leite pelo caminhão refrigerado no tempo adequado possuem relevância na prevenção da contaminação do leite, sendo imprescindíveis para o fornecimento de alimentos seguros à população.

REFERÊNCIAS

AGOSTINI. C. et al. Detecção de *Listeria monocytogenes* pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em amostras de leite bovino *in natura*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 7, n. 389, p. 15-20, 2012.

ALMEIDA, V.M.; PEREIRA, L.S.; COSTA, F.N. *Listeria* spp., coliformes, bactérias mesófilas e psicrotróficas no leite *in natura* e pasteurizado tipo C. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 72, n. 1, p. 104-9, 2013.

ARAÚJO, B. F. O. **Qualidade microbiológica e contagem de células somáticas de leite cru de vacas mestiças produzido na Zona da Mata e Agreste do Estado de Alagoas**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, AL, 2015. 48p.

ARCURI, E. F. et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.440-446, 2006.

BARANCELLI, G.V. et al. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n.1, p.155-68. 2011.

BARROW. G.I.; FELTHAM. R.K.A. **Manual for the Identification of Medical Bacteria**. 3 ed. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1993.

BOTSARIS, G. et al. Prevalence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in cattle farms in Cyprus Using bulk tank milk samples. **Journal of Food Safety**, 00 (2016) 00–00 VC, Wiley Periodicals, Inc., 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62, de 29 de Dezembro de 2011**. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. Diário Oficial da União: Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Dispõe sobre o Regulamento técnico dos padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 03 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. 2017. Brasília, 2017.

BRITO, J. R. F; SOUZA, G. N.; FARIA, C. G.; MORAES, L. C. D. **Procedimentos para coleta e envio de amostras de leite para determinação da composição e das contagens de células somáticas e de bactérias**. Circular técnica 92 Embrapa gado de leite. 2007.

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, p. 281-287, 2001.

CHAMBEL, L. et al. Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 1, p.52-63, 2007.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Conjuntura Mensal, Leite e Derivados**. Brasília- DF, junho de 2017.

EFSA. European Food Safety Authority. European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses,

zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. **EFSA Journal**, v. 13, n. 1, p. 3991, 2015.

FRANCO, R.M. et al. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite pasteurizado tipo C, leite de cabra pasteurizado congelado e iogurtes. **Higiene Alimentar**, v.14, n.68/69, p.70-77, 2000.

FREITAS, M.F.L. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus coagulase positivos* isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 2, p. 171 – 177, 2005.

FUSCO, V.; QUERO, G. M. Culture-dependent and culture-independent nucleic-acid based methods used in the microbial safety assessment of milk and dairy products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 493-537, 2014.

GELINSKI, J. L. N; BASEGGIO, P. Avaliação da Presença de *Listeria spp.*, Coliformes totais e contagem bacteriana total em leite cru armazenado sob refrigeração em propriedades rurais do município de Rio das Antas, Sc. **Seminário de Iniciação Científica e Seminário Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 3, n. 1, 2013.

GRANDI, A. Z. Influência de moléculas autoindutora produzidas por *Escherichia coli* na formação de biofilme por *Listeria monocytogenes*. 2015. 88f. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, SP, 2015.

HARTMANN, W. Qualidade microbiológica do leite cru produzido na Região Oeste do Paraná e ocorrência de *Listeria monocytogenes*. **Ars Veterinaria**, v.25, n.2, 072-078, 2009.

HAUN, M. A. D. **Avaliação da eficiência de um esterilizador a plasma na inativação de *Pseudomonas fluorescens***. 2004. 71f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, SP, 2004.

ISO. International Standart Organization. **ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004** Microbiological of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – part 1: detection method. AMENDMENT 1: Modification of the isolation media and the hemolysis test, and inclusion of precision data. Geneve: ISO, 2004. 4 p.

IVANEK, R.; GRÖHN, Y.T.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* in multiple habitats and host populations: review of available data for mathematical modeling. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.3, n.4, p.319-336, 2006.

LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 645–659, 2006.

MANSOURI-NAJAND, L. et al. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Kerman, Iran. **Veterinary Research Forum**, v. 6, n. 3, p. 223 – 226, 2015.

MEYER-BROSETA, S. et al. Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, n.1, p.1-15, 2003.

MIGUEL, E. M. et al. Formação de biofilmes em trocadores de calor e seus efeitos em leite e derivados. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 1, p 53-63, 2014.

MOLINERI, A. I. et al. Association between milking practices and psychrotrophic bacterial counts in bulk tank milk. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 44, p. 187-194, 2012.

NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 386-390, 2009.

NORTON, D.M.; McCAMEY, M.; BOOR, K.J.; WIEDMANN, M. Application of the BAX for screening/genus *Listeria* polymerase chain reaction system for monitoring *Listeria* species in cold-smoked fish and in the smoked fish processing environment. **Journal Food Protection**, v. 63, p.:343- 346, 2000.

