

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* E
BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS EM MASTITE CLÍNICA E
SUBCLÍNICA**

DÉBORA DUTRA MENEZES LEAL

1999

8
DECLARAÇÃO DE EMPLACAMENTO
ATA DA COMISSÃO

47215
33174MFN

DÉBORA DUTRA MENEZES LEAL

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* E
BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS EM MASTITE CLÍNICA E
SUBCLÍNICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Microbiologia de Alimentos, para obtenção do título de "Mestre".

Orientadora
Dr^a Eliana Pinheiro de Carvalho
Coorientadora
Dr^a Elizabeth Oliveira da Costa

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Leal, Débora Dutra Menezes

Caracterização e identificação de *Listeria monocytogenes* e bactérias Gram negativas em mastite clínica e subclínica / Débora Dutra Menezes Leal. – Lavras : UFLA, 1999.

47 p. : il.

Orientadora: Eliana Pinheiro de Carvalho.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Mastite. 2. CMT. 3. *Listeria monocytogenes*. 4. *Escherichia coli*. 5. Bovino. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-576.163

-636.2089819

DÉBORA DUTRA MENEZES LEAL

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* E
BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS EM MASTITE CLÍNICA E
SUBCLÍNICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Microbiologia dos Alimentos, para obtenção de título de "Mestre".

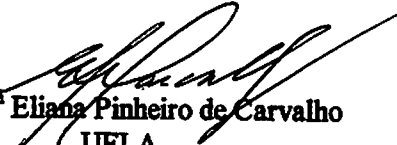
APROVADA em 28 de maio de 1999

Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu

UFLA

Prof.^a Dr.^a Vânia Déa de Carvalho

UFLA


Prof.^a Dr.^a Eliana Pinheiro de Carvalho
UFLA
(Orientadora)

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

**DEDICO aos meus pais
e à minha filha**

AGRADECIMENTOS

A Deus, que tornou tudo isto possível.

À Professora Eliana Pinheiro de Carvalho, pelos ensinamentos, dedicação e incentivo.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

À Dr^a Elizabeth Oliveira Costa, pelo apoio e coorientação.

À Dirce e Raquel, técnicas do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos - Unicamp, pela colaboração e doação da cepa de *Listeria monocytogenes*.

À Dr^a Maria Lúcia Pereira, pesquisadora da Fundação Ezequiel Dias, e ao Dr. Ernesto Hofer, pesquisador da Fundação Oswaldo Cruz, pelas análises concedidas.

Aos pesquisadores do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira – USP, pelo auxílio durante a coleta de amostras.

Aos professores Marcos (Departamento de Zootecnia/UFLA) e Francisco (Departamento de Medicina Veterinária/UFLA), pela colaboração.

Aos professores do Departamento de Ciência dos Alimentos Verônica, Maria Cristina, Luiz Ronaldo, Joelma e Eduardo, pelo carinho e amizade.

Ao grande amigo Luis Roberto Batista, por sua tão eficiente colaboração e total dedicação, muito obrigada.

Aos amigos Maurício e Flávia e aos funcionários Eliane e Cipriano (Piano) do Laboratório de Microbiologia de Alimentos - DCA/UFLA, pelo auxílio durante as análises.

Aos amigos Alexandre, Cristiane, Ivana, Guto, João Paulo e Marcelo, pela sempre pronta colaboração.

Aos amigos Margarita, Kelly, Cris, Elisângela, Rafael e Luis, por serem

minha família em Lavras e dividirem a responsabilidade de pais. A Mariana será sempre de vocês também.

Aos amigos Cecília, Serginho, Ives, Elaine, Alvinho, Ellen, Lena, Elias e Inácio, o apoio de vocês foi muito importante para que eu chegasse aqui, estarão sempre no meu coração.

Às amigas Fátima e Sandra, pelas orações, apoio e muito carinho.

À minha família, por sempre acreditar que eu conseguiria e pelo carinho e apoio sempre. Amo muito vocês.

A minha filha Mariana, por ter transformado minha vida. Você me fez uma pessoa melhor.

E a todas as pessoas que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 A mastite.....	3
2.2 Microrganismos envolvidos.....	6
2.3 Surtos de toxinfecção alimentar mediados por leite.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Coleta da amostra.....	17
3.2 Análises realizadas.....	18
3.2.1 Testes para detecção de mastite subclínica.....	18
3.2.2 Análises microbiológicas.....	18
3.2.2.1 Para isolamento e identificação de <i>Listeria monocytogenes</i>	18
3.2.2.2 Para isolamento e identificação de coliformes totais e fecais.....	20
3.3 Confirmação de cepas de <i>Escherichia coli</i>	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 CMT.....	25
4.2 NMP de coliformes totais e fecais.....	26
4.3 Microrganismos envolvidos.....	27
4.4 Patogenicidade das cepas de <i>E. coli</i>	30
4.5 Isolamento de <i>L. monocytogenes</i>	31
5 CONCLUSÕES.....	33
6 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	34
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

RESUMO

LEAL, Débora Dutra Menezes. **Caracterização e identificação de *Listeria monocytogenes* e bactérias Gram negativas em mastite clínica e subclínica bovina.** Lavras: UFLA, 1999, 47p. (Dissertação – Mestrado em Ciência dos Alimentos)*

A mastite bovina é uma doença da glândula mamária de difícil erradicação devido aos vários microrganismos responsáveis por sua manifestação. As bactérias são encontradas em 90-95% dos casos, dentre elas as patogênicas ao homem, como *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. Estas poderão causar várias doenças, além de comprometer a qualidade do leite e alterar suas características. O objetivo deste trabalho foi estudar a freqüência de mastite clínica e subclínica nos quartos mamários e identificar os microrganismos responsáveis pela doença. Foi pesquisado grupo coliforme, com especial referência à *Escherichia coli* e também foi feito o isolamento de *L. monocytogenes* em meios específicos. Os microrganismos totais identificados foram: *Escherichia coli* (58,3%), *Cedecea lapagei* (12,5%), *Klebsiella pneumoniae* (8,3%), *Pasteurella haemolyticus* (8,3%), *Aeromonas hydrofila* (4,2%), *Acinetobacter* spp. (4,2%) e *Plesiomonas shigelloides* (4,2%) através de kits API 20E, API 20NE e Bac Tray. Não foi detectado *E. coli* enterotoxigênicas. *L. monocytogenes* ocorreu em apenas uma das amostras (0,98%), a qual foi identificado através do kit API Listeria.

Comitê Orientador: Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA (Orientadora) e
Dra. Elizabeth Oliveira da Costa – USP (Coorientadora)

ABSTRACT

LEAL, Débora Dutra Menezes. **Characterization and identification of *Listeria monocytogenes* and Gram negative bacteria in clinic and subclinic bovine mastitis.** Lavras: UFLA, 1999, 47p. (Dissertation – Master in Food Science)*

Bovine mastitis is a mammary gland disease of difficult eradication due to the several microorganisms responsible for its manifestation. The bacteria are found in 90-95% of the cases, among them the pathogenic ones to man such as *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. These will be able to cause several diseases besides decreasing milk quality and altering its characteristics. The objective of this work was to study the frequency of clinic and subclinic mastitis in the mammary quarters and identify the microorganisms responsible for the disease, the coliforme group with special reference to *Escherichia coli* was researched and also the isolation of *L. monocytogenes* in specific media was done. The total microorganisms identified were: *Escherichia coli*(58.3%), *Cedecea lapagei* (12.5%), *Klebsiella pneumoniae* (8.3%), *Pasteurella haemolyticus* (8.3%), *Aeromonas hydrofila* (4.2%), *Acinetobacter* spp. (4.2%) and *Plesiomonas shigelloides* (4.2%) through API 20E, API 20NE and Bac tray kits. Enterotoxigenic *E. coli* was not detected. *L. monocytogenes* occurred in only one of the samples (0.98%), which was identified through the API Listeria kit.

Guidance Committee: Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA (Major Professor)
Dra. Elizabeth Oliveira da Costa – USP (Co-adviser)

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é responsável por grande perda na produção de leite, acarretando prejuízos sócio-econômicos que afetam diretamente a atividade leiteira. É encontrada em todos os continentes, atingindo, inclusive, os países desenvolvidos. O prejuízo econômico nos EUA, devido a sua ocorrência, é de cerca de 2 bilhões de dólares ao ano.

A erradicação da mastite é dificultada devido à presença de grande número de microrganismos, tais como, bactérias, fungos, vírus, algas e protozoários. Em geral, as bactérias ocorrem com maior frequência, apresentando mais de uma espécie envolvida na manifestação da doença. Algumas bactérias e/ou toxinas por elas produzidas quando ingeridas podem causar toxinfecção alimentar com desenvolvimento de quadros graves, levando alguns pacientes à morte. Dentre os agentes etiológicos, a *Listeria monocytogenes* e a *Escherichia coli* ocorrem em menor porcentagem, porém, são organismos patogênicos que podem causar sérios problemas à saúde do consumidor, sendo, por este motivo, alvo de interesse principalmente da indústria de alimentos.

Os programas de controle desta enfermidade estão voltados principalmente à adoção de práticas de higiene no momento da ordenha, tanto dos animais como também dos ordenhadores, e equipamentos utilizados para obtenção do leite, além da supervisão de profissional capacitado para detecção dos animais doentes e administração correta de práticas terapêuticas, quando necessário.

A *L. monocytogenes* é responsável por sérias doenças em idosos, recém-nascidos, gestantes e pacientes imunocomprometidos, com mortalidade de 30% aproximadamente em surtos de toxinfecção. Meningite, meningoencefalite, “doença giratória” em carneiro, mastite, septicemia são algumas das conseqüências de sua atuação. Geralmente os casos de listeriose não são relatados devido à não investigação da causa da doença, e conseqüente erro de diagnóstico.

A mastite decorrente da ação de cepas de *E. coli* é de difícil tratamento, pois apresentam resistência aos antibióticos mais comuns, além de estar associada à mortalidade em animais acometidos.

Como citado anteriormente, inúmeros microrganismos estão associados à ocorrência de mastite, sendo dada uma especial atenção àqueles patógenos, principalmente pelo grande interesse da indústria de alimentos.

