

## Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas

[Microbiological quality of refrigerated milk on farms]

E.F. Arcuri<sup>1</sup>, M.A.V.P. Brito<sup>1</sup>, J.R.F. Brito<sup>1</sup>, S.M. Pinto<sup>1,2</sup>, F.F. Ângelo<sup>1</sup>, G.N. Souza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Gado de Leite  
Rua Eugênio do Nascimento, 610  
36038-330 – Juiz de Fora, MG  
<sup>2</sup>Bolsista CNPq

### RESUMO

Avaliaram-se a qualidade microbiológica do leite obtido mecanicamente e refrigerado durante 48 horas, em 24 rebanhos, e a associação entre a contaminação microbiana e os procedimentos de higienização dos equipamentos de ordenha e armazenamento do leite. Os procedimentos de higiene foram avaliados *in loco* com auxílio de questionários. Foram realizadas a contagem padrão em placas, a contagem de coliformes totais e a pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. No leite de 14 rebanhos, foram pesquisadas *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. As médias geométricas da contagem padrão foram  $<1,0 \times 10^6$  UFC/ml em 20 rebanhos, e  $<7,5 \times 10^5$  UFC/ml em 19. Onze rebanhos apresentaram contagem média de  $<1,0 \times 10^5$  UFC/ml. Contagens médias de coliformes  $>10^3$  UFC/ml foram verificadas em sete rebanhos. *S. aureus* e *S. agalactiae* foram isolados em 22 e 12 dos 24 rebanhos, respectivamente, e não foram encontradas *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*. O uso de detergentes alcalino e ácido, mais o de sanitizante foi associado ( $P < 0,05$ ) à contagem padrão  $<1,0 \times 10^5$ , e o emprego de apenas um ou de nenhum produto foi associado a contagens  $>5 \times 10^5$  UFC/ml.

Palavras-chave: qualidade do leite, microbiologia, tanque de refrigeração, contagem padrão de bactérias

### ABSTRACT

The effect of bulk tank and milking machine cleaning procedures (determined from a questionnaire) on bacterial contamination of 48-hour refrigerated milk was examined in 24 herds. Milk samples were analyzed for standard plate count (SPC) and for total coliform, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* contamination. Milk samples from 14 herds were cultured for *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. Geometrical means of SPC were  $<1.0 \times 10^6$  UFC/ml in 20 herds,  $<7.5 \times 10^5$  UFC/ml in 19 herds and  $<1.0 \times 10^5$  UFC/ml in 11 herds. Geometrical means  $>10^3$  UFC/ml of total coliforms were observed in seven herds. *S. aureus* and *S. agalactiae* were found in 22 and 12 herds, respectively. *Salmonella* and *L. monocytogenes* were not found in any of the samples. The use of alkaline and acid detergents plus sanitizing was associated ( $P < 0.05$ ) with SPC  $<1.0 \times 10^5$ , and the use of either alkaline or acid detergent or sanitizing or no chemical product was associated with SPC  $>5.0 \times 10^5$  UFC/ml.

Keywords: milk quality, microbiology, equipment cleaning procedure, standard plate count

---

Recebido em 8 de setembro de 2004

Aceito em 23 de setembro de 2005

E-mail: edna@cnpqgl.embrapa.br

Apoio: Projeto Embrapa – PRODETAB 047-01/99

## INTRODUÇÃO

A disponibilidade de nutrientes no leite, sua alta atividade de água e seu pH próximo da neutralidade torna-o meio extremamente favorável ao crescimento microbiano.

No leite cru encontra-se uma diversidade de bactérias, incluindo as psicrotróficas, que podem se multiplicar a 7°C ou menos, independentemente de sua temperatura ótima de crescimento, as termodúricas, que podem sobreviver ao tratamento térmico da pasteurização, as lácticas, que acidificam rapidamente o leite cru não-refrigerado, os coliformes e as bactérias patogênicas, principalmente as que causam mastite (Hayes e Boor, 2001). A ação das bactérias ou de suas enzimas sobre os componentes lácteos causa várias alterações no leite e seus derivados. Esses defeitos incluem sabores e aromas indesejáveis, diminuição da vida de prateleira, interferência nos processos tecnológicos e redução do rendimento, especialmente de queijos (Hicks et al., 1982; Champagne et al., 1994).