PADILHA, M.R.F. et al. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 161-71, 2001.

RODRIGUES, C.S.; SÁ, C.V.G.C.; MELO, C.B. An overview of *Listeria monocytogenes* contamination in ready to eat meat, dairy and fishery foods. **Ciência Rural**, v.47, n. 2, e20160721, 2017.

WAAK, E.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 3366-3370, 2002.

World Health Organization. **The burden of foodborne diseases is substantial**. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferginfographics.pdf?ua=1> Acesso em 10. jul. 2017.

ZENI, M. P. et a. Influência dos microrganismos psicrotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado para produção de UHT. **Unoesc & Ciência - ACET**, v. 4, n. 1, p. 61-70, 2013.

6. ARTIGO II

***Listeria monocytogenes* formadoras de biofilme em leite de tanque de expansão e perfil de resistência a antimicrobianos e sanitizantes**

RESUMO

Objetivou-se avaliar a formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* provenientes de leite de tanques de expansão individuais e o perfil de resistência a antimicrobianos e a sanitizantes. Foram analisados seis isolados de *L. monocytogenes* provenientes de 30 amostras de leite coletadas em tanques de expansão. Os isolados foram submetidos a testes com os antimicrobianos penicilina G, ampicilina, cefalotina, cloranfenicol, ciprofloxacina, eritromicina, clindamicina e tetraciclina, pela difusão em disco. Em seguida, realizou-se o teste de formação de biofilme utilizando-se placa de microdiluição de 96 poços. Os isolados formadores de biofilme foram submetidos ao teste com os sanitizantes: cloro a 2,5% e clorexidine a 2%. Observou-se que 83,3% e 16,6% dos isolados apresentaram resistência e resistência intermediária a clindamicina, respectivamente e 16,6% de resistência a cloranfenicol e eritromicina. 66,6% dos isolados foram capazes de formar biofilme. O cloro foi mais eficaz em relação à capacidade de interferir nas células livres, inibindo a aderência em 50% dos isolados e permitindo uma fraca aderência em 50%. O clorexidine permitiu aderência moderada em 100% dos isolados. O cloro foi 75% mais eficaz na redução da aderência do biofilme em relação ao clorexidine. Evidencia-se a necessidade de realização de testes antimicrobianos e de aderência periodicamente para monitoramento da formação do biofilme por parte destes micro-organismos, assim como de avaliação regular da eficiência dos sanitizantes utilizados no pré e pós-*dipping*, com o intuito de promover o controle da *Listeria monocytogenes* no rebanho e de prevenir a contaminação do leite por micro-organismos patogênicos.

Palavras-chave: Antibióticos; Higienização; Listeriose; Micro-organismos patogênicos; Leite; Ordenha mecânica; Tanques de expansão; Saúde pública.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the formation of biofilm by *Listeria monocytogenes* from milk from individual expansion tanks and the profile of resistance to antimicrobials and sanitizers. Six isolates of *L. monocytogenes* from 30 samples of milk collected in

expansion tanks were analyzed. The isolates were submitted to antimicrobial agents Penicillin G, ampicillin, cephalothin, chloramphenicol, ciprofloxacin, erythromycin, clindamycin and tetracycline by the disc diffusion method. The biofilm formation test was then performed using a 96-well microdilution plate and the biofilm forming isolates were tested with 2.5% chlorine sanitizers and 2% chlorhexidine using a microdilution plate of 96 wells. It was observed that 83.3% and 16.6% of the isolates presented resistance and intermediate resistance to clindamycin, respectively, and 16.6% resistance to chloramphenicol and erythromycin. 66.6% of the isolates were able to form biofilm. Chlorine was more effective in the ability to interfere with free cells, inhibiting adhesion in 50% of the isolates and allowing a low adherence of 50%. Chlorhexidine allowed moderate adherence in 100% of the isolates. Chlorine was 75% more effective in reducing biofilm adhesion than chlorhexidine. It is evidenced the need to perform antimicrobial and adhesion tests periodically to monitor the formation of biofilm by these microorganisms, as well as regular evaluation of the efficiency of the sanitizers used in pre- and post-dipping, in order to promote the control of *Listeria monocytogenes* in the herd and to prevent contamination of milk by pathogenic microorganisms.

Keywords: Antibiotics; Sanitation; Listeriosis; Pathogenic microorganisms; Milk; Mechanical milking; Expansion tanks; Public health.

Introdução

O leite pode ser contaminado por micro-organismos patogênicos no momento da ordenha, tendo como fontes de contaminação utensílios e equipamentos, o tanque de refrigeração e superfícies externas dos tetos e do úbere (MOLINERI et al., 2012; FUSCO; QUERO, 2014).