Face a isto, esta pesquisa tem como objetivos:

- Verificação da frequência de mastite subclínica nos quartos mamários, detectados pelo teste CMT;
- contagem e caracterização de coliformes totais e fecais presentes;
- identificação da patogenicidade de cepas de *E. coli* presentes;
- identificação de *Listeria monocytogenes*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A mastite

A mastite é uma enfermidade que vem sendo discutida desde o século passado e ainda hoje continua sendo motivo de preocupação pelos prejuízos que acarreta (Jordão, 1967). Segundo a International Dairy Federation (1987), a mastite é definida como “uma reação inflamatória da glândula mamária” que, junto com mudanças físico-químicas e microbiológicas, é caracterizada por um aumento do número de células somáticas no leite e por mudanças no tecido mamário. Esta inflamação da glândula mamária, decorrente da ação de microrganismos, pode ser causada por um conjunto de fatores, tais como anatômicos, fisiológicos, ambientais e de manejo, promovendo grandes perdas econômicas por ocasião da redução na produção de leite, gastos com tratamento, substituição e/ou descarte de animais, entre outros.

Embora o International Dairy Federation (IDF) tenha reconhecido a existência de mastite asséptica ou não específica (mudanças inflamatórias da glândula mamária não causada por microrganismos), a mastite usualmente é causada por bactérias patogênicas colonizadoras da glândula mamária. Estas bactérias entram na glândula mamária via canal e se multiplicam dentro do úbere ou no início do ducto.

Auldist e Hubble (1998) afirmam que tanto a mastite clínica como a subclínica podem afetar as propriedades de produção e composição do leite e produtos lácteos, além dos problemas concernentes à saúde pública causados pela ingestão do leite contaminado. Os mesmos autores revisaram trabalhos

científicos e verificaram modificação em vários constituintes do leite, tais como diminuição de lactose, caseína total, β -caseína, α_2 -caseína, α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e potássio, e aumento de ácidos graxos livres, γ -caseína, proteínas do soro, soroalbumina, IgG, lactoferrina, transferrina, plasmina, Na e Cl, dificultando, com isso, a fabricação de seus derivados (Auldust e Hubble, 1998; Machado et al., 1998).

A relação entre a contagem de células somáticas (CCS) no leite e a prevalência de infecções intramamárias em um rebanho tem sido estudada em vários trabalhos. Embora algumas pesquisas anteriores tenham demonstrado relações modestas entre esta contagem e infecções, nos últimos 15-20 anos os pesquisadores já demonstram uma perfeita correlação entre a infecção do rebanho e esta contagem de células somáticas no leite. Por exemplo, Holdaway et al. (1996) mostraram uma correlação de 0,84 ($p < 0,001$) entre \log_{10} de contagem de células somáticas do leite e a porcentagem de quartos infectados.

A maioria das indústrias lácteas do mundo incluem rotineiramente a CCS como medida da qualidade do leite (Hubble, 1997).

Dentre os exames utilizados, destaca-se o California Mastitis Test (CMT), que é capaz de detectar o processo inflamatório evidenciando o aumento de células somáticas, principalmente os neutrófilos polimorfonucleares. Além dos neutrófilos polimorfonucleares, também podem estar presentes linfócitos, plasmócitos e macrófagos.

A mastite clínica é geralmente diagnosticada e tratada pelos proprietários dos rebanhos leiteiros sem o conhecimento da bactéria causadora da doença, principalmente pelo alto custo da cultura e o tempo necessário (24-48h) para o resultado.

A higiene no momento da ordenha é um ponto importante para o seu controle, devendo-se também considerar a administração apropriada de antibióticos nos casos de constatação da mastite, pois dependendo do agente, a droga será ineficaz, além de um mau uso promover resistência ao microrganismo (Ruiz, 1983; Rebhun et al., 1995). A cura da mastite é influenciada pelas espécies de bactéria envolvidas, a duração da infecção, o tipo e duração do tratamento com antibiótico e a eficácia das estratégias de outros tratamentos usados (Sandholm et al., 1990). McDougall (1998) testou a resistência à penicilina de bactérias isoladas de gado mamífero e encontrou resistência de 20% de 44 *S. aureus* isolados, 0% de 10 *Streptococcus uberis* e 100% de 12 *E. coli* isoladas.

Estudos realizados em Nova York e Pensilvânia, em rebanhos acompanhados por um programa de monitoramento, registraram menor incidência de mastite em relação àqueles sem controle adequado (Wilson et al., 1997).

Nos casos de mastite clínica é possível a observação macroscópica do úbere e do leite no momento da ordenha, os tetos acometidos tornam-se inchados, entumecidos, quentes e duros à palpação, enquanto no leite pode-se observar a presença de grumos, coágulos e sangue, com a utilização da caneca de fundo preto ou telado, a partir dos primeiros jatos de leite. Já a mastite subclínica só poderá ser detectada por testes indiretos, como por exemplo o CMT, ou exames laboratoriais do tipo CCS e exame bacteriológico. O teste CMT é simples e eficaz para a detecção de mastite subclínica a campo (ao pé da vaca). Costa et al. (1993) verificaram a eficácia do teste CMT quando comparado ao exame microbiológico, com 70,97% de concordância entre os exames. Outros pesquisadores também comprovaram a sensibilidade e especificidade do teste em relação à CCS em casos de mastite subclínica. Uma alta CCS normalmente

indica a ocorrência de mastite subclínica, pois os leucócitos têm seu número aumentado em virtude do mecanismo de defesa do organismo animal em resposta a uma inflamação ou irritação da glândula mamária. A CCS pode ser feita em lâmina com observação ao microscópio ou com o emprego de aparelhos eletrônicos específicos. Por ser um método laboratorial, exige pessoal capacitado para sua determinação, tornando-se inviável sua utilização a campo, como é o caso do CMT (Veiga et al., 1994; Brito et al., 1995; Brito et al., 1997).

2.2 Microrganismos envolvidos

Nocard e Mollereau, em 1884, citam que isolaram o primeiro agente etiológico da mastite bovina, identificada mais tarde como pertencente ao gênero *Streptococcus*. No Brasil este foi também o primeiro gênero isolado de amostras de leite mamfíco, em 1931, por Reis e Swenson (Costa et al., 1994a).

No passado, os agentes da mastite de maior preocupação eram *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus* (Ferguson, 1938; Plastringe, 1958; Tolle, 1975). Num trabalho de 1938, Peterson et al. sugerem a existência de outros microrganismos responsáveis pela mastite bovina, a qual chamavam de “mastite inespecífica”, pois apesar de alguns animais apresentarem os sintomas clínicos, não era possível o isolamento de *St. agalactiae* e *S. aureus* a partir do leite do animal acometido, levando-os a acreditar na existência de outros patógenos. Com o advento de meios de cultura mais seletivos, tornou-se possível a detecção dos outros vários agentes.

Os rebanhos leiteiros são freqüentemente acometidos pela mastite infecciosa, sendo por esta razão objeto de grande interesse dos pesquisadores. As dificuldades encontradas para seu controle estão relacionadas ao envolvimento de

vários microrganismos, como bactérias, algas, fungos filamentosos e leveduras, vírus e protozoários. Watts (1988), pesquisando os agentes da mastite bovina, apontou o envolvimento de 137 microrganismos.

Estudos epidemiológicos classificam a mastite infecciosa em dois grupos: contagiosa, que coloniza a glândula mamária contaminando os outros animais, principalmente por meio dos equipamentos de ordenha e mãos de ordenhadores, sendo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Mycoplasma* sp. seus principais agentes, e ambiental, normalmente associada à ocorrência de microrganismos que coexistem no habitat do animal, representada por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., e outras bactérias Gram negativas, *Staphylococcus* coagulase negativo, *Streptococci* ambiental, leveduras ou fungos filamentosos, *Prototheca*, *Actinomyces pyogenes* e *Corynebacterium bovis* (Elvinger et al., 1992; Rebhun et al., 1995).

A primeira é a mais comum e é transmitida durante o processo de ordenha com o úbere sendo a fonte primária de infecção. As duas promovem a infecção da glândula mamária, que ocorre principalmente através do canal do teto (Bramley e Dodd, 1984).

Apesar de ser menos comum, a mastite causada por patógenos ambientais é muito importante porque o tratamento é difícil e a morte do animal pode resultar por septicemia e/ou toxemia (Bartlett et al., 1992).

Costa et al. (1986), estudando a etiologia bacteriana da mastite bovina, encontraram microrganismos ainda não relacionados com mastite no Brasil, como *Aeromonas* sp., *Kurthia* sp., *Neisseria* sp., *Alcaligenes* sp., *Listeria* sp., *Moraxella* sp., *Actinobacillus* sp. e *Chromobacterium* sp.

Langoni e Fonseca (1997) isolaram *Campylobacter* sp. de 1,64% das 305 amostras de leite de vacas com mastite clínica. A incidência de mastite clínica pode variar entre 5 a 110 casos/100vacas/ano (Erskine et al., 1991).

Costa et al. (1997), analisando 256 amostras de leite bovino procedentes de animais com mastite clínica, verificaram a ocorrência de *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Klebsiella* sp., *Nocardia* sp., *Prototheca* sp., leveduras, fungo miceliano, *Chromobacterium* sp., *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp. Num estudo posterior, Costa et al. (1998) constataram maior incidência de *Prototheca zopfii* (41,2%) dentre os microrganismos que desencadeiam a mastite ambiental isolados das amostras de leite de animais com mastite de diferentes propriedades dos estados de São Paulo e Minas Gerais.

A *Serratia* spp. também poderá apresentar-se como agente da mastite por ocasião do uso de soluções pré ou pós “dipping” contaminadas (Rebhun et al., 1995).

A mastite por *Pseudomonas* spp. em geral está associada à utilização de água contaminada no processo de ordenha. Costa et al. (1994b), analisando 135 amostras de leite e 84 amostras de secreção de vacas com mastite clínica e/ou subclínica, isolaram 45,19% de *Staphylococcus* sp., 8,89% de *Streptococcus* sp., 37,78% de *Corynebacterium* sp., 0,74% de *Pseudomonas* sp. e 34,52% de *Staphylococcus* sp., 23,80% de *Streptococcus* sp., 22,62% de *Corynebacterium* sp., 5,95% de *Prototheca* sp., 1,19% de *Pseudomonas* sp. e 1,19% de *Plesiomonas* sp., respectivamente. A propriedade onde foi desenvolvido o estudo apresentava problemas com a qualidade da água, justificando a presença de *Prototheca*, *Pseudomonas* e *Plesiomonas*.