Muitas bactérias contaminantes do leite cru produzem enzimas extracelulares (proteases e lipases) termorresistentes, cuja atividade residual afeta a qualidade dos produtos finais, mesmo na ausência de células bacterianas viáveis (Muir, 1996; Chen et al., 2003). A contaminação bacteriana do leite cru pode ocorrer a partir do próprio animal, do homem e do ambiente. Exceto em casos de mastite, o leite ejetado apresenta baixo número de microrganismos, que não constituem riscos à saúde.

Do ponto de vista tecnológico, os microrganismos de maior importância são os que contaminam o leite durante e após a ordenha. Essa contaminação é variável, tanto qualitativa quanto quantitativa, em função das condições de higiene existentes (Froeder et al., 1985).

A temperatura e o período de armazenamento do leite antes da pasteurização determinam, de maneira seletiva e pronunciada, a intensidade de desenvolvimento das diversas espécies microbianas contaminantes. As temperaturas baixas inibem ou reduzem a multiplicação da maioria das bactérias e diminuem a atividade de enzimas degradativas.

A obtenção do leite de vacas sadias, em condições higiênicas adequadas, e o seu resfriamento imediato a 4°C são as medidas fundamentais e primárias para garantir a qualidade e a segurança do leite e seus derivados.

No Brasil, em anos recentes, tem-se adotado a coleta de leite a granel. Nesse sistema, o leite cru, armazenado em tanques de expansão a 4°C por até 48 horas, é transportado para a indústria em caminhão com tanque isotérmico. Recentemente, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou a Instrução Normativa nº 51, que estabelece o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, do Leite Tipo B, do Leite Tipo C e do Leite Cru Refrigerado (Brasil, 2002). No regulamento constam novos requisitos de qualidade, incluindo a contagem padrão de bactérias do leite. O limite máximo a ser aceito para o leite cru refrigerado, de produtores individuais das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste foi estabelecido em 1.000.000 UFC/ml, com redução gradativa a partir de 2008, até chegar ao limite de 100.000 UFC/ml em 2011. Entretanto, até o momento, existem poucos dados sobre a situação dos produtores de leite em relação a esse aspecto. Este trabalho objetivou avaliar a qualidade microbiológica do leite cru refrigerado na fazenda, incluindo a presença de patógenos de interesse para a saúde do consumidor, e a associação entre a contaminação microbiana e os procedimentos de higienização dos equipamentos de ordenha e armazenamento do leite na propriedade.

## MATERIAL E MÉTODOS

Durante um ano, coletaram-se três amostras de leite do tanque de refrigeração, em intervalo de quatro meses, de 24 rebanhos situados nas regiões Sudeste de Minas Gerais e Norte do estado do Rio de Janeiro. Nos rebanhos predominava gado mestiço Holandês-Zebu (50%), seguido por animais da raça Holandesa (29%), Jersey (17%) e Pardo-Suíça (4%). A média de produção de leite foi de 821±511kg/dia, e o número médio de vacas em lactação de 58±34. Em duas propriedades, as vacas em lactação eram mantidas em confinamento total (sistema *free-stall*) e nas demais adotava-se o sistema extensivo, em pasto.

Todas as propriedades usavam a ordenha mecânica.

Cada amostra consistiu de cerca de 500ml de leite, retirados da parte superior e central do tanque, após a agitação programada por cinco minutos, utilizando-se um coletor de aço inoxidável e frascos esterilizados. Os frascos foram transportados em caixa isotérmica com gelo até o laboratório de microbiologia. Todas as amostras foram analisadas quanto à contagem padrão em placas, coliformes totais, presença de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. Adicionalmente, em 14 das 24 propriedades, pesquisou-se a presença de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*.

Para a contagem de mesófilos (contagem padrão), diluições apropriadas foram inoculadas em ágar padrão<sup>1</sup> a 45 °C, e as placas foram incubadas a 32±1°C por 48±3 horas (Marshall, 1992). Para a contagem de coliformes, utilizou-se Petrifilm™ com incubação a 32±1°C por 24±2 horas (Marshall, 1992).

