

Avaliação através do método de contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) o crescimento no leite de colônias de *Candida* spp e *Klebsiella pneumoniae* isoladas de tanque de refrigeração de leite, em culturas puras e associadas

V.Zappa, P.A.Melville, N.R.Benites

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 CEP 05508 900, Cidade Universitária, São Paulo/SP Brasil. E-mail vanzappa@yahoo.com.br

RESUMO

O leite é um alimento natural de grande valor nutritivo, com a maior concentração de cálcio, proteínas completas, vitaminas e minerais que favorecem o crescimento e a manutenção de uma vida saudável. O hábito de varias localidades do Brasil, de consumir o leite cru e seus derivados, agentes patogênicos isolados de tanques de refrigeração de leite, constituem um potencial risco a saúde humana. Foram avaliadas através da contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) o comportamento de estirpes de *Candida* spp e *Klebsiella pneumoniae* isoladas de tanques de refrigeração de leite, submetidas a temperaturas diferentes simulando o leite em condições de refrigeração (7⁰C), em condições ambientais (25⁰C) e na temperatura de crescimento de patógenos (37⁰C). Procedeu-se ainda a avaliação da sensibilidade das estirpes de *Candida* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas e em associações ao processo de pasteurização lenta. Foram realizados 20 experimentos, sendo que houve diferença estatisticamente significativa entre as medianas das quantidades de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Klebsiella pneumoniae* quando em cultura em associação com *Candida* spp, nas diferentes temperaturas, indicando que a presença da *Candida* spp não



interfere com o crescimento da *Klebsiella pneumoniae*, já para *Candida* spp e *Klebsiella pneumoniae* em cultura pura houve um menor crescimento na temperatura de 7°C, sendo estes dois microrganismos são frequentemente isolados de tanques de refrigeração de leite.

Palavras-Chave : Leite. *Candida* spp. *Klebsiella pneumoniae*. Comparação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

ABSTRACT

Milk is a natural food of great nutritiveness with the highest concentration of calcium, whole proteins, vitamins and minerals that promotes human growth and the maintenance of a health life. A custom of various Brazilian localities, to consume raw milk and its by-products, represents a potential hazard to human health due to the pathogenic agents isolated from the refrigeration tanks. *Candida* spp. and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from milk refrigeration tanks when subjected to different temperatures simulating refrigerated milk condition (7°C), environmental condition (25°C) and pathogen growth condition (37°C) were evaluated according to their behavior in the colony forming units count. The sensibility evaluation of *Candida* spp. and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated and in pasteurization process associations was proceeded. Twenty milk samples were analysed, and there were significant statistical differences between the medians of *Klebsiella pneumoniae* colony forming units (CFU) quantities when in *Candida*-associated culture at different temperatures which indicates that the presence of *Candida* spp. do not increases *Klebsiella pneumoniae* growth. Meanwhile, there was a minor growth of *Candida* spp. and *Klebsiella pneumoniae* in pure culture at 7°C, for these two microrganisms are frequently isolated from milk refrigeration tanks.

Key Words: Milk *Candida* spp. *Klebsiella pneumoniae*. Colony Forming Units (CFU)



INTRODUÇÃO

O leite é um dos alimentos mais populares e de fácil obtenção para as classes menos favorecidas. O consumo de leite informal cresceu devido ao consumidor deste produto acreditar que este leite é melhor que o leite pasteurizado ou longa vida. Estes consumidores acreditam estarem consumindo um produto mais “natural” e “mais forte”, por ser um produto que vem direto da fazenda. O consumo deste leite torna-se ainda mais perigoso quando consumidos por crianças prematuras, recém nascidos, indivíduos imunossuprimidos, e idosos. O leite informal ou clandestino, sem nenhuma fiscalização, vendido diretamente ao consumidor representa atualmente, no Brasil, quase metade de toda a comercialização do leite. Várias são as razões para que isso ocorra, como origens culturais e econômicas e sociais (COSTA, 1999; FARIA, 1999).