Sob o ponto de vista de saúde pública, existe um alto risco de transmissão de agentes infecciosos ao homem através do leite contaminado. Existem mastites

de grande importância, como as causadas por estafilocócos, *Brucella* sp., *Mycobacterium* sp. e *Listeria* sp. (Langoni e Fonseca, 1997).

O primeiro caso de mastite bovina causado por *L. monocytogenes*, ocorrido na Dinamarca, foi reportado em 1973 por Jensen e Larsen.

Prasad et al., citado por Bougle e Stahl (1994), afirmam que a *L. monocytogenes* é encontrada no leite de vacas devido tanto à contaminação ambiental como proveniente de mastite bovina. Os mesmos autores afirmam ainda que a pasteurização poderá ser eficiente para eliminar o referido microrganismo se for bem conduzida, no entanto, estes poderão sobreviver ao tratamento se estiverem no interior dos leucócitos.

Gitter et al. (1980) isolaram *Listeria monocytogenes* de amostras de leite provenientes de uma vaca com mastite supurativa. Num estudo que abrangeu o período de 23 anos, foram isolados 448 cepas de *L. monocytogenes* procedentes de 1.132.958 vacas de vários rebanhos na Dinamarca (Jensen et al., 1996). Langoni e Fonseca (1997) isolaram *L. monocytogenes* de 16 amostras de leite (7,01%) de vacas com mastite clínica (4,38%) e subclínica (2,63%) de um total de 228 amostras.

Sharp (1989) descreveu o isolamento de *L. monocytogenes* em apenas um quarto de uma vaca de um determinado rebanho. Após vários tratamentos com antibiótico, administrado pelo proprietário, o microrganismo permaneceu viável.

Vishinsky et al.(1997) diagnosticaram sete casos de mastite bovina por *L. monocytogenes* no norte de Israel. Das cepas isoladas dos órgãos dos animais, foi constatada a presença de grupos ET 1 e ET 17, envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar no passado, levando-os a concluir que o animal poderá ser o foco deste organismo para o homem, veiculando-o através do leite e carne.

Num estudo na Índia visando verificar a incidência de *Listeria* sp. em leite e seus derivados, constatou-se a presença de *L. monocytogenes* em 3 amostras de leite cru e em 48 amostras de sorvete (Pednekar et al., 1997).

A mastite aguda severa e a menos severa são combinações de doenças inflamatórias sistêmicas e locais que resultam na invasão das glândulas mamárias por *E. coli* ou um organismo coliforme similar. O gado no início da lactação é mais susceptível à doença (Abdul-Raouf et al., 1996). Os mesmos autores, analisando leite não pasteurizado, detectaram *E. coli* O157:H7 em 3 de 50 (6%) amostras analisadas.

A mastite por coliforme representa motivo de preocupação para a pecuária leiteira devido à dificuldade no tratamento (resistência aos antibióticos mais usados) e mortalidade associada a sua ocorrência. Em geral, este tipo de mastite acomete o gado confinado em regime “free-stall”, onde o ambiente pode apresentar umidade excessiva, lama e pouca ventilação. Também nas vacas de rebanhos com baixa contagem de células somáticas há grande incidência de mastite clínica por coliformes nos primeiros 30 dias de lactação (Rebhun et al., 1995). Normalmente as novilhas primíparas são mais susceptíveis a sua ação, podendo este fato ser atribuído a uma diminuição na função de neutrófilos, demora na migração de neutrófilos dentro da glândula e rápida multiplicação bacteriana durante a primeira lactação (Hill et al, 1979; Frost e Brooker, 1986; Kehrlí et al., 1989; Shuster e Kehrlí, 1992; Cai et al., 1994; Costa et al., 1996; Barker et al, 1998). Muitas das infecções intramamárias causadas por patógenos ambientais como *Escherichia coli* e *Streptococcus uberis* têm início antes da primeira lactação, resultando em mastite clínica nos 30-60 dias após o parto (Rebhun et al., 1995). Shpigel et al. (1998a), analisando quartos de vacas com mastite clínica, verificaram maior ocorrência de coliformes (60,2%). Lam et al.

(1997) verificaram maior ocorrência de *E. coli* em animais que eram submetidos a uma desinfecção pós ordenha em comparação aos que tiveram esta desinfecção interrompida.

Em um estudo visando verificar a composição microbiológica de leite cru, Desmaures et al. (1997) constataram $8,1 \times 10^2$ de Lactococci/ml, $1,8 \times 10^2$ de Lactobacilli/ml, $7,2 \times 10^1$ de leveduras/ml, $7,4 \times 10$ Enterococci /ml, $5,7 \times 10$ de coliformes/ml, $4,5 \times 10^2$ *Staphylococcus aureus*/ml, $8,5 \times 10^2$ Microcaceae/ml, $2,0 \times 10^3$ *Pseudomonas* spp./ml e $1,2 \times 10^3$ esporos de bactérias fermentadoras de lactose.

Barkema et al.(1998), pesquisando animais com mastite clínica, observaram baixa contagem de células somáticas em tanques de leite (CCSTL) quando os agentes envolvidos eram *E. coli*, *Klebsiella* spp. ou *Pseudomonas*, enquanto a CCSTL era alta para *S. aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus agalactiae*. Observações semelhantes foram feitas por Smith et al.,1985 e Hillerton et al., 1995.

2.3 Surtos de toxinfecção alimentar mediados por leite

Vários casos de toxinfecção alimentar veiculados por leite têm sido relatados em diferentes países. Os quadros de pessoas acometidas por vômito, náusea e diarreia são frequentes e caracterizam geralmente os sintomas de contaminação por algumas bactérias como *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Corynebacterium* sp., entre outras, as quais também ocorrem em animais que apresentam quadros de mastite clínica e/ou subclínica, transmitindo-as, conseqüentemente, para o leite, quando não tratados adequadamente. Além desses sintomas, algumas bactérias ou suas toxinas podem atingir vários órgãos

do homem ou animal, causando problemas mais graves, podendo ser fatal em alguns casos, principalmente para os indivíduos com sistema imune enfraquecido.

Muitos protocolos microbiológicos que são rotineiramente usados para medir qualidade do leite cru não são próprios para detectar patógenos específicos. Segundo Steele et al. (1997), leite cru com baixa contagem de células somáticas pode ou não conter bactérias patogênicas capazes de causar doenças. Do mesmo modo, uma elevada contagem total poderá ou não estar relacionada com a presença de patógenos humanos. *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* verotoxigênica (VTEC) e *Campylobacter* sp. são constantemente citadas como agentes de doenças originadas por alimentos contaminados (Zottola e Smith 1991; Steele et al. 1997; Luisjuan-Morales et al. 1995).

Jones (1990) informa que há mais de 60 anos a *Listeria monocytogenes* tem sido associada a patógeno de humanos e animais; e foi sugerido mecanismo de transmissão deste patógeno através de alimentos há mais de 50 anos, como citado em um artigo de Ho et al. (1986).

Segundo Donini (1997), muitos casos de listeriose que levaram os pacientes à óbito foram registrados como septicemia, doenças infecciosas intestinais, afecções orgânicas no período perinatal, anomalias congênicas do sistema nervoso central, doenças do sistema nervoso, meningites e sintomas mal definidos, causas estas responsáveis por 86% de todos os óbitos, em todas as idades. Isto ocorre porque o sistema de registro de morbidade e de mortalidade utiliza o Código Internacional de Doenças (CID), com o diagnóstico padronizado e agrupado por causas, levando a erros devido à patogenia diversificada da listeriose. Grande parte dos óbitos poderiam ser evitados se houvesse um diagnóstico laboratorial e epidemiológico dos casos por parte dos profissionais da área. Segundo Pednekar et al. (1997), a taxa de mortalidade em listerioses

humanas é alta (8-33%) em crianças, pessoas imunodeprimidas e gestantes (pode levar ao aborto). Como resultado disto, inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas em vários países para estudar a *Listeria* spp. e em particular a *L. monocytogenes*, em diferentes tipos de alimentos.

Em um surto de listeriose em Massachusetts, 1983, quarenta e nove casos (sete recém-nascidos e quarenta e dois adultos), envolvendo quatorze mortes foram registrados. A *L. monocytogenes* sorotipo 4b foi isolada acreditando-se que o leite pasteurizado tenha sido o veículo da enfermidade (Cliver, 1990). No ano de 1985, em Los Angeles, foram confirmados cento e quarenta e dois casos com quarenta e seis mortes, 85% dos casos foram perinatal, novamente isolou-se *L. monocytogenes* sorotipo 4b veiculada por queijo tipo Mexicano (James et al., 1985). Entre 1983 e 1987, em Vaud, na Suíça, o consumo de queijo Vacherin Mont d'Or promoveu 122 casos de toxinfecção e 33 mortes por listeriose. A cepa de *L. monocytogenes* foi responsável pelo surto e foi isolada da superfície do queijo, de um pedaço de queijo obtido de um paciente com listeriose e de áreas do local de produção do queijo, como prateleiras de madeira e escovas de salmoura usados nos ambientes de maturação, os quais estavam muito contaminados (Zottola e Smith, 1991; Bell e Kyriakides, 1998). No ano de 1995, quarenta e cinco pessoas foram acometidas com sintomas de diarreia e algumas também com febre, não houve mortes e quatro pessoas foram hospitalizadas. O alimento envolvido foi leite aromatizado pasteurizado (Bell e Kyriakides, 1998).

A ocorrência de diferentes espécies de *Listeria* sp. no leite cru e produtos lácteos foi pesquisada na Irlanda do Norte por Harvey e Gilmor (1992), em amostras provenientes de diferentes laticínios. Do total de 176 análises de leite cru, 25,0% foram positivas para *Listeria* spp., com isolamento de *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. seeligeri* em 15,3%, 10,2% e 2,8%

respectivamente. Nas 95 amostras de leite pasteurizado e 33 de queijos frescos examinados, foram isolados *L. monocytogenes* em 1,05% e de *L. seeligeri* em 3,0% das amostras, respectivamente.

Steele et al. (1997), analisando amostras de leite cru em tanques de fazendas observaram a presença de *L. monocytogenes* em 2,73% das 1720 amostras estudadas. Os autores comentam, em seu artigo, sobre a importância destes patógenos para a família dos proprietários destas fazendas que sempre consomem este leite cru. *Listeria innocua* e *L. welshimeri* foram isoladas por Luisjuan-Morales et al. (1995) em 7 e 2 amostras, respectivamente, de 100 amostras de leite cru analisadas na cidade de Guadalajara no México. Estas amostras foram coletadas de lojas e de vendedores ambulantes. Nenhuma *L. monocytogenes* foi identificada nesta pesquisa.