Na pesquisa de patógenos contagiosos da mastite, as amostras de leite foram inoculadas em ágar sal manitol<sup>2</sup> e ágar TKT<sup>2</sup>, seletivos para *S. aureus* e *S. agalactiae*, respectivamente. Após incubação de 48 horas, as colônias características típicas foram identificadas de acordo com Brito et al. (1998).

A pesquisa de *L. monocytogenes* foi realizada segundo Lait... (1990). Fez-se o enriquecimento seletivo transferindo-se 25ml de leite para 225ml do caldo de enriquecimento, para *Listeria*<sup>3</sup>, incubando-se a 30°C/48h. Para o isolamento, utilizou-se o ágar Oxford<sup>1</sup>, com incubação das placas a 37°C±1°C, por 48 horas. Até cinco colônias típicas ou suspeitas foram transferidas para ágar triptona extrato de levedura<sup>1</sup>, e submetidas à confirmação bioquímica.

A pesquisa de *Salmonella* foi realizada segundo Andrews et al. (1998). No pré-enriquecimento, transferiram-se 25ml de leite para 225ml do caldo lactosado<sup>1</sup>, incubando-se a 35°C por 24 horas. Para o enriquecimento seletivo utilizaram-se o caldo tetrionato<sup>1</sup> e o caldo selenito-cistina<sup>1</sup>

e, para o isolamento, o ágar Hektoen<sup>1</sup> e ágar xilose lisina desoxicolato<sup>1</sup>. Até seis colônias por placa com características do gênero *Salmonella* foram transferidas para os meios ágar triplice açúcar-ferro<sup>1</sup> e ágar lisina-ferro<sup>2</sup> para caracterização bioquímica preliminar.

Os procedimentos de higienização dos equipamentos de ordenha e armazenamento do leite foram avaliados *in loco* e documentados com auxílio de questionários considerando: 1) tipo de produtos químicos; 2) concentração e frequência de uso dos detergentes e sanitizante; 3) procedimento de limpeza (manual ou automática).

Os resultados da contagem total padrão, contagem de coliformes totais, procedimentos de higienização do equipamento de ordenha e tanque de expansão foram classificados em três categorias. As categorias da contagem padrão foram: 1) até 100.000UFC/ml; 2) de 101.000 a 500.000UFC/ml; 3) maior que 500.000UFC/ml. As categorias da contagem de coliformes totais foram: 1) até 100UFC/ml; 2) de 101 a 500UFC/ml; 3) maior que 500 UFC/ml. Com relação aos procedimentos de higienização do equipamento de ordenha e tanque de expansão, os rebanhos foram classificados de acordo com o uso de detergentes alcalino e ácido e sanitizante da seguinte forma: 1) aplicação dos três produtos, 2) aplicação de pelo menos dois produtos, 3) aplicação de um produto ou nenhum. Aplicaram-se o teste do qui-quadrado (Sampaio, 2002) e a análise de correspondência pelo método de distribuição canônica (Souza et al., 2002).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias geométricas das três contagens de microrganismos mesófilos e coliformes totais são apresentadas na Tab. 1. Os resultados estão em ordem crescente, de acordo com a contagem padrão de mesófilos. Considerando a Instrução Normativa 51 (IN 51) do MAPA (Brasil, 2002), 20 rebanhos (83%) atenderiam ao requisito de <math>1,0 \times 10^6</math> UFC/ml para contagem padrão, a vigorar entre 2005 e 2008, enquanto 19 (79%) atenderiam ao padrão de <math>7,5 \times 10^5</math> UFC/ml do período de 2008/2011. Mais ainda, 11 (46%) rebanhos atenderiam a exigência de <math>1,0 \times 10^5</math> UFC/ml a partir de 2011.