Dentre estes micro-organismos pode-se citar *Listeria monocytogenes*, que além de possuir ampla distribuição no ambiente, pode crescer em anaerobiose e tolerar sucessivos congelamentos e descongelamentos. Por ser um patógeno psicrotrófico, representa um perigo para contaminações em leites armazenados em tanques de refrigeração (LIU, 2006; HARTMANN et al., 2009).

Sendo um dos micro-organismos envolvidos em casos de mastite, os ruminantes podem perpetuar os ciclos de transmissão da *L. monocytogenes* e cepas provenientes de ambientes rurais podem representar uma fonte de introdução do patógeno na cadeia de produção de laticínios (IVANEK et al., 2006; SUNITHA et al., 2016).

Diversos princípios ativos podem ser utilizados no pré e pós-*dipping* com o objetivo de controlar a contaminação microbiana durante a ordenha, e dentre os mais utilizados nestes processos estão o clorexidine e o cloro (MEDEIROS et al., 2009).

Devido a capacidade de formar biofilmes, estando presente nas etapas de produção de alimentos, *L. monocytogenes* pode ser de difícil eliminação, pois a membrana exopolimérica formada funciona como uma barreira protetora aos produtos utilizados para a limpeza e sanitização (CAIXETA et al., 2012; GRANDI, 2015).

L. monocytogenes é o agente etiológico da listeriose, que é considerada uma questão de saúde pública crescente (CDC, 2017). Os principais grupos de risco para listeriose são gestantes, recém-nascidos, imunocomprometidos e idosos (OXARAN et al., 2017; WIECZOREK e OSEK, 2017), nos quais pode causar infecções graves, como meningite, encefalite, endocardite e pneumonia, além de aborto, morte fetal, nascimento prematuro, septicemia ou meningite neonatal (PARIHAR et al., 2008; FAI et al., 2011).

Geralmente no tratamento da listeriose a *L. monocytogenes* mostra-se sensível a maioria das drogas empregadas no combate a bactérias gram-positivas, porém, observa-se aumento no número de cepas resistentes e esse perfil de resistência tem sido comum em relação a cepas isoladas de alimentos (AURELI, 2003; SAKARIDIS et al., 2011; WANG et al., 2013).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar a formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* provenientes de leite de tanques de expansão e o perfil de resistência a antimicrobianos e a sanitizantes utilizados no pré e pós-*dipping*.

Material e Métodos

Foram analisados seis isolados de *Listeria monocytogenes* provenientes de 30 amostras de leite coletadas em tanques de expansão individuais em propriedades que utilizam ordenha mecânica e são fornecedoras de leite para uma unidade de beneficiamento sob inspeção federal. O isolamento e a identificação fenotípica foram realizados de acordo com Moura et al. (2018).

Para avaliar a resistência antimicrobiana, foram testados penicilina G (10U), ampicilina (10µg), cefalotina (30µg), cloranfenicol (30µg), ciprofloxacina (5µg), eritromicina (15µg), clindamicina (2µg) e tetraciclina (30µg), pelo método de difusão em disco (BAUER et al., 1966). Colônias de *L. monocytogenes* foram suspensas em 5ml de solução salina estéril e diluídas até a turvação 0.5 na escala de McFarland. A solução foi semeada com swab em placas contendo ágar Mueller-Hinton (Himedia) suplementado

com sangue equino a 5% (EUCAST, 2017). Após secagem do inóculo, os discos foram colocados sobre o ágar e incubados a 37°C/24h. Utilizou-se cepa padrão de *L. monocytogenes* (ATCC 19115) fornecida pelo Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO-PE, como controle positivo e a leitura e a interpretação dos resultados foram realizadas de acordo com os pontos de corte (break points) específicos para *L. monocytogenes*, sendo cefalotina (CLSI, 2012), ampicilina, eritromicina e penicilina G (EUCAST, 2017). Para os antimicrobianos clindamicina, tetraciclina, ciprofloxacina e cloranfenicol devido à ausência de padronização nos critérios para *L. monocytogenes*, foram utilizados os pontos de corte para *Staphylococcus* spp. (CLSI, 2017). A partir da leitura do diâmetro dos halos, as zonas de inibição foram mensuradas e classificadas em sensível, intermediária ou resistente.