O costume de consumir o leite ao pé da vaca (imediatamente após ordenha) ou provenientes de tanques de refrigeração por expansão presentes em propriedades de exploração leiteira, isto é, tanques que armazenam a totalidade do leite obtido do conjunto de vacas em lactação após um ou mais períodos de ordenha. Este leite cru, não é submetido a qualquer tipo de tratamento para a redução de sua carga microbiana, microbiota esta que pode ter origem a partir de úberes infectados (mastite infecciosa), da superfície dos úberes e/ou dos tetos ou ainda equipamentos de ordenha (mastite ambiental). Este leite, muitas vezes comercializado nas periferias das cidades ou em locais de difícil acesso ao produto fiscalizado pela inspeção sanitária, favorece a comercialização do chamado leite informal ou clandestino (COUSINS & BRAMLEY, 1981).



O produtor informal de leite pouco ou nada investe em tecnologias e controle de qualidade de seu produto, tendo a vantagem de possuir um consumidor fiel além da sonegação fiscal. A simples observação a olho nu não garante ao consumidor que o leite que ele esteja consumindo seja de boa qualidade. Além dos riscos de adulteração, como a adição de água ou a retirada de gordura, há os riscos em relação a saúde do consumidor. A fervura deste leite em condições caseiras, sem controle de tempo e temperatura, não é garantia de eliminação dos agentes causadores de doenças que possam estar presentes no leite informal.

A qualidade do leite cru é o ponto crítico na obtenção de produtos lácticos seguros do ponto de vista sanitário e de alto valor comercial em relação ao valor nutritivo e as qualidades sensoriais. Redução dos custos de produção, remuneração baseada na qualidade, maior rendimento industrial, aumenta a vida de prateleira dos produtos, sendo assim, os consumidores podem obter produtos lácteos dentro dos padrões nutritivos e de segurança alimentar (BRASIL, 2001).

O leite pasteurizado, é o resultado do processo de tratamento térmico denominado pasteurização (HTST – High Temperature Short Time), que consiste em elevar a temperatura do leite cru, resfriando-o imediatamente. Após esse processo, o leite pasteurizado é embalado, sendo classificado conforme a qualidade microbiológica, podendo ter as denominações de tipos A, B ou C. A pasteurização garante a eliminação dos microrganismos patogênicos do leite, mas nele ainda permanecem ativos alguns microrganismos capazes de deteriorá-lo (MEIRELES et al., 2001).

Bactérias que são denominadas como coliformes, são de grande importância para a pecuária leiteira. A *Klebsiella pneumoniae* se destaca entre os gêneros de coliformes mais comumente encontrados no leite. É uma bactéria gram-negativa frequentemente encontrada no meio ambiente, indicando se tratar de mais um contaminante ambiental que sendo



responsável pela mastite. Sob condições que ainda são pouco compreendidas, *K. pneumoniae* pode ser um fator causal em diversos processos inflamatórios. É causa importante de pneumonia grave e de infecções do trato respiratório superior e do ouvido médio em humanos. Outros distúrbios associados a *K. pneumoniae* são meningite, mastite em bovinos e suínos (GONES, 2002).

A *Candida* é uma levedura oportunista por excelência. Os fatores que predis põem as micoses oportunistas podem ser classificados em: fatores intrínsecos ou próprios do hospedeiro, como neoplasias, diabetes, hemopatias diversas, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), além dos fatores que alteram a imunidade celular como velhice, gravidez, prematuridade, entre outros. Fatores como antibioticoterapia prolongada, corticoideterapia, antiblásticos, transplantes e ambientes hospitalares contaminados, são considerados extrínsecos predisponentes a micoses oportunistas (LACAZ, 1973; TRABULSI, 2005).

Em sistemas de produção pecuária, mastites por fungos são menos comuns, mas comumente encontrados no meio ambiente. A *Candida* spp, foi utilizada neste estudo por se tratar de ser uma levedura comumente encontrada no leite.

No presente estudo, as linhagens de *Klebsiella pneumoniae* foram isoladas de leite de tanque de refrigeração em propriedades nas quais os animais com mastite não apresentavam processo infeccioso na glândula mamária associado a este microrganismo, portanto a contaminação do leite foi ambiental.