O'Donnell (1995) analisou, na Inglaterra, 2009 amostras de leite cru e encontrou 310 (15,43%) contaminadas por *Listeria* spp., sendo que, destas 102, 33% foram identificadas como *L. monocytogenes*.

Jensen et al. (1996) fizeram uma comparação de 33 isolados de mastite bovina e 27 isolados clínicos humanos através de análise de sorotipagem e ribotipagem. A sorotipagem mostrou que todos os sorotipos bovinos e os 17 (63%) dos isolados humanos pertenciam ao sorogrupo 1, considerando que 10 (37%) dos isolados humanos pertenciam ao sorogrupo 4. A combinação dos métodos de tipagens mostrou que 26 (79%) dos isolados bovinos e 13 (48%) dos isolados humanos compartilharam tipos comuns.

Dentre os bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos (Enterobacteriaceae, Vibrionaceae e Pasteurellaceae), a família Enterobacteriaceae é isolada com maior frequência da mastite bovina, sendo a *Escherichia coli* a espécie característica da família (Watts, 1988). Doenças entéricas causadas por

espécies de *E. coli* enterotoxigênicas são de grande importância e frequentemente os alimentos são implicados como vetores.

As cepas patogênicas de *E. coli* quando ingeridas com o alimento poderão produzir cinco tipos de diarreias em humanos: Enteropatogênica (EPEC), Enterotoxigênica (ETEC), Enteroinvasiva (EIEC), Enterohemorrágica (EHEC), VTEC) e Enteroaderente agregativa (EA-AggEC) (Varnam e Evans, 1991).

O sorotipo O157:H7 (EHEC) tem sido assunto de muitas pesquisas por estar associado à ocorrência de surtos de toxinfecção alimentar, os quais, muitas vezes, apresentam o leite como veículo, apesar de Duncan e Hackney (1994) afirmarem não estar relacionada com a mastite. No princípio de 1994, três crianças e seis outras sofreram diarreias severas em um surto de colite hemorrágica. A infecção foi associada à ingestão de hambúrgues e produtos lácteos contaminados com *E. coli* O157:H7 (Abdul-Raouf et al., 1996)

O leite cru pode ser uma fonte de alimento contaminado com patógenos. Este tipo de leite é ainda muito consumido em todo o mundo, apesar de ser proibida pelas legislações de vários países a sua distribuição. O consumo de leite cru provoca sempre surtos esporádicos de doenças como doenças entéricas, listerioses, etc. O leite cru também tem sido citado como fonte de VTEC em surtos de toxinfecções alimentares. Segundo Quinto e Cepeda (1997), crianças de uma escola em Ontario, no Canadá, foram contaminadas por leite cru e VTEC O157:H7 foi detectada e em 3 (7%) dos casos foi desenvolvida síndrome urêmica hemolítica (HUS). Também Steele et al. (1997) isolaram 15 VTEC em 0,87% de amostras de leite cru distribuídas em Ontario. A *Escherichia coli* O157:H7 tem sido o sorotipo VTEC mais comumente associado com doença, porém, outros sorotipos como O26:H11, O113:H21 e o O163:H19 já foram citados como causadores de doenças em humanos (Karmali et al. 1985, Scotland et al. 1988).

Em 1965, na Argentina, 15 crianças foram acometidas por sintomas de gastroenterite provocados pelo sorotipo O111:B4, que foi encontrado em 70% das amostras de leite cru fornecidos por uma pessoa, que posteriormente foi apontada como portadora (Manzullo et al., 1965). Nos EUA, no ano de 1971, um surto de toxinfecção alimentar envolvendo um lote de queijo Camembert acometeu 387 pessoas, a *E. coli* O124:B17 foi isolada do queijo e das fezes das pessoas (Marier et al., 1973). No estado de Oregon, 1993, foi registrado um surto de toxinfecção alimentar mediado por *E. coli* O157:H7. Seis pessoas estiveram envolvidas, das quais duas foram hospitalizadas, constatou-se que todas haviam bebido leite cru de uma lanchonete num supermercado (Helberg e Pokarney, 1993). Em 1994, na região de Montana, um surto de gastroenterite foi atribuído à *E. coli* O:104:H21, o provável mediador foi uma determinada marca de leite (Moore e Clark, 1995).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta da amostra

As amostras foram coletadas no Campus Universitário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP – Pirassununga – São Paulo. O rebanho leiteiro no qual foram feitas as coletas de leite pertencia ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira (NAP GAMA). Esses animais são doações dos produtores assistidos pelo NAP GAMA e que sempre apresentavam mastite, mesmo após tratamentos.

Foram utilizados 45 animais em estágio de lactação e destes, coletadas 102 amostras de leite provenientes de quartos anterior direito (AD); anterior esquerdo (AE); posterior direito (PD) e posterior esquerdo (PE), levando-se em consideração testes da caneca telada (ou de fundo escuro) e CMT efetuados no momento da coleta das amostras para cada teto do animal.

Os tetos foram lavados com jatos d'água e feita posterior assepsia com álcool iodado antes da retirada da amostra, com o objetivo de evitar a contaminação ambiental e/ou de ordenhadores e utensílio. Somente amostras que apresentavam mastite aparente e subclínica com escore 1+, 2+ e 3+ em CMT foram coletadas em recipientes estéreis e mantidos sob refrigeração para exames microbiológicos.

As análises microbiológicas de isolamento e identificação de patógenos foram efetuadas no laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras – M.G.

3.2 Análises Realizadas

3.2.1 Testes para detecção de Mastite Subclínica

- Caneca Telada ou de Fundo Escuro – no momento da coleta das amostras, os primeiros jatos de leite foram observados na caneca telada para visualização de grumos ou qualquer anormalidade no leite.
- CMT (California Mastitis Test) – as amostras de cada teto foram testadas quanto à presença de mastite subclínica através de teste CMT. O princípio da prova baseia-se na reação de um detergente aniônico (alquil-aril-sulfonato de sódio) que atua liberando o material celular; a liberação deste material produz uma viscosidade que caracteriza a reação cuja intensidade pode ser medida por 5 escores: negativo; traço (suspeito); 1+ (positivo fraco); 2+ (positivo) e 3+ (positivo forte).

3.2.2 Análises microbiológicas

As análises para coliformes totais e fecais foram realizadas seguindo a metodologia de Speck (1984). Para o isolamento de *Listeria monocytogenes*, foram utilizados meios que apresentaram boa eficiência para produtos lácteos testados por vários pesquisadores (Lund et al., 1991; Curtis e Lee, 1995; Gohil et al., 1995; Poda et al., 1995; Furlanetto et al., 1996; Beumer et al., 1997).

3.2.2.1 Para isolamento e identificação de *Listeria monocytogenes*

O procedimento realizado para isolamento, caracterização e identificação de *Listeria monocytogenes* está esquematizado na Figura 1.

As amostras de leite foram enriquecidas em caldo LEB (*Listeria Enrichment Broth Base - Oxoid*) e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por

um período de 7 dias. A partir do quarto dia de incubação, procedia-se a estria em placas de Petri contendo meio PALCAM (Oxoid). Todas as colônias que apresentaram característica de *L. monocytogenes* foram repicadas em tubos contendo BHI agar (Brain Heart Infusion Agar) inclinado para posterior purificação e identificação.

As cepas que apresentaram as seguintes características: Gram positivas, catalase positiva, oxidase negativa, MR+/VP+, TSI A/A sem produção de H₂S, não reduziram nitrato a nitrito, β-hemolíticas em agar sangue de cavalo e com movimentos de tombamento à temperatura ambiente foram submetidas a um teste de identificação API – Listeria (Oxoid).

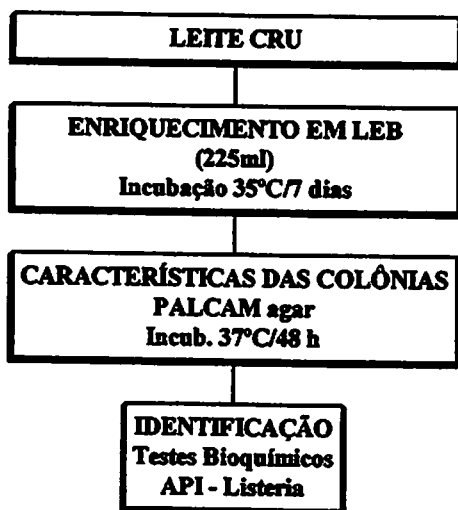


FIGURA 1 Esquema de isolamento de *Listeria* spp. de leite cru provenientes de vacas com mastite clínica e subclínica

3.2.2.2 Para isolamento e identificação de coliformes totais e fecais

Contagem, isolamento e caracterização de coliformes totais e fecais (Figura 2).

As amostras de leite foram diluídas para inoculação e cálculo do número mais provável de coliformes (NMP). As diluições previamente preparadas foram inoculadas em Caldo Lauril Sulfato Triptose contendo tubo de Durhan, incubadas a 35-37°C por 24-48 horas. Após a incubação os tubos positivos, eram repicados para Caldo EC e incubados a 44,5°C por 24-48 horas. Todos os tubos que apresentavam turvação e gás no tubo de Durhan foram considerados positivos e utilizados para o cálculo de NMP de coliformes.

A partir dos tubos positivos para coliformes, foram feitas estrias em agar Eosina Azul de metileno (EMBA), incubado à 35-37°C por 24 horas. Todas as colônias que se desenvolveram com características diferentes foram retiradas e repicadas para Plate Count Agar em tubo inclinado para posterior purificação e identificação.

Após a seleção de todas as colônias das amostras, as mesmas foram purificadas, inoculadas em um meio de triagem para Enterobacteriaceae (TSI agar) e incubadas a 37°C/24 horas. As colônias com características no TSI agar de coliformes e que se apresentavam como oxidase negativa foram identificadas através do sistema API 20E da Biolab-Merieux. As outras colônias foram identificadas pelo sistema API 20NE (não enterobacteriaceae), Bac Tray (DIFCO) e, quando necessário, feitas provas bioquímicas rotineiras complementares.