Na avaliação da formação de biofilme, utilizou-se metodologia adaptada de Rodrigues et al. (2010), em que colônias de *L. monocytogenes* foram inoculadas em 3mL de Caldo Triptona Soja (Himedia®) até turvação 0.5 na escala de McFarland e incubadas a 37°C por 24 horas. A partir disso, 100µl da solução foram inoculados em placas de microdiluição de 96 poços e incubados a 37°C/ 24h. O conteúdo de cada poço foi aspirado e estes foram lavados três vezes com água destilada estéril. Após secagem das placas em temperatura ambiente, as células aderidas foram coradas com 200µl de violeta de genciana a 0,25% e após 5 minutos os poços foram lavados e submetidos à secagem. Em seguida, foram adicionados 200µl de álcool: acetona (80:20) e seguiu-se com a leitura da densidade óptica (DO) por espectrofotometria a 620nm. Para classificar os isolados quanto à produção de biofilme, foi medida a densidade óptica média (DO) do controle negativo (DO_{CN}) e comparada com a DO média dos isolados (DO_{IS}), sendo estes classificados como: negativo (DO_{IS}< DO_{CN}); fraco (DO_{CN}<DO_{IS}<2.DO_{CN}); moderado (2.DO_{CN}<DO_{IS}<4.DO_{CN}); e forte (4.DO_{CN}<DO_{IS}) formadores de biofilme (MERINO et al., 2009). Nos três testes, em cada placa foi utilizado um poço contendo somente Caldo Triptona Soja como branco, uma cepa de *Escherichia coli* ATCC® DH 5a como controle negativo e os testes foram realizados em triplicata.

Para avaliar a resistência a sanitizantes, os isolados classificados como formadores de biofilme foram submetidos ao teste com os sanitizantes, sendo o cloro a 2,5% e clorexidina a 2%, ambos adquiridos comercialmente, avaliados quanto à interferência na adesão dos isolados de *L. monocytogenes* (biofilme em formação) e à capacidade de interferir no biofilme consolidado de acordo com Peixoto et al. (2015), com adaptações, utilizando-se placas de microdiluição de 96 poços. Para avaliar a ação dos sanitizantes

sobre o biofilme em formação, colônias de *L. monocytogenes* foram inoculadas em 3mL de Caldo Triptona Soja (Himedia®) até turvação 0.5 na escala de McFarland e incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período, 100µl da solução foram adicionados aos poços das placas de microdiluição e em seguida foram adicionados 100µl do sanitizante, e seguiu-se a incubação a 37°C/24h. O conteúdo de cada poço foi aspirado e foram realizadas três lavagens com água destilada estéril. Após secagem da placa em temperatura ambiente, adicionou-se 200µl de violeta de genciana a 0,25% durante 5 minutos e os poços foram novamente lavados e submetidos à secagem. Em seguida, adicionou-se 200µl de álcool:acetona (80:20) e seguiu-se a leitura da densidade óptica. Para a determinação do grau de aderência sob a ação do sanitizante foram utilizadas as equações descritas anteriormente para analisar a formação de biofilme.

Para avaliar a ação dos sanitizantes sobre o biofilme consolidado, colônias de *L. monocytogenes* foram inoculadas em 3mL de Caldo Triptona Soja (Himedia®) até turvação 0.5 na escala de McFarland e incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, 100µl da solução foram inoculados em placas de microdiluição e incubados a 37°C/24h. Posteriormente, o conteúdo de cada poço foi aspirado e três lavagens com água destilada estéril foram realizadas. Após a secagem em temperatura ambiente foram adicionados 200µl do sanitizante e realizada uma primeira leitura da densidade óptica. Em seguida, a placa foi incubada a 37°C/24h e realizou-se a segunda leitura. A DO dos poços foi determinada após a adição do sanitizante (0h) e 24 horas após incubação da placa a 37°C, sendo a ação do sanitizante no biofilme consolidado definida pela equação: $100 - [(DO_{24h} \text{ média} / DO_{0h} \text{ média}) \times 100]$ (MARINO et al., 2010).

Nos três testes, em cada placa foi utilizado um poço contendo somente Caldo Triptona Soja como branco, uma cepa de *Escherichia coli* ATCC® DH 5α como controle negativo e os testes foram realizados em triplicata. A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada por espectrofotometria a 620nm. A análise estatística foi do tipo descritiva, analisando-se as frequências absoluta e relativa (SAMPAIO, 1998).

Resultados e Discussão

Na Tabela 1 encontram-se os resultados da suscetibilidade de *L. monocytogenes* aos antimicrobianos testados. Observou-se resistência a clindamicina (83,3% - 5/6), cloranfenicol (16,6% - 1/6) e eritromicina (16,6% - 1/6), e resistência intermediária a clindamicina (16,6% - 1/6).

Tabela 1: Perfil de resistência a antimicrobianos de *Listeria monocytogenes* isoladas de leite de tanques de expansão.

Antimicrobiano	Resistência dos isolados		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Penicilina G			100% (6/6)
Ampicilina			100% (6/6)
Cloranfenicol	16,6% (1/6)		83,3% (5/6)
Tetraciclina			100% (6/6)
Cefalotina			100% (6/6)
Ciprofloxacina			100% (6/6)
Eritromicina	16,6% (1/6)		83,3% (5/6)
Clindamicina	83,3% (5/6)	16,6% (1/6)	

Em estudo realizado por De Nes et al. (2010), avaliando a resistência antimicrobiana de *L. monocytogenes* em produtos lácteos em Porto Alegre/ RS, nenhuma das 19 cepas analisadas foi resistente a ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol e apenas um dos isolados mostrou suscetibilidade reduzida a ciprofloxacina. Avaliando a resistência antimicrobiana de espécies de *Listeria* spp. isoladas de leite cru, Osman et al. (2016) observaram que a suscetibilidade dos isolados variou entre 84,2 e 100% para a maioria dos antimicrobianos. Os isolados de *L. monocytogenes* provenientes de leite de búfala foram resistentes ao cloranfenicol, já os de leite de vaca apresentaram resistência ao trimetoprim e ao sulfamatoxazol.