Os objetivos do presente trabalho foram: avaliar através da contagem de UFC/mL o comportamento de estirpes de *Candida* spp e *Klebsiella pneumoniae* isoladas de leite, em culturas puras e em associações, em diferentes temperaturas, simulando as temperaturas de geladeira (7⁰C), do meio ambiente (25⁰ C) e de estufa microbiológica (37⁰ C) por 24 horas;



e utilizar o processo de pasteurização lenta, para avaliar se há redução na quantidade de UFC/mL de estirpes de *Candida* spp e *Klebsiella pneumoniae* inoculadas no leite.

Estudos que possam contribuir no conhecimento de interação de microrganismos no leite, podem auxiliar aos profissionais qualificados na profilaxia e manejo de animais de produção de leite, bem como na manipulação deste produto em todas as suas faces.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os microrganismos utilizados no presente estudo foram: *Candida krusei*, *Candida guilliermondi*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida kefyr*, *Candida lusitanae*, *Candida albicans* e a *Klebsiella pneumoniae*. Foram isolados de amostras de leite de tanques de refrigeração de propriedades de exploração de leite cru, dos tipos A, B e C. As culturas foram feitas pela semeadura dos leites, em meios sólidos contendo ágar-sangue (8% de sangue desfibrilado de ovino), distribuídos em placas de Petri e incubados a 37°C, e a leitura realizada 24 horas após a semeadura. As colônias selecionadas foram coradas pela Coloração de Gram, para diferenciar as bactérias em Gram negativas (*Klebsiellas* spp.) (Fig.1), das leveduras (*Candida* spp) (Fig.2), através das diferenças morfológicas.

Para os microrganismos já previamente isolados e identificados, foram preparadas duas suspensões na Escala de Mac Farland (suspensão de sulfato de bário, escala 1,0) (Fig.3), sendo a primeira com uma linhagem de *Candida* e a segunda com estirpe de *Klebsiella pneumoniae* .

A partir destas amostras, foi colhido uma alíquota de 0,5 ml da solução de *Klebsiella pneumoniae* e 0,5 ml da solução de *Candida* spp, que foram adicionadas respectivamente em tubos de ensaios contendo 4,5 ml de leite estéril cada um. Em outro tubo de ensaio contendo 4



ml de leite estéril, foi adicionado 0,5 ml da suspensão de *Klebsiella pneumoniae* e 0,5 ml da suspensão de *Candida* spp. Todos os tubos foram armazenados, por 24 horas, em três temperaturas diferentes, 7°C (Fig. 4), 25°C (Fig.5) e 37°C (Fig.6). Foi realizada após 24 horas a diluição, até 10^{-5} das soluções de *Candida*, e 10^{-8} para *Klebsiella pneumoniae*. Uma alíquota de 0,1ml foi colhida de cada diluição para cultivo (utilizando-se a técnica de *spread plate* ou, espalhamento em placas), em ágar sangue de carneiro, com incubação a 37°C por um período de 24 horas, e após este período foram contadas as UFC/mL .

A partir das culturas obtidas e armazenadas pelo tempo e temperaturas acima descritos, todas as placas que tiveram UFC/mL em número menor ou igual a 250 foram contadas (Fig.7), o resultado anotado e submetidas ao processo de pasteurização lenta. Para este, o leite foi aquecido a 63°C durante 30 minutos e resfriado imediatamente, utilizando gelo. Os equipamentos utilizados para este processo de pasteurização foram basicamente um tanque aquecido a vapor “Banho Maria” e um termômetro (Fig.8).

Em todas as etapas experimentais, sem exceção, a técnica asséptica foi valorizada e os testes foram efetuados em duplicata.