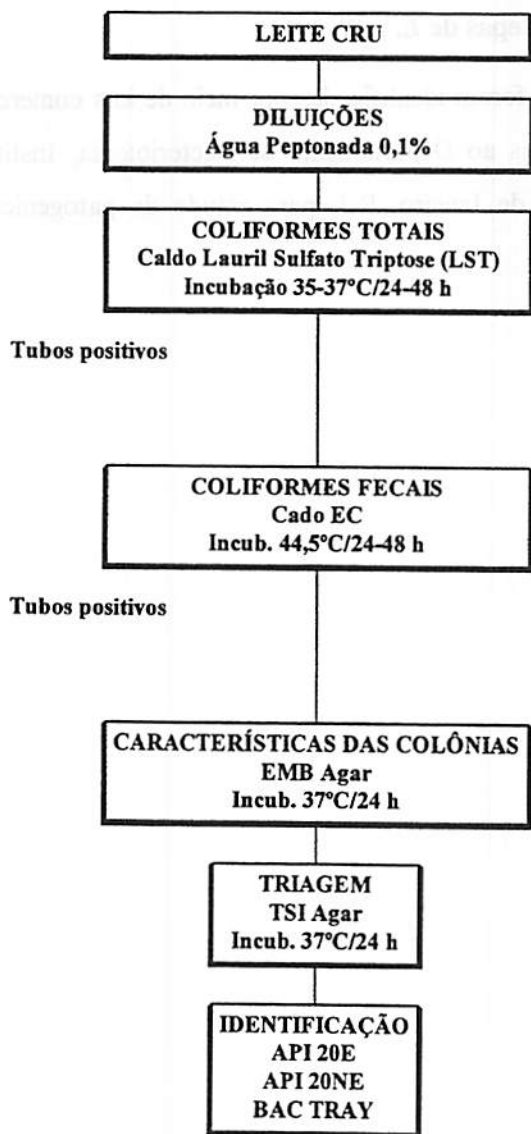


FIGURA 2 Esquema de isolamento e caracterização de coliformes totais e fecais de leite cru proveniente de vacas com mastite clínica e subclínica

[REDACTED]

3.3 Confirmação das Cepas de *E. coli*

Todas as cepas foram identificadas por meio de kits comerciais API 20E (BioMeriux) e enviadas ao Departamento de Bacteriologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, R.J, para estudo da patogenicidade (EIEC, ETEC, EPEC e EHEC).



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do teste de CMT e freqüência nos tetos das vacas com mastite clínica e subclínica estão apresentados na Tabela 1.

Os resultados do NMP de coliformes totais, fecais e teste de CMT nas amostras relacionadas a este grupo de microrganismos são mostrados na Tabela 2, provenientes de 45 vacas com mastite clínica e subclínica e de 102 tetos analisados.

TABELA 1 Número de tetos positivos para diferentes escores de CMT e presença de mastite clínica e subclínica em quartos de glândulas mamárias

Tetos		CMT			Mastite Clínica	Total	
		%	Animais			msc	mc
	negativo	1+	2+	3+			
AD	22	6	3	14	0	23	0
AE	18	8	4	15	0	27	0
PD	19	5	7	14	0	26	0
PE	19	5	2	16	3	23	3
Total	78	24	16	59	3	99	3

AD=Anterior Direito; AE=Anterior Esquerdo; PD=Posterior Direito; PE=Posterior Esquerdo; msc=mastite subclínica; mc=mastite clínica.

TABELA 2 NMP de coliformes em tetos de animais com mastite clínica e subclínica relacionados aos testes de mastite

Identificação dos Animais	Tetos				CMT			
	AD	AE	PD	PE	AD	AE	PD	PE
2	-	-	45	4	-	-	3+	3+
3	4	7(7) ⁽¹⁾	-	4	3+	1+	-	3+
6	15(15)	4	-	-	3+	3+	-	-
9	-	-	-	4	-	-	-	3+
17	9(9)	-	-	9(4)	3+	-	-	3+
19	45(45)	25(25)	-	-	2+	1+	-	-
25*	-	-	-	4(4)	-	-	-	-
26	-	4	-	-	-	3+	-	-
33	-	-	-	25	-	-	-	3+
39	-	-	-	4	-	-	-	3+
40	4	-	-	-	3+	-	-	-
41	9	-	-	-	1+	-	-	-
45	-	-	45(45)	-	-	-	2+	-

*Mastite clínica

⁽¹⁾Números entre parêntese representam número de coliformes fecais isolados a 44,5°C

AD=Anterior Direito; AE=Anterior Esquerdo; PD=Posterior Direito; PE=Posterior Esquerdo; CMT=California Mastitis Test.

4.1 CMT

De 180 amostras de leite de tetos de vacas com mastite subclínica e clínica, 99 (55%) foram consideradas positivas para mastite subclínica, 3 (1,67%) para mastite clínica e 78 (43,33%) negativos para CMT. Considerando o teste CMT para a mastite subclínica, 24 (13,34%) apresentaram escore 1+; 16 (8,88%), escore 2+ e 59 (32,78%), escore 3+ (Tabela 1). Destes 45 animais estudados, 20 (44,45%) apresentaram positividade em 1 teto, 8 (17,78%) em 2, 5 (11,11%) em 3 e 12 (26,66%) nos 4 tetos analisados (Tabela 3). O escore 3+ (32,78%), encontrado nesta pesquisa em maior porcentagem do número de tetos analisados, pode ser comparado ao resultado encontrado por Devi et al. (1997) quando trabalharam com mastite subclínica em 961 tetos de 243 vacas de diferentes raças e encontraram 138 tetos (14,36%) com escore 3+, o que representou, nesta pesquisa, o maior escore encontrado. Costa et al. (1994c) encontraram, como resultados de 2372 amostras de leite positivas para exame CMT, 26,52% com escore 1+, 26,31% com escore 2+ e 47,18% com escore 3+. No entanto, Brito et al. (1997) verificaram com maior frequência o escore 1+ (10,33%), dentre os escores 1+, 2+ e 3+, das 3012 amostras dos quartos com mastite subclínica analisados.

Os resultados encontrados nesta pesquisa também coincidem com os encontrados por estes autores em relação ao número de quartos afetados por animal, sendo a maior incidência em um único quarto (44,45%) e menor em 3 quartos (11,11%) por animal (Tabela 3). Shpigel et al. (1998a), analisando 1089 vacas em Israel, encontraram também coliformes em 92,6% de animais com um quarto afetado, 2 quartos em 6,4%, 3 quartos (0,2%) e 4 quartos em 0,8%. Costa et al. (1996), estudando tetos de novilhas primíparas, constataram a presença de infecção intramamária em 28,3% das novilhas com 4 tetos positivos, 20,8% com 3 tetos, 14,2% com 2 e 16,7% com 1 teto somente.

TABELA 3 Freqüência de infecção de quartos afetados por mastite clínica e subclínica em vacas

Número de Quartos Infectados	Animais	
	n^o	%
1	20	44,45
2	8	17,78
3	5	11,11
4	12	26,66
TOTAL	45	100,00

4.2 NMP de Coliformes Totais e Fecais

Conforme mostra a Tabela 2, todas as amostras com escores em CMT de 3+ apresentaram positividade para coliformes totais e, em alguns casos, para fecais. É interessante notar que somente 13 (28,88%) dos 45 animais positivos para mastite clínica ou subclínica mostraram presença do grupo coliforme, discordando de Shpigel et al. (1998a), que encontraram positividade para coliformes em 60,2%, dos casos, ou seja, na maioria dos casos por eles estudados. Costa et al. (1998) também encontraram o grupo das Enterobacteriaceas em 78,3% das amostras analisadas. O número mais provável de coliformes totais e fecais variou de 4,0 a 45,0 por ml de leite analisados nos tetos onde foi detectado este grupo de microrganismos. Os quartos posterior esquerdo, seguido pelo anterior direito, foram os mais afetados. O grupo coliforme também foi detectado por McDougall (1998) em 4,7% de 578 quartos de mastite clínica analisados.

4.3 Microrganismos Envolvidos

A Tabela 4 mostra a porcentagem do número de bactérias identificadas oriundas dos tetos que apresentaram presença do grupo coliforme. Foram diagnosticados dezenove tetos (Tabela 2) com presença de coliformes dos 13 animais que foram positivos para este grupo. Das dezenove amostras analisadas, foi feita contagem do número total de coliformes e os microrganismos que se desenvolveram nos meios líquidos específicos para análise do grupo, plaqueadas em meio de culturas. Conforme mostra a Tabela 4, foram isolados 7 espécies bacterianas com predominância de *Escherichia coli* em 58,3% dos isolados.

TABELA 4 Porcentagem do número de microrganismos isolados em leite de vacas com mastite clínica e subclínica

Microrganismos	Porcentagem (%)
<i>Escherichia coli</i>	58,3
<i>Cedecea lapagei</i>	12,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8,3
<i>Pasteurella haemolyticus</i>	8,3
<i>Aeromonas hydrofila</i>	4,2
<i>Acinetobacter spp.</i>	4,2
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	4,2

Shpigel et al. (1998a), estudando sete rebanhos de leite em Israel, encontraram maior frequência de coliformes (60,2%), dos quais 51,2% foram identificados como *Escherichia coli*. Barker et al. (1998) também verificaram maior ocorrência de *E. coli*, 38% das 102 amostras de leite de vacas com mastite clínica. Shpigel et al. (1998b) estudaram animais com mastite por coliforme e encontraram *E. coli* em 95,17% das amostras, 3,07% de *Klebsiella* spp., 1,32% de *Enterobacter* spp. e 0,44% de *Proteus*.

Sargeant et al. (1998), analisando a frequência de ocorrência de mastite clínica em rebanhos de Ontario durante 2 anos, detectaram, além de outros microrganismos, o grupo coliforme em 17,2% das amostras, valor este só superado por *Staphylococcus* sp., que foi de 28,7%.

Costa et al. (1994a, 1996) constataram baixa incidência dos gêneros pertencentes à família Enterobacteriaceae, como *Serratia* sp., *Klebsiella* sp., *Salmonella* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Proteus* sp. e a espécie *E. coli*. Nos dois estudos verificou-se maior incidência de *Staphylococcus* sp. Numa pesquisa posterior, Costa et al. (1998) detectaram 736 casos de mastite ambiental (clínica e subclínica) de 5216 animais e verificaram baixa incidência de *E. coli*. Neste estudo o organismo mais frequente foi *Prototheca zopfii*, em 304 dos casos. Moretti et al. (1998) isolaram, dentre os agentes ambientais, *E. coli* com maior frequência das amostras de leite de animais com mastite subclínica.