Os micro-organismos podem apresentar mecanismos de resistência intrínsecos, ou adquiridos por transmissão de material genético ou mutação (RICE e BONOMO, 2005). Em *Listeria* spp. a aquisição de elementos genéticos móveis de outras bactérias foi relatada por Charpentier e Courvalin (1999). Da mesma forma, *L. monocytogenes* pode adquirir ou transferir genes de resistências a antibióticos, a partir de plasmídeos e transposons de outras espécies bacterianas seja “*in vitro*” ou “*in vivo*” no trato intestinal (OSAILI et al., 2011).

A resistência a eritromicina e a clindamicina tem sido cada vez mais observada. A multiplicidade de mecanismos de resistência apresentada pelos micro-organismos a estas drogas incluem a diminuição da permeabilidade, alteração do local de ação no ribossoma, ação enzimática e bombas de efluxo. O mecanismo mais comum é a alteração

do alvo no ribossomo, alterando a sua conformação e impossibilitando a ligação do antibiótico (LECLERC, 2002).

Têm se observado um aumento da resistência aos antibióticos, particularmente entre as bactérias zoonóticas, que é provavelmente, conseqüente do uso indiscriminado das drogas. Também há correlação entre a resistência aos antimicrobianos e sua utilização na produção animal (BEBELL et al., 2014; LEE et al., 2015). A resistência de cepas de *L. monocytogenes* a antibióticos pode comprometer as opções de tratamentos para a listeriose. Conter et al. (2009) alertam para a necessidade de vigilância contínua de resistência desse patógeno para garantir eficiência nos tratamentos da listeriose humana.

Biofilmes podem influenciar na resistência bacteriana, já que nestas formações há proteção das bactérias à ação dos antibacterianos, pois impedem fisicamente a entrada das moléculas, e ainda, favorecem as trocas gênicas. Assim, podem contribuir também para a natureza crônica das infecções (DAVIES, 2003; MOREAU-MARQUIS et al., 2008; VUOTTO et al., 2014).

Os resultados relacionados à formação de biofilme e à ação dos sanitizantes encontram-se na Tabela 2. Observou-se que 66,6% (4/6) dos isolados foram capazes de formar biofilme, sendo classificados como fortes 33,3% (2/6) ou fracos 33,3% (2/6) formadores de biofilmes.

Segundo Reis-Teixeira et al. (2017), a formação de biofilmes por *L. monocytogenes* é influenciada não apenas pela cepa e por sua origem, mas também por fatores intrínsecos e extrínsecos, como por exemplo a superfície e o substrato em que o micro-organismo está em contato. Teixeira et al. (2008), avaliaram a capacidade de adesão de *Listeria monocytogenes* a materiais normalmente usados em cozinhas (aço inoxidável, mármore, granito, vidro, polipropileno e silestone). Verificou-se que todas as estirpes aderiram a todos os materiais.

De acordo com a Instrução Normativa IN nº 53/2002, do MAPA, o tanque e os equipamentos associados deverão ser construídos de forma a evitar contaminação do leite e corrosão dos materiais constitutivos, e de maneira tal que a limpeza, desinfecção e inspeção sejam realizadas sem dificuldade (BRASIL, 2016).

A motilidade flagelar pode favorecer a capacidade de *L. monocytogenes* em formar biofilme. Porém, a temperatura pode afetar a formação do flagelo, pois em temperaturas acima de 30°C há a repressão da transcrição do gene flagelar *MogR*, dificultando assim a adesão (PEEL et al., 1988; LIU et al., 2002; SHEN e HIGGINS,

2006). No presente trabalho a incubação ocorreu a 37 °C, o que pode ter dificultado a formação dos flagelos das cepas e consequentemente a adesão.

Tabela 2: Formação de biofilme e ação de sanitizantes utilizados no pré e pós-*dipping* sobre *Listeria monocytogenes* isoladas de leite de tanque de expansão.