Para as análises estatísticas foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis Test e Dunn's Multiple Comparisons Test (1990 – 1993) do “software” Graphpad Instat.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do experimento estão apresentados na **Tabela 1, 2 e 3:**

TABELA 1: Valor numérico da mediana, valor numérico mínimo, valor numérico máximo das UFC/mL, multiplicados por 10^5 de suspensão de *Candida* spp., *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) e associação de *Candida* spp. e *K. pneumoniae*, isoladas de tanques de refrigeração, que cresceram em ágar sangue após inoculação em leite e mantidas às temperaturas de 7°C, 25°C e 37°C.

Microrganismos e associação	Antes da Pasteurização			Após a Pasteurização		
	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo
<i>Candida a 7°C</i>	< 1000	< 1000	300000	< 1000	< 1000	< 1000
<i>K. pneumoniae a 7°C</i>	114000000	1200	400000000	< 1000	< 1000	< 1000
<i>Candida</i> associada a <i>K. pneumoniae a 7°C</i>	96000	1000	3537000	< 1000	< 1000	< 1000
<i>K. pneumoniae</i> associada a <i>Candida a 7°C</i>	96000	1000	3537000	< 1000	< 1000	< 1000
<i>Candida e K. pneumoniae a 7°C</i>	190000	2000	7074000	< 1000	< 1000	< 1000
<i>Candida a 7°C</i>	10000	< 1000	5600000	< 1000	< 1000	< 1000
<i>K. pneumoniae a 25°C</i>	1800000000	450000000	13000000000	< 1000	< 1000	< 1000
<i>Candida</i> associada a <i>K. pneumoniae 25°C</i>	35300000	102000	35300000	< 1000	< 1000	< 1000
<i>K. pneumoniae</i> associada a <i>Candida 25°C</i>	35300000	102000	35300000	< 1000	< 1000	< 1000
<i>Candida e K. pneumoniae a 25°C</i>	70700000	204000	70700000	< 1000	< 1000	< 1000
<i>Candida a 37°C</i>	< 1000	< 1000	353700000	< 1000	< 1000	< 1000
<i>K. pneumoniae a 37°C</i>	800000000	115000000	35370000000	< 1000	< 1000	< 1000
<i>Candida</i> associada a <i>K. pneumoniae 37°C</i>	35300000	12000	353700000	< 1000	< 1000	< 1000
<i>K. pneumoniae</i> associada a <i>Cândida 37°C</i>	35300000	12000	353700000	< 1000	< 1000	< 1000
<i>Candida e K. pneumoniae a 37°C</i>	70700000	24000	70700000	< 1000	< 1000	< 1000

TABELA 2: Valor logarítmico da mediana, valor logarítmico mínimo, valor logarítmico máximo das UFC/ml UFC/ mL por 10^5 de suspensão de *Candida* spp., *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) e associação de *Candida* spp. e *K. pneumoniae*, isoladas de tanques de refrigeração, que cresceram em ágar sangue após inoculação em leite e mantidas às temperaturas de 7°C, 25°C, 37°C

Antes da Pasteurização

Após a Pasteurização



Microrganismos e associação	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo
<i>Cândida</i> 7°C	3	3	5,477121255	3	3	3
<i>K. pneumoniae</i> 7°C	8,05690485	3,0791812	9,602059991	3	3	3
<i>Candida</i> associada a <i>K. pneumoniae</i> 7°C	4,98227123	3	6,54863506	3	3	3
<i>K. pneumoniae</i> associada a <i>Cândida</i> 7°C	4,98227123	3	6,54863506	3	3	3
<i>Candida</i> e <i>K. pneumoniae</i> 7°C	5,2787536	3,30103	6,849665055	3	3	3
<i>Cândida</i> 25°C	4	3	6,748188027	3	3	3
<i>K. pneumoniae</i> 25°C	9,25527251	8,6532125	11,11394335	3	3	3
<i>Candida</i> associada a <i>K. pneumoniae</i> 25°C	7,54777471	5,0086002	7,547774705	3	3	3
<i>K. pneumoniae</i> associada a <i>Cândida</i> 25°C	7,54777471	5,0086002	7,547774705	3	3	3
<i>Candida</i> e <i>K. pneumoniae</i> 25°C	7,84941941	5,3096302	7,849419414	3	3	3
<i>Cândida</i> 37°C	3	3	8,54863506	3	3	3
<i>K. pneumoniae</i> 37°C	9,90308999	8,0606978	12,54863506	3	3	3
<i>Candida</i> associada a <i>K. pneumoniae</i> 37°C	7,54777471	4,0791812	8,54863506	3	3	3
<i>K. pneumoniae</i> associada a <i>Cândida</i> 37°C	7,54777471	4,0791812	8,54863506	3	3	3
<i>Candida</i> e <i>K. pneumoniae</i> 37°C	7,84941941	4,3802112	7,849419414	3	3	3