<sup>1</sup> Difco – Becton Dickinson & Company, EUA

<sup>2</sup> Merck – Darmstadt, Alemanha

*Qualidade microbiológica do leite...*

Tabela 1. Médias geométricas\* da contagem de bactérias mesófilas (contagem-padrão) e coliformes totais em amostras de leite refrigerado de 24 rebanhos

Rebanho	Mesófilos (UFC/ml)	Coliformes (UFC/ml)
1	4.200	50
2	6.700	210
3	10.300	10
4	17.500	160
5	18.600	5
6	27.500	180
7	28.000	740
8	55.400	110
9	85.000	990
10	88.200	100
11	90.000	890
12	109.000	91
13	140.000	160
14	145.000	350
15	156.000	41
16	198.000	3.035
17	235.000	240
18	291.000	4.700
19	455.000	4.100
20	961.000	2.200
21	1.220.000	6.000
22	1.360.000	1.400
23	1.970.000	23.000
24	4.140.000	290

\*Três amostras/rebanho.

Nero et al. (2004) verificaram aderência ao requisito de  $<10^6$  UFC/ml da IN 51 para o leite cru produzido em Viçosa-MG, Londrina-PR, Pelotas-RS e Botucatu-SP, de 80,8%, 52,4%, 42,0% e 32,0%, respectivamente.

A maioria dos produtores necessita, portanto, canalizar esforços na melhoria das condições higiênicas durante a ordenha e o armazenamento do leite, e na sua refrigeração rápida na

temperatura de 4°C, para reduzir os níveis de contaminação microbiana e atender ao padrão definitivo para 2011.

O número de coliformes acima de  $1,0 \times 10^3$  UFC/ml é indicativo de deficiências de higiene na produção de leite (Murphy, 1997). Contagem média de coliformes acima de  $1,0 \times 10^3$  UFC/ml foi verificada em sete rebanhos. Os coliformes são considerados indicadores de contaminação do ambiente e resíduos de fezes (Brito et al., 2002). Houve correlação positiva ( $r=0,61$ ;  $P<0,01$ ) entre as contagens de mesófilos e de coliformes totais, indicando a importante contribuição da higiene do momento da ordenha para a contagem bacteriana total do leite.

Observou-se associação ( $P<0,05$ ) entre as categorias da contagem padrão e a aplicação dos produtos de limpeza, tanto no equipamento de ordenha como no tanque de estocagem do leite nas propriedades. Os resultados da contagem padrão de até 100.000UFC/ml estavam associados com procedimentos adequados de higienização do equipamento de ordenha e do tanque de estocagem de leite, com todos os produtos de limpeza recomendados: detergentes alcalino e ácido e sanitizante. As contagens entre 101.000 e 500.000UFC/ml estavam associadas ao uso de pelo menos dois produtos de higienização (detergente alcalino e ácido, detergente alcalino e sanitizante, detergente ácido e sanitizante) e as contagens acima de 500.000UFC/ml estavam associadas ao emprego de apenas um ou nenhum desses produtos na higienização (Tab. 2). Não houve associação ( $P>0,05$ ) entre as categorias de contagem de coliformes totais e a aplicação dos produtos de limpeza no equipamento de ordenha e no tanque de estocagem do leite.

Tabela 2. Distribuição de frequência da aplicação de produtos para higienização do equipamento de ordenha e tanque de estocagem do leite em 23 propriedades

Aplicação de detergente alcalino, detergente ácido e sanitizante	Equipamento de ordenha		Tanque de estocagem	
	n	%	n	%
Todos	4	17,4	7	30,4
Pelo menos dois produtos	7	30,4	10	43,5
Pelo menos um ou nenhum	12	52,2	6	26,1
Total	23	100,0	23	100,0

A presença de bactérias patogênicas no leite cru é uma preocupação de saúde pública, sendo um risco potencial para quem o consome diretamente ou na forma de seus derivados, e até para quem o manuseia. O leite cru contaminado pode ser, ainda, fonte de contaminação cruzada para os produtos lácteos processados, pela contaminação do ambiente na indústria. As freqüências de *S. aureus*, *S. agalactiae*, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* no leite cru refrigerado são apresentadas na Tab. 3. Verifica-se que 23 dos 24 (95,8%) rebanhos apresentaram, pelo menos, um dos patógenos, com predominância de *S. aureus*. Sua presença no leite é indicativo de infecção da glândula mamária e indica deficiências no controle da mastite. Sugere, ainda, risco de produção de enterotoxinas resistentes à pasteurização caso o leite não seja mantido à temperatura de refrigeração inferior a 7,2°C (FDA, 1992). A concentração de enterotoxina capaz de causar sintomas de