Isolado	Capacidade de formação de biofilme	Ação sobre biofilme em formação (Aderência)		Ação sobre biofilme consolidado (Redução da aderência)	
		Cloro	Clorexidine	Cloro	Clorexidine
1	Negativa				
2	Fraca	Fraca	Moderada	72,5%	75,9%
3	Forte	Fraca	Moderada	80,26%	75,9%
4	Forte	Sem aderência	Moderada	79,53%	77,50%
5	Fraca	Sem aderência	Moderada	76,07%	71,92%
6	Negativa				

No que diz respeito à ação dos sanitizantes, como pode-se observar na Tabela 2, houve ação mais eficaz do cloro em relação à capacidade de interferir nas células (livres) planctônicas, já que em 50% (2/4) inibiu completamente a aderência da cepa e em 50% (2/4) a sua ação permitiu uma fraca aderência da cepa à superfície. O clorexidine, ao contrário, permitiu uma aderência moderada em 100% dos isolados. Desta forma, os isolados apresentaram maior resistência ao clorexidine.

Carandina (2013), estudando sobre a formação de biofilme e a resistência a sanitizantes de *L. monocytogenes* provenientes de laticínios do estado de São Paulo, observou que das 19 cepas avaliadas, nenhuma foi resistente ao clorexidine a 2%.

O clorexidine é bastante utilizado no pré e pós-*dipping* por possuir amplo espectro de ação e não ser inativado por pequenas quantidades de matéria orgânica, como sangue, leite, pus e fluidos teciduais. Porém a água dura interfere na sua ação sanitizante, pois nessas condições há formação de sais insolúveis a partir do clorexidine (PASSOS, 2004; SANTOS e FONSECA, 2007). O cloro é também muito utilizado como sanitizante nas propriedades leiteiras, pois apresenta baixo custo e boa ação desinfetante. Através da desnaturação de proteínas da membrana celular dos micro-organismos, o cloro interfere

no transporte de nutrientes e promove a perda de componentes celulares (MORÃO et al., 2015).

Em relação à interferência dos sanitizantes ao biofilme consolidado, observou-se que o cloro foi mais eficaz do que o clorexidine em 75% (3/4) dos isolados. A ação do clorexidine foi mais eficaz apenas em 25% (1/4) dos isolados. Sendo novamente os isolados mais resistentes ao clorexidine.

Rodrigues et al. (2011), sobre suscetibilidade de biofilmes de *L. monocytogenes* a diferentes desinfetantes (hipoclorito de sódio, cloreto de benzalcônio, peróxido de hidrogênio e triclosan) que, de uma forma geral, mostrou que os biofilmes de *L. monocytogenes* foram mais suscetíveis ao hipoclorito de sódio do que a qualquer outro desinfetante testado.

Observa-se que o cloro na diluição utilizada no estudo foi mais eficaz do que o clorexidine nas duas situações avaliadas, podendo ser o mais indicado para uso nos processos de pré e pós-*dipping* nas propriedades das áreas de onde as cepas foram isoladas.

O cloro possui amplo espectro, baixo custo e facilidade de preparo e aplicação, porém o seu uso requer alguns cuidados principalmente em relação à concentração, pois é altamente corrosivo, podendo reagir com matéria orgânica, irritar a pele, mucosa e vias respiratórias dos manipuladores onde for utilizado (SILVA et al., 2010).

O mecanismo de ação antibacteriana do clorexidine envolve adsorção à membrana celular por interações eletrostáticas, assim a matriz do biofilme dificulta a sua interação com a membrana celular (ZANATTA e ROSING, 2007). Bonez et al. (2013), descreve que são necessários mais estudos sobre o mecanismo de penetração de clorexidina na parede celular em biofilmes.

Antes da aplicação de sanitizantes é necessário conhecer suas funções, concentrações efetivas, modo de ação, como e onde eles serão usados, e a forma correta de prepará-los para otimizar sua aplicação e obter melhores efeitos (MAILLARD, 2016). Outro fator que favorece a resistência microbiana é o uso excessivo de desinfetantes em equipamentos e utensílios utilizados na ordenha (LANGSRUD et al., 2003).

Ressalta-se que resultados de sensibilidade obtidos “*in vitro*” não necessariamente correspondem aos resultados que podem ser obtidos “*in vivo*”. Portanto tais resultados devem ser considerados apenas como um indicativo do desempenho do melhor desinfetante avaliado (SARTORI et al., 2012).

Além de se levar em consideração o tempo de contato nas superfícies a serem higienizadas, faz-se necessário o controle da concentração do produto para garantir sua efetividade (NASCIMENTO et al., 2010). Outro fator importante é que devem ser evitadas situações de exposição do sanitizante à luz solar ou à temperaturas elevadas que possam comprometer o pH, e o efeito antimicrobiano (CLARKSON et al., 2001).

Variações apresentadas no perfil de suscetibilidade bacteriana frente a desinfetantes fazem com que sejam necessárias avaliações periódicas dos produtos. (MEDEIROS et al., 2009). Além disso, realizar rodízio entre as substâncias ativas é recomendável para evitar que os micro-organismos tornem-se resistentes a determinado produto (MARGATHO et al., 2014).