A *Klebsiella* é frequentemente isolada de infecções intramamárias, chegando a uma frequência de 11-42,8% de todos os isolados Gram negativos segundo vários autores (MacDonald et al., 1970; Smith et al., 1985; Shpigel et al., 1998a).

O agente *Plesiomonas* sp. é um organismo ambiental influenciado pela época do ano, estágio de lactação, parto, instalações, manejo e má qualidade da

água. Costa et al. (1994b) verificaram sua ocorrência em apenas 1,9% das amostras de secreção de animais com mastite.

Segundo Olls e Schoonderwoerd (1989), a água de lavagem dos tetos deveria ser também analisada para determinar se esta não seria uma possível fonte de infecção dos tetos com microrganismos como *Plesiomonas* spp., *Pseudomonas* sp. e *Serratia* sp. A água tem sido constantemente implicada na transmissão destes agentes.

Os gêneros *Aeromonas* e *Plesiomonas* têm sido constantemente associados à mastite bovina. Bergmann et al. (1981) isolaram *Aeromonas hydrophila* de um surto de mastite bovina com 1232 vacas contaminadas. De acordo com Franco e Landgraf (1996), ainda não existem relatos de surtos de toxinfecção alimentar causados por *Aeromonas hydrophila*, no entanto, existem suspeitas de que seja um agente infeccioso de origem alimentar.

Costa et al. (1998) e Shpigel et al. (1998a) também isolaram, em quartos examinados, *Klebsiella* sp., *Plesiomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Pasteurella* spp. e *E. coli*, como detectados nesta pesquisa. O gênero *Acinetobacter* normalmente está presente em solo, água e esgoto. A *Pasteurella haemolytica* tem sido isolada de infecções intramamárias bovina (Watts, 1988).

Conforme mostrado na Tabela 5, os microrganismos encontrados nesta pesquisa tiveram maior incidência nos quartos posteriores, estando de acordo com os resultados de Lam et al. (1997), Shpigel et al. (1998a) e Macdougall (1998), que verificaram maior ocorrência de mastite clínica nos quartos posteriores, 70,22%, 64,70% e 66,46%, respectivamente. Também em um estudo na Índia foi detectada maior incidência de mastite subclínica no quarto posterior direito (Devi et al., 1997). Em contrapartida, Costa et al. (1994d) não encontraram diferença significativa da incidência de mastite em quartos anteriores e posteriores. Cardoso et al. (1996), pesquisando animais com mastite subclínica, concluíram

que a incidência de mastite foi uniforme para os diferentes quartos de uma mesma fêmea.

TABELA 5 - Frequência da presença de microrganismos nos quartos anterior e posterior de vacas mastíticas

Microorganismo	Quarto Anterior	Quarto Posterior
<i>Escherichia coli</i>	X	X
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X	
<i>Pasteurella haemolyticus</i>		X
<i>Aeromonas hydrophila</i>		X
<i>Acinetobacter spp.</i>		X
<i>Plesiomonas shigelloides</i>		X
<i>Cedecea lapagei</i>	X	X
Total (%)	14,3	85,7

4.4 Patogenicidade das Cepas de *E. coli*

Nas cepas de *E. coli*, isoladas a partir do leite mastítico, enviadas para a Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, não foram detectadas presença das linhagens EPEC, EIEC, ETEC e EHEC. Sharma et al., 1995, isolou *E. coli* em 8,33% das amostras de leite cru analisadas, detectando os seguintes sorotipos: O:5, O:7, O:61 e O:106. Singh et al, 1996, estudando enteropatógenos em leite, carne e seus derivados, encontraram seis sorotipos de *E. coli*, O:3, O:81, O:82, O:84; O:147 e O:157; no entanto, somente a O:147 foi evidenciada no leite bovino. Outros autores como Quinto e Cepeda (1997) encontraram *E. coli* enterotoxigênica de origem bovina e demonstraram que as mesmas podem

permanecer no queijo elaborado com este leite, o que representa um perigo à saúde de seres humanos.

4.5 Isolamento de *L. monocytogenes*

Das 102 amostras de leite provenientes de 45 vacas mastíticas, somente em uma (0,98%) foi isolada *Listeria monocytogenes*.

A *Listeria* sp. tem despertado grande interesse no mundo científico e inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas para se verificar a presença deste patógeno em alimentos e principalmente de uma das fontes de contaminação, que pode ser o leite, proveniente de vacas mastíticas.

O baixo índice, de 0,98% de positividade, nas amostras analisadas nesta pesquisa coincide com aqueles encontrados por Langoni e Fonseca (1997) que isolaram *L. monocytogenes* em 7,01% de 228 amostras de leite provenientes de mastite clínica e subclínica, sendo que destas somente 2,63% eram de leite de mastite subclínica. Também Jensen et al. (1996) obtiveram um baixo índice deste microrganismo, que variou de 0,01 a 0,1% (média de 0,04%) em análises realizadas em vacas com mastite na Dinamarca.

Apesar da baixa incidência deste patógeno em rebanhos leiteiros, a simples presença deste microrganismo leva os pesquisadores e pessoas ligadas à saúde pública a se preocuparem ainda mais com esta espécie de microrganismo.

O leite cru, ainda muito consumido no mundo e principalmente no Brasil, pode ser um veículo de transmissão da listeriose para o homem. A sua presença no meio ambiente, participação como patógeno na mastite bovina subclínica e clínica, o consumo do leite cru, a sua possível resistência aos processos de pasteurização e o aspecto zoonótico deste microrganismo, segundo Langoni e

Fonseca (1997), reforçam a importância das mastites bovina, bem como da obtenção higiênica do leite.

A reação de CMT na pesquisa de Jensen et al. (1996) foi alta em todos os casos de mastite onde foram detectadas listérias e, segundo os autores, quartos infectados podem excretar até 10.000 CFU/ml no leite. Eles demonstraram também que leite de tanques, em adição à contaminação ambiental, pode ser contaminado diretamente pelos quartos de úberes infectados.

Como em todas as pesquisas geralmente se avalia a presença ou não deste patógeno e não o número presente nas mesmas, quando este alimento contiver *L. monocytogenes* o número poderá ser muito alto visto que um único quarto poderá conter 10.000 CFU/ml. Além disto, vários autores (Harvey e Glimor, 1992) afirmam que *Listeria* sp. pode se multiplicar em leite resfriado e também permanecer no leite pasteurizado. A sua sobrevivência ou o seu desenvolvimento no leite refrigerado e, conseqüentemente, nos seus subprodutos, são favorecidos pela sua natureza psicrófila e possível termotolerância (Langoni e Fonseca, 1997).

Um estudo na Índia visando avaliar a presença de *L. monocytogenes* no leite (cru e pasteurizado) constatou a ocorrência do organismo em 5,78% das 121 amostras analisadas (Bhilegaonkar et al., 1997), sendo este resultado semelhante ao encontrado por Rea et al. (1992), que analisando 589 amostras de leite cru, isolaram 4,9% de *L. monocytogenes*. Silva et al. (1998) encontraram *L. monocytogenes* em 41,17% de 17 amostras de queijo Minas Frescal de fabricação caseira, contrastando com os queijos Minas Frescal manufaturado e Ricotta (3,03%) e queijos curados (Gorgonzola, Brie e Roquefort) (5,67%). Esta alta frequência em Minas Frescal caseiro deve-se à fabricação a partir de leite cru obtido sob condições precárias de higiene, e também manipulação do leite até a obtenção do queijo além de não haver Inspeção Sanitária Federal.

5 CONCLUSÕES

- O escore 3+ (positivo forte) para o teste CMT e a incidência de mastite subclínica em um único quarto ocorreram com maior frequência;
- Em somente 28,88% das amostras positivas para mastites clínica e subclínica foi constatada a presença do grupo coliformes, sendo a espécie *Escherichia coli* mais frequente dentre as cepas isoladas (58,3%);
- O meio de plaqueamento EMB agar permitiu o isolamento de outras espécies além de *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*, como *Pasteurella haemolyticus* (8,3%), *Aeromonas hydrofila* (4,2%), *Plesiomonas shigelloides* (4,2%) e *Cedecea lapagei* (12,5%), organismos estes muito comuns no ambiente e água;
- Nas cepas de *E. coli* isoladas, não foram detectadas presença de ETEC, EPEC, EIEC e EHEC;
- Das 102 amostras analisadas, em apenas uma foi verificada a presença de *L. monocytogenes* (0,98%).

6 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A *Listeria monocytogenes* se constitui num patógeno de alta periculosidade à saúde pública. A taxa de mortalidade estimada para os casos de listeriose é de aproximadamente 30%, justificando o interesse por pesquisadores ligados à área da saúde.

Sua relação com alimentos é recente, pois somente na década de 80, com os relatos de vários casos de toxinfecção alimentar, foi associada à ingestão de alimentos. Ainda não se sabe qual sua dose infectiva, mas devido a sua alta patogenicidade, o ideal é que o alimento esteja isento desta bactéria.

A presença de *Escherichia coli* no leite está associada à contaminação de origem fecal, mostrando condições higiênicas insatisfatórias no processo de coleta e/ou pós coleta do leite. Uma contaminação alimentar por *Escherichia coli* poderá evoluir para casos graves como a ocorrência de Síndrome Urêmica Hemolítica, podendo culminar com a morte do indivíduo.

Face a isso, é importante que o produtor tenha um programa de monitoramento do rebanho, afim de identificar o patógeno quando presente e eliminá-lo, pois um animal contaminado poderá disseminar o microrganismo para os outros causando prejuízos de ordem econômica e social.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-RAOUF,U.M.; AMMAR,M.S.; BEUCHAT,L.R. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from some Egyptian foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.29, n.2-3, p.423-426, Mar. 1996.
- AULDIST,M.J.; HUBBLE,I.B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 53, n.1, p.28-36, Apr. 1998.
- BARKER,A.R.; SCHRICK,F.N.; LEWIS,M.J.; DOWLEN,H.H.; OLIVER,S.P. Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of jersey cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n.5, p.1285-1290, May 1998.
- BARHEMA,H.W.; SCHUKKEN,Y.H.; LAM,T.J.G.M.; BEIBOER,M.L.; WILMINK,H.; BENEDICTUS,G.; BRAND,A. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, n.2, p.411-419, Feb. 1998.
- BARTLETT,P.C.; MILLER,G.Y.; LANCE,S.E.; HEIDER,L.E. Managerial determinants of intramammary coliform and environmental streptococci infections in Ohio dairy herds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.75, n.5, p.1241-1252, May 1992.
- BELL,C; KYRIAKIDES,A. *Listeria*. A practical approach to the organism and its control in foods. London: Blackie Academic & Professional:, 1998. 150p.
- BERGMANN,V.A.; SEFFNER,W.;BUSCH,S. Involvement of *Aeromonas hydrophila* in mastitis. **Veterinary Medicine**, London, v.36, n.4, p.548-553, Apr. 1981.