intoxicação ocorre quando o número de *S. aureus* excede 10<sup>5</sup> UFC/ml (FDA, 1992). Outro patógeno contagioso da mastite, o *S. agalactiae*, que tem o úbere infectado como único reservatório, ocorreu em 50% dos rebanhos, quando o *S. aureus* também estava presente. *S. agalactiae* pode causar diversas infecções humanas, como meningite, pneumonia, endometriose, pielonefrite e artrite séptica (Flowers et al., 1992). A alta freqüência deles foi relatada em outros rebanhos da Zona da Mata e Campo das Vertentes, no estado de Minas Gerais, confirmando a prevalência diferenciada para os dois patógenos. Brito et al. (1999), em um estudo realizado com 48 rebanhos, isolaram *S. aureus* de 47 e *S. agalactiae* de 29. Brito et al. (2002) analisaram o leite dos fornecedores de um laticínio da Zona da Mata de Minas Gerais ao longo de um ano e encontraram *S. aureus* em 83,3% e *S. agalactiae* em 16,7% dos rebanhos.

Tabela 3. Freqüência de isolamento de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em leite cru refrigerado, em rebanhos leiteiros de Minas Gerais

	Rebanhos com amostras de leite positivas / total de rebanhos			
	Três amostras positivo	Duas amostras positivo	Uma amostra positivo	Total de positivo
<i>S. aureus</i>	16/24 (66,6%)	2/24 (8,3%)	4/24 (16,6%)	22/24 (91,7%)
<i>S. agalactiae</i>	6/24 (25%)	1/24 (4,2%)	5/24 (20,8%)	12/24 (50%)

Patógenos da mastite causam alterações no processo de síntese do leite dentro da glândula mamária, podendo afetar sua qualidade (Auldust e Hubble, 1998). O processo inflamatório resulta no aumento do número de células somáticas, que é associado a problemas de sabor e aroma no leite e seus derivados, menor rendimento na fabricação de queijos e perda de gordura e caseína no soro (Auldust e Hubble, 1998; Ma et al., 2000). Como sua disseminação no rebanho se dá principalmente durante a ordenha, pelas mãos dos ordenhadores e equipamentos de ordenha, a adoção de procedimentos higiênicos nessa fase é essencial para o controle efetivo da mastite e para reduzir o número de microrganismos no leite.

*Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* não foram isolados nas amostras de leite analisadas. Outros autores relataram a ausência de *L. monocytogenes* em leite cru produzido em várias

regiões do Brasil (Destro et al., 1991; Oliveira et al., 1994; Nero et al., 2003). Dados da literatura indicam freqüências de isolamento de *L. monocytogenes* em leite cru no Brasil variando de 0 a 16,7% (Destro et al. 1991; Moura et al. 1993; Nero et al. 2003; Silva et al., 2003).

Surtos e casos esporádicos de infecção por *Salmonella* spp. ou por *L. monocytogenes* têm sido associados ao leite e derivados, sendo as causas o consumo de leite cru ou seus derivados, pasteurização inadequada ou contaminação pós-processamento (Boor, 1997).

## CONCLUSÕES

O leite obtido por ordenha mecânica e refrigerado a 4°C, em algumas propriedades rurais, apresentou qualidade microbiológica satisfatória quando comparada aos padrões

exigidos internacionalmente. A adoção de procedimentos de limpeza completa de equipamentos de ordenha e estocagem do leite contribuiu para a redução da contagem de mesófilos no leite. A alta prevalência de patógenos contagiosos da mastite aponta a necessidade de implementação de programas de controle dessa doença e a ausência de *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* indica que, nos rebanhos avaliados, esses patógenos não constituíram perigo evidente no leite cru.