TABELA 3: Valor exponencial da mediana, valor mínimo, valor máximo das unidades multiplicados por 10^5 de suspensão de *Candida* spp., *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) e associação de *Candida* spp. e *K. pneumoniae*, isoladas de tanques de refrigeração, que cresceram em ágar sangue após inoculação em leite e mantidas às temperaturas de 7°C, 25°C e 37°C.

Microrganismos e associação	Antes da Pasteurização			Após a Pasteurização		
	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo
<i>Cândida</i> 7°C	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^5$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$
<i>K. pneumoniae</i> 7°C	$1,1 \times 10^8$	$1,2 \times 10^3$	$4,0 \times 10^9$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$
<i>Candida</i> associada a <i>K. pneumoniae</i> 7°C	$9,6 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	$3,5 \times 10^6$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$
<i>K. pneumoniae</i> associada a <i>Cândida</i> 7°C	$9,6 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	$3,5 \times 10^6$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$
<i>Candida</i> e <i>K. pneumoniae</i> 25°C	$1,9 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3$	$7,1 \times 10^6$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$
<i>Cândida</i> 25°C	$1,0 \times 10^4$	$< 1,0 \times 10^3$	$5,6 \times 10^6$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$
<i>K. pneumoniae</i> 25°C	$1,8 \times 10^9$	$4,5 \times 10^8$	$1,3 \times 10^{11}$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$
<i>Candida</i> associada a <i>K. pneumoniae</i> 25°C	$3,5 \times 10^7$	$1,0 \times 10^5$	$3,5 \times 10^7$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$
<i>K. pneumoniae</i> associada a <i>Cândida</i> 25°C	$3,5 \times 10^7$	$1,0 \times 10^5$	$3,5 \times 10^7$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$
<i>Candida</i> e <i>K. pneumoniae</i> 25°C	$7,1 \times 10^7$	$2,0 \times 10^5$	$7,1 \times 10^7$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$
<i>Cândida</i> 37°C	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$	$3,5 \times 10^8$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$
<i>K. pneumoniae</i> 37°C	$8,0 \times 10^9$	$1,2 \times 10^8$	$3,5 \times 10^{12}$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$
<i>Candida</i> associada a <i>K. pneumoniae</i> 37°C	$3,5 \times 10^7$	$1,2 \times 10^4$	$3,5 \times 10^8$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$
<i>K. pneumoniae</i> associada a <i>Cândida</i> 37°C	$3,5 \times 10^7$	$1,2 \times 10^4$	$3,5 \times 10^8$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$
<i>Candida</i> e <i>K. pneumoniae</i> 37°C	$7,1 \times 10^7$	$2,4 \times 10^4$	$7,1 \times 10^7$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$

Na temperatura de 7°C, simulando a temperatura de geladeira, verificou-se o crescimento das UFC/mL das amostras semeadas com *Candida* spp estaria dentro do limite

estabelecido pela INS51 (BRASIL, 2002); porém as amostras inoculadas com *K. pneumoniae*



não poderia ser consumido como leite tipo A, apesar de estarem dentro dos parâmetros estabelecidos para o leite tipo B.

Quando se utiliza a temperatura de 25⁰C para simular o meio ambiente, na qual o leite estaria submetido no meio de transporte empregado, muitas vezes sem as mínimas condições de refrigeração, e por um tempo longo, as amostras apresentaram contagem de UFC/mL compatível as contagens de leite tipo B, para as amostras inoculadas por *Candida* spp, *K. pneumoniae* e *Candida* spp em associação com *K. pneumoniae*.