BEUMER,R.R.; GIFFEL,M.C.; COX,L.J. Optimization of haemolysis in enhanced haemolysis agar (EHA) - a selective medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.24, n.7, p.421-425, July 1997.

BHILEGAONKAR,K.N.; KULSHRESTHA,S.B.; KAPOOR,K.N.; ASHOK KUMAR,R.K.; SINGH,B.R. Isolation of *Listeria monocytogenes* from milk. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v.34, n.3, p.248-250, May-June 1997.

BOUGLE,D.L.; STHAL,V. Survival of *Listeria monocytogenes* after irradiation treatment of camembert cheeses made from raw milk. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 57, n.9, p.811-813, Sep. 1994.

BRAMLEY,A.; DODD,F. Reviews of the progress of dairy science: mastitis control; progress and prospects. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.51, n.3, p.481-512, Aug. 1984.

BRITO,J.R.F.; BRITO,M.A.V.P.; RIBEIRO,M.T., VEIGA,V.M.O. Mastite bovina de A a Z. In: BRITO,J.R.F.; DIAS,J.C. **Sanidade do Gado Leiteiro**. Coronel Pacheco: EMBRAPA -CNPGL/TORTUGA, 1995. p.7-14.

BRITO,J.R.F.; CALDEIRA,G.A.V.; VERNEQUE,R.S.; BRITO,M.A.V.P. Sensibilidade e especificidade do "California Mastitis Test" como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.17, n.2, p.49-53, abr/jun. 1997.

CAL,T.; WESTON,P.G.; LUND,L.A. et al. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. **American Journal Veterinary Research**, Chicago, v.55, n.7, p.934-943, July 1994.

CARDOSO,R.M.; MOREIRA,H.L.M.; FRANCESCHI,J.L. Avaliação de testes para diagnóstico de mastites subclínicas em bovinos de leite. *Revista UNIMAR*, Paraná, v.18, n.3, p.627-636, mar. 1996.

CLIVER,D.O. *Foodborne Diseases*. Madison: Academic Press, INC, 1990, 395p.

COSTA,E.O.; BENITES,N.R.; CARCIOFLA,C.; MELVILLE,P.A.; PRADA,M.S.; RIBEIRO,A.R.; WATANABE,E. Survey on the etiology of intramammary infections in dairy cattle. In: Congresso Mundial de Buiatria, 18, Bolonha, 1994. *Proceedings...*1994a. p.60.

COSTA,E.O.; COUTINHO,S.D.A.; CASTILHO,W.; TEIXEIRA,C.M. Etiologia bacteriana da mastite bovina no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.17, n.2, p.107-112, abr./jun. 1986.

COSTA,E.O.; MELVILLE,P.A.; RIBEIRO,A.R.; PARDO,R.B.; WHITE,C.R. Métodos para diagnóstico microbiológico de mastite clínica bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.49, n.2, p.159-167, abril 1997.

COSTA,E.O.; MELVILLE,P.A.; RIBEIRO,A.R.; VIANI,F.C.; MASCOLLI,R.; OLIVEIRA,P.J. Mastite bovina: CMT x Microbiológico. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 17, Santos, 1993. *Anais...*Santos, 1993. p.35.

COSTA,E.O.; MELVILLE,P.A.; RIBEIRO,A.R.; WATANABE,E.; VIANI,F.C.; WHITE,C.R. Prevalence of intramammary infection in primigravid Brazilian dairy heifers. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam, v.29, n.2, p.151-155, Dec. 1996.

- COSTA,E.O.; PARDO,R.B.; VIANI,F.C.; WATANABE,E.T.; VENZON,P.**
 Estimativas de prejuízos devido à mastite subclínica em propriedades leiteiras dos estados de São Paulo e Minas Gerais. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 23, Olinda, 1994. *Anais...Olinda, 1994c.* p.53.
- COSTA,E.O.; RIBEIRO,A.R.; PARDO,R.B.; GARINO,F.; SILVA,J.A.B.**
 Estudo da ecologia dos microrganismos contribuindo para o controle da mastite por agentes ambientais. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 23, Olinda, 1994. *Anais...Olinda, 1994b.* p.52.
- COSTA,E.O.; RIBEIRO,A.R.; PARDO,R.B.; SILVA,J.A.B.; ABE,S.Y.; BENITES,N.R.** Frequência de mastite em bovinos leiteiros: quartos anteriores x posteriores. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 46, Vitória, 17 a 22 de julho de 1994d.
- COSTA,E.O.; RIBEIRO,A.R.; WATANABE,E.T.; MELVILLE,P.A.** Infections bovine mastitis caused by environmental organisms. *Journal of Veterinary Medicine B, Berlin, v.45, n.2, p.65-71, Mar. 1998.*
- CURTIS,G.D.W.; LEE,W.H.** Culture media and methods for the isolation of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v.26, n.4-5, June 1995.*
- DESMASURES,N; BAZIN,F.; GUÉGUEN,M.** Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. *Journal of Applied Microbiology, Oxford, v.83, n.1, p.53-58, July 1997.*
- DEVI,B.K.; SHUKLA,P.C., BAGHERWAL,R.K.** Incidence of subclinical mastitis in cows. *Indian Journal Dairy Science, New Delhi, v.50, n.6, p.477-478, Nov.-Dec. 1997.*

- DONINI,C. A contribuição ao estudo epidemiológico da listeriose como zoonose de causa alimentar. **Higiene Alimentar**, Mirandópolis, v.11, n.48, p.54, jul./ago. 1997.
- DUNCAN,S.E.; HACKNEY,C.R. Relevance of *Escherichia coli* O157:H7 to the Dairy Industry. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Iowa, v.14, n.11, p.656-660, Nov. 1994.
- ELVINGER,F.; NATZKE,R.P. Elements of mastitis control. In: VANHORN,H.H.; WILCOX,C.J. **Large Dairy Herd Management**. Champaign: American Dairy Science Association, 1992. p.441-463.
- ERSKINE,R.J.; TYLER,J.W.; RIDDELL,M.G.; WILSON,R.C. Theory, use, and realities of efficacy and food safety of antimicrobial treatment of acute coliform mastitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.198, n.6, p.980-984, Mar. 1991.
- FERGUSON,J. The distribution of the mastitis *Streptococci* in dairy herds. **The Cornell Veterinarian**, Ithaca, v.28, p.211-221, 1938.
- FRANCO,B.D.G.M.; LANDFRAF,M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Ed. Atheneu, 1996. 182p.
- FROST,A.J.; BROOKER,B.E. Hyperacute *Escherichia coli* mastitis of cattle in the immediate post-partum period. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v.63, n.10, p.327-331, Oct. 1986.
- FURLANETTO,S.M.P.; SANTOS,M.A.A.; HARA,C. Avaliação da eficiência de quatro meios de plaqueamento no seu isolamento. **Higiene Alimentar**, Mirandópolis, v.10, n.46, p.30-34, nov./dez. 1996.

- GITTER,M.; BRADLEY,R.; BLAMPIED,P.H. *Listeria monocytogenes* infection in bovine mastitis. **Veterinary Record**, London, v.107, n.25, p.390-392, Oct. 1980.
- GOHIL,V.S.; AHMED,M.A.; DAVIES,R.; ROBINSON,R.K. The direct enumeration of *Listeria monocytogenes* in a food with a low background microflora. **Food Control**, Great Britain, v.6, n.6, p.365-369, Dec. 1995.
- HARVEY,J.; GILMOUR,A. Occurrence of *Listeria* species in raw milk and dairy products produced in Northern Ireland. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.72, n.2, p.119-125, Febr. 1992.
- HELBERG,K.; POKARNEY,B. *Escherichia coli* O157:H7 cluster in Portland linked to raw milk. **Oregon Human Resources News/Health Division**. Apr. 1993.
- HILL,A.W.; SHEARS,A.L.; HIBBITT,K.G. The pathogenesis of experimental *Escherichia coli* mastitis in newly calved dairy cows. **Research Veterinary Science**, London, v.26, n.1, p.97-101, Jan. 1979.
- HILLERTON,J.E.; BRAMLEY,A.J.; STAKER,R.T.; MCKINNON,C.H. Patterns of intramammary infection and clinical mastitis over a 5 year period in a closely monitored herd applying mastitis control measures. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.62, n.1, p.39-50, Feb. 1995.
- HO,J.L.; SHANDS,K.N.; FRIEDLAND,G.; ECKIND,P.E.; FRASER,D.W. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston Hospitals. **Archieve International Medical**, Chicago, v.146, n.3, p.520-524, Mar. 1986.

HOLDAWAY,R.J.; HOLMES,C.W.; STEFFERT,I.J. A comparison of indirect methods for the diagnosis of subclinical intramammary infection in lactating dairy cows.3. Prediction of incidence of infection and the critical threshold value for somatic cell count from the herd's bulk milk somatic cell count. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v.51, n.2, p.79-82, Oct. 1996.

HUBBLE,I.B. Testing and reporting of raw milk quality. **Australian Journal Dairy Technology**, Highett, v.52, n.2, p.102-108, Oct. 1997.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Bovine mastitis – definition and guidelines for diagnosis. **Bulletin of the International Dairy Federation**, 211, 7, 1987. 24p.

JAMES,S.M.; FANNIN,S.L.; AGEE,B.A.; HALL,B.; PARKER,E.; VOGT,J.; RUN,G.; WILLIAMS,J.; LIEB,L.; PRENDERGAST,T.; WERNER,S.B.; CHIN,J. Listeriosis outbreak associated with Mexican style cheese - California. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Washington, v.34, n.3, p.357-359, Mar. 1985.

JENSEN,N.E.; AARESTRUP,F.M.; JENSEN,J.; WEGENER,H.C. *Listeria monocytogenes* in bovine mastitis. Possible implication for human health. **International Journal of food Microbiology**, Amsterdam, v.32, n.1-2, p.209-216, Sep. 1996.

JENSEN,J.; LARSEN,H.H. *Listeria monocytogenes* as the aetiological agent of three cases of mastitis in cows. **Nordisk Veterinaermedicin**, v.25, p.322-329, 1973.