### AGRADECIMENTOS

A Marcos Aurélio Souto Silva, pela atuação nos exames microbiológicos.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, W.H.; JUNE, G.A.; SHERROD, P. et al. *Salmonella*. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, (Ed). *Bacteriological Analytical Manual*. 8.ed. Gaithersburg: AOAC International, 1998. p.5.01-5.20.
- AUDIST, M.J.; HUBLLE, I.B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. *Austr. J. Dairy Technol.*, v.53, p.28-36, 1998.
- BOOR, K.J. Pathogenic microorganisms of concern to the dairy industry. *Dairy Food Environ. Sanit.*, v.17, p.714-717, 1997.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa no. 051, de 18 de setembro de 2002. *Diário Oficial da União*, Brasília, 20 set. 2002. Seção 1, p.13-22.
- BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PORTUGAL, J.A.B. Identificação de contaminantes bacterianos no leite cru de tanques de refrigeração. *Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes*, v.57, p.47-52, 2002.
- BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; RIBEIRO, M.T. et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.51, p.129-135, 1999.
- BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SOUZA, H.M. et al. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras.*, v.18, p.39-44, 1998.
- CHAMPAGNE, C.P.; LAING, R.R.; ROY, D. et al. Psychrotrops in dairy products: their effects and their control. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.34, p.1-30, 1994.
- CHEN, L.; DANIEL, R.M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase in milk powders. *Int. Dairy J.*, v.13, p.255-275, 2003.
- DESTRO, M.T.; SERRANO, A.M.; KABUKI, D.Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. *Food Control*, v.2, p.110-112, 1991.
- FLOWERS, R.S.; ANDREWS, W.; DONNELLY, C.W. et al. Pathogens in milk and milk products. In: MARSHALL, R.T. (Ed.). *Standard methods for the examination of dairy products*. 16.ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1992. p.103-212.
- FOOD and drug administration. Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Rockville, Maryland, 1992. p. 12-16.
- FROEDER, E.; PINHEIRO, A.J.R.; BRANDÃO, S.C.C. Variação da qualidade microbiológica do leite cru tipo C da Região de Viçosa. *Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes*, v.40, p.55-68, 1985.
- HAYES, M.C.; BOOR, K. Raw milk and fluid milk products. In: MARTH, E. H.; STEELE, J.L. (Eds.). *Applied dairy microbiology*, 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2001. p.59-76.
- HICKS, C.L.; ALLAUDDIN, M.; LANGLOIS, B.E.; O'LEARY, J. Psychrotrophic bacteria reduce cheese yield. *J. Food Protec.*, v.45, p.331-334, 1982.
- LAIT et produits laitiers. Recherche de *Listeria monocytogenes*. Brussel: Norme FIL 143: 1990, 1990. 8p.
- MA, Y.; RYAN, C.; BARBANO, D.M. et al. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *J. Dairy Sci.*, v.83, p.264-267, 2000.
- MARSHALL, R.T. Standard methods for the examination of dairy products. 16.ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1992. 546p.

- MOURA, S.M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D.G.M. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. *Int. J. Food Microbiol.*, v.19, p.229-237, 1993.
- MUIR, D.D. The shelf-life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. *J. Soc. Dairy Technol.*, v.49, p. 24-50, 1996.
- MURPHY, S. Raw milk bacteria tests: standard plate count, preliminary incubation counts, lab pasteurized count, and coliform count. What do they mean for your farm? In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL REGIONAL MEETING, Syracuse. *Proceedings...* Syracuse, 1997. p.34-42
- NERO, L.A.; FRANCO, B.D.G.M.; MATTOS, M.R. et al. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela instrução normativa nº51. In: DURR, J.W.; CARVALHO, M.P.; SANTOS, M.V. (Eds.). *O compromisso com a qualidade do leite no Brasil*. Passo Fundo, RS: UFP Editora, 2004. p.189-194.
- NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V. et al. Risk characterization in raw milk: Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and chemical residues. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22., 2003, Florianópolis. *Anais...* Florianópolis, 2003. (CD rom).
- OLIVEIRA, A.N.; MESQUITA, A.J.; NUNES, I.A. et al. Ocorrência de bactérias do gênero *Listeria* em leite cru e pasteurizado em Goiânia, Goiás. CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 22., Juiz de Fora, MG. *Anais...* Juiz de Fora, 1994. p.35-39.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada a experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 221p.
- SILVA, I.M.M.; ALMEIDA, R.C.C.; ALVES, M.A.O. et al. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. *Int. J. Food Microbiol.*, v.81, p.241-248, 2003.
- SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; BASTOS, R.R. et al. Avaliação de associações e similaridades em epidemiologia veterinária por meio da análise de correspondência. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.54, p.539-542, 2002.