Na temperatura de 37⁰C, que seria a temperatura ideal de crescimento para o microrganismo. Neste caso, tivemos os seguintes resultados para *Candida* spp, *K. pneumoniae* e para *Candida* spp quando em associação com *K. pneumoniae*. Esse leite seria o que sofreu aumento da contaminação com a elevação de temperatura, este leite somente poderia ser utilizado como leite C; já que para este não se faz contagem padrão em placa

Pela inexistência de trabalhos que mostrem uma interação ecológica entre esses dois microrganismos, não se pode afirmar que a presença de *Candida* spp potencializa o crescimento da *Klebsiella pneumoniae*, visto que no presente trabalho a associação de *Klebsiella pneumoniae* com *Candida* spp aumentou significadamente o número das UFC/mL de *Klebsiella pneumoniae*. Mas, pode-se afirmar que não existe uma relação simbiótica entre esses dois patógenos, ao contrário do que ocorre, por exemplo, com as bactérias lácticas na fermentação do iogurte. O crescimento em associação entre *Candida* spp e *Klebsiella pneumoniae* resultou em uma diminuição significativa do número de UFC/mL de *Candida* spp quando comparada com o crescimento em cultura pura da mesma levedura nas três diferentes temperaturas testadas.

CONCLUSÃO



Houve diferença estatisticamente significativa entre as medianas das quantidades de UFC/mL de *Klebsiella pneumoniae* quando em cultura pura e em associação com *Cândida* spp, nas diferentes temperaturas, indicando que a presença de *Candida* spp não interferiu com o crescimento de *Klebsiella pneumoniae*, porém esta apresentou, em associação com a *Candida* spp, crescimento mais intenso que em cultura pura. Verifica-se um menor crescimento para *Candida* spp e *Klebsiella pneumoniae* em cultura pura na temperatura de 7^oC. Portanto, a temperatura de refrigeração diminuiu o metabolismo dos microrganismos envolvidos. A utilização do processo de pasteurização lenta demonstra eficiência na redução de UFC/ml nas estirpes de *Candida* spp e *Klebsiella pneumoniae* inoculadas no leite. Portanto este procedimento pode ser utilizado para diminuição da contaminação do produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COSTA, E. Leite, problema cultural. **Napigama**, v. 2, n. 4, p. 2, 1999

COSTA, E. Brasil: de importador a exportador de leite. **Napigama**, v. 2, n. 5, p. 2, 1999.

COUSINS, C. M.; BRAMLEY, A. J. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R. K. **Dairy microbiology**. Englewood: Applied Sciense Publishers, 1981. v. 1, p.119-163.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Normas de lácteos: Curso de atualização e treinamento sobre novas normas de produção de lácteos. São Paulo: Mikbizz LTDA, 2001. p. 66.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 51, DE 18 DE SETEMBRO DE 2002.. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União de 20/09/2002, Seção 1 Página 13**

FARIA, V. P.; MATTOS, W. R. S. Leite informal: um inimigo invisível. **Balde Branco**, v. 35, n. 415, p. 60-62, 64-66, 1999.



GOMES, A. C. L. F. **Detecção e significado de enterobacterias produtoras de β -Lactamase de espectro estendido em pacientes do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto-USP.** 88f. São Paulo, 2002. Dissertação - (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2002.

GRAPHPAD INSTAT SOFTWARE. **Statistical analysis systems for personal computers.** S.I., 1990-1993.

MEIRELES, J. A.; ALVES, R. D. Importância do leite longa vida para o desenvolvimento do Mercado Brasileiro de Leite. **Revista Balde Branco**, out 2001

LACAZ, C. S. **Micologia Médica.** Brasília: São Paulo: 1973. p. 387.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; MARTINEZ, M. B.; CAMPOS, L. C.; GOMPERTZ, O. F.; RÁCZ, M. L. **Microbiologia.** 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005, p. 273; 451-462.