JONES,D. Foodborne listeriosis. **Lancet**, Minneapolis, v. 336, n.8724, p.1171-1174, Nov. 1990.

JORDÃO,L.P. Conceitos atuais da mastite bovina. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.22, n.132, p.3-18, maio-jun. 1967.

KARMALI,M.A.; PETRIC,M.; LIM,C.; FLEMING,P.C.; ARBUS,G.S.; LIOR,H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin producing *Escherichia coli*. **Journal Infection of Disease**, Chicago, v.151, n.5, p.775-782, May 1985.

KEHRLI,M.E.; NONNECKE,B.J.; ROTH,J.A. Alteration in bovine neutrophil function during the periparturient period. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.50, n.2, p.207-214, Feb. 1989.

LANGONI,H.; FONSECA,T.H.P. Participação da *Listeria monocytogenes* na mastite bovina. Importância para a saúde pública. **Higiene Alimentar**, v.11, n.50, p.36-38, jul/ago. 1997.

LAM,T.J.G.M.; VAN VLIET,J.H.;SCHUKKEN,Y.H.; GROMMERS,F.J.; VAN VELDEN-RUSSCHER,A. The effect of discontinuation of postmilking teat disinfection in low somatic cell count herds. I. Incidence of clinical mastitis. **The Veterinary Quarterly**, The Hague, v.19, n.2, p.41-47, June 1997.

LUISJUAN-MORALES,A.L.; ALANIZ-DE-LA,R.O.; VÁSQUEZ-SANDOVAL,M.E.; ROSAS-BARBOSA,B.T. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Guadalajara, Mexico. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.58, n.10, p.1139-1141, Oct. 1995.

LUND,A.M.; ZOTTOLA,E.A.; PUSCH,D.J. Comparison of methods for isolation of *Listeria* from raw milk. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.54, n.8, p.602-606, Aug. 1991.

- MACDONALD,T.J.; MCDONALD,J.S.; ROSE,D.L. Aerobic Gram-negative rods isolated from bovine udder infections. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.31, p.1937-1941, 1970.
- MACHADO,P.F.; PEREIRA,A.R.; SILVA,L.F.P. Fatores que afetam a composição do leite. **Indústria de Laticínios**, n.17, p.32-35, set./out. 1998.
- MANZULLO,A. **Revista de la Asociacion Medica Argentina**, Buenos Aires, v.79, n.1, p.36-41, Jan. 1965.
- MARIER,R. **Lancet**, Minneapolis, v.2, n.5, p.1376-1378, Febr. 1973.
- MCDUGALL,S. Prevalence of clinical mastitis in 38 Waikato dairy herds. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v.58, p.76-78, 1998.
- MOORE,K.; CLARK,C. Outbreak of acute gastroenteritis attributable to *Escherichia coli* serotype O104:H21 – Helena, Montana, 1994. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Washington, v.44, n.27, p.501, Dec. 1995.
- MORETTI,A.; PASQUALL,P.; MENCARONI,G.; BONCIO,L.; PIERGILI FIORETTI,D. Relationship between cell counts in bovine milk and the presence of mastitis pathogens (yeasts and bacteria). **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, Amsterdam, v.45, n.3, p.129-132, Apr. 1998.
- MOUSTAFA,S.I.; MARTHE,E.H. Occurrence of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria monocytogenes* in abnormal milk. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Iowa, v.13, n.2, p.70-73, Feb. 1993.

- NOCARD & MOLLEREAU, 1974. In: GIESECKE, W.H.; VAN DEN HEEVER, L.V. The diagnosis of bovine mastitis with particular reference to subclinical mastitis: a critical review of relevant literature. *Journal of Veterinary Research*, Chicago, v.41, n.8, p.169-212, Aug. 1984.
- O'DONNELL, E.T. The incidence of *Salmonella* and *Listeria* in raw milk from farm bulk tanks in England and Wales. *Journal of the Society of Dairy Technology*, London, v.48, n.1, p.25-29, Feb. 1995.
- OLLIS, G.; SCHOONDERWOERD, M. Subclinical mastitis associated with *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens*. *Canadian Veterinary Journal*, Ottawa, v.30, n.6, p.525, June 1989.
- PEDNEKAR, M.D.; KAMAT, A.S.; ADHIKARI, H.R. Incidence of *Listeria* species in milk and milk products. *Indian Journal of Dairy Science*, New Delhi, v.50, n.2, p.142-152, Mar/Apr. 1997.
- PETERSON, E.H.; HASTINGS, E.G.; HADLEY, F.B. The pathology of nonspecific mastitis and consideration of possible etiological agents. *The Cornell Veterinarian*, Ithaca, v.28, p.307-324, 1938.
- PLASTRIDGE, W.N. Bovine mastitis: a review. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.41, n.9, p.1141-1181, Sep. 1958.
- PODA, G.; CESARONI, D.; ROSI, I.; MASSA, S. A comparison between two methods for the recovery of *Listeria monocytogenes* in milk powder reference samples. *Journal of Food Quality*, Champaign, v.18, n.3, p.167-172, Mar. 1995.
- QUINTO, E.J.; CEPEDA, A. Incidence of toxigenic *Escherichia coli* in soft cheese made with raw or pasteurized milk. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v.24, n.4, p.291-295, Apr. 1997.

REA,M.C.; COGAN,T.M.; TOBIN,S. Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.73, n.4, p.331-336, Oct.1992.

REBHUN,W.C.; GUARD,C.; RICHARDS,C.M. **Diseases of Dairy Cattle**. USA: Williams & Wilkins, 1995. 530p.

RUIZ,R.L. O problema das mastites nos bovinos. Prevenção e tratamento. **Higiene Alimentar**, Mirandópolis, v.2, n.1/2, p.55-63, jan./fev. 1983.

SANDHOLM,M.; KAARTINEN,L.; PYORALA,S. Bovine mastitis – why does antibiotic therapy not always work? Na overview. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v.13, n.3, p.248-260, Sep. 1990.

SARGEANT,J.M.; SCOTT,H.M.; LESLIE,K.E.; IRELAND,M.J.; BASHIRI,A. Clinical mastitis in dairy cattle in Ontario: Frequency of occurrence and bacteriological isolates. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v.39, n.4, p.33-38, Apr. 1998.

SCOTLAND,S.M.; ROWE,B.; SMITH,H.R.; WILLSHAW,G.A.;GROSS,R.J. Vero cytotoxin producing strains of *Escherichia coli* from children with haemolytic uraemic syndrome and their detection by specific DNA probes. **Journal Medical Microbiology**, London, v.25, n.4, p.237-243, Apr. 1988.

SHARMA,D.K.; SINGH,N.; JOSHI,D.V. *Escherichia coli* in milk meat and mesat products: isolation, characterization, antibiogram and zoonotic significance. **Journal of Food Science Technology**, Mysore, v.32, n.5, p.409-412, Sep./Oct. 1995.

SHARP,M.W. Bovine mastitis and *Listeria monocytogenes*. **Veterinary Record**, London, v.125 , n.20, p.512-513, Nov. 1989.

- SHPIGEL,N.Y.; WINKLER,M.; ZIV,G.; SARAN,A. Clinical, bacteriological and epidemiological aspects of clinical mastitis in israeli dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.35, n.1, p.1-9, April 1998a.
- SHPIGEL,N.Y.; WINKLER,M.; ZIV,G.; SARAN,A. Relationship between in vitro sensitivity of coliform pathogens in the udder and the outcome of treatment for clinical mastitis. **Veterinary Record**, London, v.142, n.6, p.135-137, Feb. 1998b.
- SHUSTER,D.E.; KEHRLI,M.E. Pathophysiology, host defense, and cytokine production during coliform mastitis in midlactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.75, suppl 1, p.160, 1992.
- SILVA,M.C.D.; HOFER,E.; TIBANA,A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.61, n.3, p.354-356, Mar. 1998.
- SINGH,B.R.; KAPOOR,K.N.; KUMAR,A.; AGARWAL,R.K.; BHILEGAONKAR,K.N. Prevalence of enteropathogens of zoonotic significance in meat, milk and their products. **Journal of Food Science Technology**, Mysore, v.33, n.3, p.251-254, May/June 1996.
- SMITH,K.L.; TODHUNTER,D.A.; SCHOENBERGER,P.S. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.68, n.6, p.1531-1553, June 1985.
- SPECK,M.L. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: APHA/Technical Committee on Microbiological for Foods, 1994. 914p.

- STEELE,M.L.; MCNAB,W.B.; POPPE,C.; GRIFFITHS,M.W.; CHEN,S;
DEGRANDIS,S.A.; FRUHNER,L.C.; LARKIN,C.A.; LYNCH,J.A.;
ODUMERU,J.A. Survey of Ontario bulk tank raw milk for food-borne
pathogens. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.60, n.11, p.1341-1346, Nov.
1997.
- TOLLE,A. Mastitis - the disease in relation to control methods. In: DODD,F.H.;
GRIFFIN,T.K.; KINGWELL,R.G. **Proceedings of the IDF Seminar on
Mastitis Control 1975**, Bruxelles, Belgique, p. 3-15.
- VARNAM,A.H.; EVANS,M.G. **Foodborne Pathogens**. An illustrated text.
London: Mosby Year Book, 1991, 557p.
- VEIGA,V.M.O.; TEIXEIRA,M.R.; BRITO,M.A.V.P.; BRITO,J.R.F. Controle
da mamite dos bovinos. In: FURLONG,J. **Manejo sanitário, prevenção e
controle de parasitoses e mamite em rebanhos de leite**. Coronel Pacheco:
EMBRAPA-CNPGL, Outubro, 1994. 70p.
- VISHINSKY,Y;GRINBERG,A; KHATIB,N; PORRIT,R. Bovine mastitis
caused by *Listeria monocytogenes* – clinical course and possible implications
on human health. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, Tel Aviv, v.52,
n.4, p.158-159, Apr. 1997.
- WATTS,J.L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**,
Amsterdam, v.16, p.41-66, 1988.
- WILSON,D.J.; GONZALEZ,R.N.; DAS H.H. Bovine mastitis pathogens in New
York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk
production. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.80, n.10, p.2592-2598,
Oct. 1997.
- ZOTTOLA,E.A.; SMITH,L.B. Pathogens in cheese. **Food Microbiology**,
London, v.8, n.3, p.171-182, Apr. 1991.