Conclusão

A detecção de cepas de *Listeria monocytogenes* formadoras de biofilme em leite de tanque de expansão e a resistência destas a produtos utilizados rotineiramente nos processos de pré e pós-*dipping* predispõem para a persistência de *Listeria monocytogenes* na cadeia de produção de leite, o que representa um risco à saúde pública. Além disso, a ocorrência de cepas resistentes aos antimicrobianos pode comprometer o tratamento da listeriose humana. Evidencia-se a necessidade de realização de testes antimicrobianos e de aderência periodicamente para monitoramento da formação do biofilme por parte deste micro-organismo, assim como de avaliação regular da eficiência dos sanitizantes utilizados no pré e pós-*dipping*, com o intuito de promover o controle da *Listeria monocytogenes* no rebanho e de prevenir a contaminação do leite por micro-organismos patogênicos.

Referências

- AURELI, P. et al. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics. **Int J. Food Microbiol**, v. 83, p. 325-30, 2003.
- BEBELL, L. M.; MUIRU, A. N. Antibiotic use and emerging resistance: how can resource-limited countries turn the tide? **Global Heart**, v. 9, n. 3, p. 347-358, 2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa IN nº 53, de 16 de agosto de 2002**. Aprova o Regulamento Técnico para Fabricação, Funcionamento e Ensaio de Eficiência de Tanques Refrigeradores de Leite a Granel, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. Diário Oficial da União: Brasília, 2002.
- CAIXETA, D.S. et al. Chemical sanitizers to control biofilms formed by two *Pseudomonas* species on stainless steel surface. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.1,p.142-50, 2012.

CARANDINA, D. C.F. **Avaliação de biofilmes formados por *Listeria monocytogenes* provenientes de ambientes de laticínios e perfil de resistência a agentes sanitizantes.** Dissertação (Mestrado), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013. 66f.

CDC. Centers for disease control and prevention. ***Listeria (Listeriosis)***. 2017. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/listeria/index.html>>; Acesso em: 20 jan.2018.

CHARPENTIER, E; COURVALIN, P. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**., v.43, p. 2103-2108, 1999.

CLARKSON, R.M; MOULE, A. J. PODLICH, H.M. The shelf-life of sodium hypochlorite irrigating solutions. **Australian Dental Journal**, v. 46, n. 4, p.269-76, 2001.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals.** Approved standard - 22th Edition. M100-S22. Pennsylvania: EUA.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals.** Approved standard - 27th Edition. M100-S26. Pennsylvania: EUA.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 114-122, 2003.

DE NES, F. **Caracterização molecular e suscetibilidade antimicrobiana de linhagens de *Listeria monocytogenes* isoladas de produtos lácteos no RS.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2017). **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters**, version 7.0.

FAI, A. E. C. et al. *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza (CE, Brasil): fator de risco para a saúde pública. **Ciência e Saúde Coletiva [online]**, v. 16, n. 2, p. 657-662, 2011.

FUSCO, V.; QUERO, G. M. Culture-dependent and culture-independent nucleic-acid based methods used in the microbial safety assessment of milk and dairy products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 493-537, 2014.

GRANDI, A. Z. **Influência de moléculas autoindutoras produzidas por *Escherichia coli* na formação de biofilme por *Listeria monocytogenes*.** Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2015. 88f.

HARTMANN, W. Qualidade microbiológica do leite cru produzido na Região Oeste do Paraná e ocorrência de *Listeria monocytogenes*. **Ars Veterinaria**, v.25, n.2, p. 072-078, 2009.

IVANEK, R.; GRÖHN, Y.T.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* in multiple habitats and host populations: review of available data for mathematical modeling. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.3, n.4, p.319-336, 2006.

LECLERCQ, R. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. **Clinical Infectious Disease**, v.34, p.482 – 492, 2002.

- LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p. 645–659, 2006.
- LIU, S. et al. Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. **Applied Environmental Microbiology**, v.68, n.4, p.1697-1705, 2002.
- MARGATHO, L. F. F.; PEDRINI, S. C. B.; CURCI, V. C. M. Mastite bovina e o uso de antissépticos. **Pesquisa & Tecnologia**, v.11, n. 1, p.1-7, 2014.
- MARINO, A. et al. In vitro effect of branch extracts of *Juniperus* species from Turkey on *Staphylococcus aureus* biofilm. **Medical Microbiology and Immunology**, v.59, p. 470–476, 2010.
- MEDEIROS, E. S. et al. Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n.7, p. 569-574, 2009.
- MERINO, N. et al. Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 3, p. 832–843, 2009.
- MOLINERI, A. I. et al. Association between milking practices and psychrotrophic bacterial counts in bulk tank milk. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 44, p. 187-194, 2012.
- MORÃO et al. Produtos convencionais e extratos de plantas medicinais utilizados na higienização de tetos de bovinos leiteiros. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 7, n.1, suplemento 1. 2015.
- MOREAU-MARQUIS. S.; STANTON, B. A.; O'TOOLE, G. A. Pseudomonas aeruginosa biofilm formation in the cystic fibrosis airway. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 21, n. 4, p. 595-599, 2008.
- MOURA, F. M. L. et al. *Listeria monocytogenes* in expansion tank milk assessed in Alagoas state counties, Brazil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 12, n. 1, p. 24-28, 2018.
- NASCIMENTO, H. M.; DELGADO, D. A.; BARBARIC, I. F. Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. **Revista Ceciliana**, v.2, n.1, p.11-13, 2010.
- OSAILI, T.M. et al. Food safety knowledge and practices among college female students in North of Jordan. **Food Control**, v. 22, n.2, p. 269-276 2011.
- OSMAN, K. M. et al. Determination of virulence and antibiotic resistance pattern of biofilm producing *Listeria* species isolated from retail raw milk. **BMC Microbiology**, v. 16, p. 263, 2016.
- OXARAN, V. et al. *Listeria monocytogenes* incidence changes and diversity in some Brazilian dairy industries and retail products. **Food Microbiology**, v.68, p.16-23, 2017.
- PARIHAR, V. S. et al. Characterization of human invasive isolates of *Listeria monocytogenes* in Sweden 1986-2007, **Journal of Foodborne Pathogens and Disease**,v.5, n.6, p. 755-761, 2008.

- PEIXOTO, M. M. R. et al. Ação dos desinfetantes sobre a adesão e biofilme consolidado de *Staphylococcus* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 2, p.105-109, 2015.
- REIS-TEIXEIRA, F.B.; ALVES, V.F.; MARTINIS, E. C.P. Growth, viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, 48:587-591, 2017.
- RICE, L., BONOMO, R. **Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial**. Viçlor Lorian, M. D. (Eds), *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 5^a ed., pp. 441-476, 2005.
- RODRIGUES, D. et al. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Enteritidis biofilms susceptibility to different disinfectants and stress-response and virulence gene expression of surviving cells. **Microbial Drug Resistance**, v.17, n.2, p. 181-189, 2011.
- RODRIGUES L.B. et al. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.1082- 1085, 2010.
- SAKARIDIS, I. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated in chicken slaughterhouses in Northern Greece. **Journal of Food Protection**, v.74, n.6, p. 1017–1021, 2011.
- SAMPAIO, I.B.M. 1998. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. UFMG, Belo Horizonte. 221p.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para o controle de mastites e melhoria da qualidade do leite**. Manole, Barueri/SP, p.47-54, 2007.
- SILVA, S.; TEIXEIRA, P.; OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J. Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. **Journal of Food Protection**, v.71, n.7, p. 1379-1385, 2008.
- SUNITHA, R. et al. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in bovine mastitic milk and dairy farm environment. **International Journal of Science, Environment and Technology**, v.5, n. 2, 638 – 643, 2016.
- TEIXEIRA, P.; LIMA, J.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Adhesion of *Listeria monocytogenes* to materials commonly found in domestic kitchens. **Int J Food Sci Technol**, 43 (7):1239–1244, 2008.
- VUOTTO, C. et al. Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, v. 3, n. 3, p. 743-758, 2014.
- WANG, X. et al. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from retail raw foods. **Food Control**, 32, 153-158, 2013.
- WIECZOREK, K.; JACEK OSEK, J. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh and smoked fish in Poland. **Food Microbiology**, v. 64, p. 164-171, 2017.
- ZANATTA FB, ROSING CK. Chlorhexidine's action mechanisms and recent evidence of its efficacy over supragingival biofilm context. **Sci-A**, v.1, p. 5-43, 2007.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi pioneiro no isolamento de *Listeria monocytogenes* em leite proveniente de tanques de expansão individuais em municípios do estado de Alagoas. A ocorrência de *Listeria monocytogenes* nas amostras avaliadas representa um risco à saúde pública.

A formação de biofilme e a resistência apresentada por estas cepas a produtos sanitizantes predispõem para a persistência de *Listeria monocytogenes* na cadeia de produção de leite.

Desta forma, faz-se necessário o monitoramento deste micro-organismo e da mastite no rebanho. Além disso, a realização de pré e pós-*dipping* de forma correta, a sanitização dos equipamentos e do tanque, a avaliação regular da eficiência dos sanitizantes utilizados e a coleta do leite pelo caminhão refrigerado no tempo adequado possuem relevância na garantia da qualidade do leite, sendo imprescindíveis para o fornecimento de alimentos seguros à população.

A ocorrência de cepas resistentes a antimicrobianos pode comprometer o tratamento da listeriose humana. Evidencia-se a necessidade de realização de testes com antimicrobianos e de aderência periodicamente para monitoramento do perfil de resistência e da formação do biofilme por parte deste micro-organismo, com o intuito de promover o controle da *Listeria monocytogenes* no rebanho e de prevenir a contaminação do leite por micro-organismos patogênicos.