GISELE DIAS DE FREITAS

Comparação entre o crescimento de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Staphylococcus* spp. e *Klebsiella pneumoniae* e a sensibilidade destas cepas ao processo de pasteurização lenta

São Paulo
2007

GISELE DIAS DE FREITAS

Comparação entre o crescimento de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Staphylococcus* spp. e *Klebsiella pneumoniae* e a sensibilidade destas cepas ao processo de pasteurização lenta

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada à Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Nilson R. Benites

São Paulo
2007

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1899
FMVZ

Freitas, Gisele Dias de

Comparação entre o crescimento de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Staphylococcus* spp. e *Klebsiella pneumoniae* e a sensibilidade destas cepas ao processo de pasteurização lenta / Gisele Dias de Freitas. – São Paulo: G. D. Freitas, 2007.
88 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Nilson R. Benittes.

1. *Staphylococcus* spp. 2. *Klebsiella pneumoniae*. 3. Comparação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). 4. Pasteurização. 5. Mastite. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo de unidades formadoras de colônias, no leite, de *Staphylococcus spp.* e *Klebsiella pneumoniae*, isolados de tanque de refrigeração de leite, em cultura pura e associação", protocolo nº758/2005, utilizando coleta de leite bovino, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Study of colony form units in the milk of *Staphylococcus spp.* and *Klebsiella pneumoniae*, isolated from tank of milk refrigeration in pure culture and association", protocol number 758/2005, under the responsibility of Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 03 de novembro de 2005

Profª Drª
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FREITAS, Gisele Dias de

Título Comparação entre o crescimento de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Staphylococcus* spp. e *Klebsiella pneumoniae* e a sensibilidade destas cepas ao processo de pasteurização lenta

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada à Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À Deus que em todos os momentos de
nossas vidas nos acompanha.

Aos meus pais, Nelson Dias de
Freitas e Vera Lucia Mazucato
de Freitas e ao meu irmão Neury
Dias de Freitas pela lição, honestidade e apoio
demonstrados a cada momento, que
sempre deram força e base para
seguir o meu caminho e alcançar
meus objetivos.

“Sozinho, você está mal acompanhado”

Douglas Hatch
CDC – ATLANTA

“Se depender de mim, nunca ficarei completamente maduro,
nem nas idéias, nem no estilo, mas sempre verde,
incompleto, experimental”

Gilberto Freire

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, pelo apoio, paciência, oportunidade, confiança e respeito dispensados durante o período de realização deste trabalho.

Agradecimento especial à Dr^a Priscila Ane Melville, por toda ajuda nesta dissertação.

Agradecimento especial ao Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcelos, Coordenador do Curso de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses, da FMVZ – USP pela dedicação incansável e amizade.

Agradecimento especial à Prof^a. Dr^a. Sonia Regina Pinheiro, pela incansável parceria e amizade.

Agradecimento especial ao Prof. Dr. Ricardo Augusto Dias, pela paciência, ajuda nas análises estatísticas e pela amizade de todos os dias.

Agradecimento especial à Prof^a. Dr^a. Evelise Oliveira Telles Ramos e Silva, do Setor de Higiene Alimentar, VPS/FMVZ/USP, pelo esclarecimento e ajuda na metodologia deste trabalho e pela amizade.

Agradecimento especial aos colegas de Pós-graduação e laboratório, Clarice Yukami Minagawa, Sonia Sakata, Luís Ivan Martinhão Souto, Patrícia M. Ohara e Vanessa Zappa pelo companheirismo e amizade em cada momento da realização deste trabalho.

Aos funcionários e professores do VPS – FMVZ – USP pela companhia e conhecimento compartilhado

A todos os docentes e colegas de residência e mestrado do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) pelo incentivo e despertar para a pesquisa.

A todos os meus amigos, parentes e conhecidos, que de forma direta ou indireta acompanharam e torceram pela concretização deste projeto.

RESUMO

FREITAS, G. D. **Comparação entre o crescimento de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Staphylococcus* spp. e *Klebsiella pneumoniae* e a sensibilidade destas cepas ao processo de pasteurização lenta.** [Comparison between the growth of Colony Form Units of *Staphylococcus* spp. and *Klebsiella pneumoniae* and the sensibility of these microorganisms to the process of slow pasteurization]. 2007. “88” f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Introdução: O leite pode ser considerado um dos alimentos mais completos por apresentar alto teor de proteínas e sais minerais, porém, também é considerado excelente meio de cultura para microrganismos. **Objetivos:** Identificar o número de UFC de *Staphylococcus* spp. e *Klebsiella pneumoniae*, cultivados isoladamente ou em associação, em leite integral estéril, a 6 °C, 27 °C e 37 °C e descrever a curva de morte térmica, quando submetidas ao processo de pasteurização lenta isoladamente ou em associação. **Material e Métodos:** Avaliação através da contagem das UFC, do comportamento de *Staphylococcus* spp. e *K. pneumoniae*, isoladas de tanque de refrigeração de leite, submetidas a temperaturas que simulam o leite em condições de refrigeração (6 °C), condições ambientais (25 °C) e na temperatura ideal de crescimento de patógenos mesófilos (36°C). Avaliação da sensibilidade de *Staphylococcus* spp. e *K. pneumoniae* isoladas e em associações ao processo de pasteurização lenta. **Resultados:** Na escala 1 de Mac Farland a média de UFC de *K. pneumoniae* foi maior que a de *Staphylococcus* spp. A 6 °C as bactérias no leite, isoladas ou em associação crescem na mesma velocidade. A 25 °C a *K. pneumoniae* cresce mais que o *Staphylococcus* spp. A 25 °C *K. pneumoniae* associada ao *Staphylococcus* spp. cresce mais do que quando encontra-se isolada. A 36 °C *K. pneumoniae* associada ao *Staphylococcus* spp. cresce mais do que quando encontra-se isolada e ainda mais que a 25 °C. A pasteurização lenta foi efetiva, pois reduziu em no mínimo 90% as UFC no leite após 30 minutos a 65 °C. **Conclusão:** a medida que aumenta a temperatura, até 36 °C, a *Klebsiella pneumoniae* apresenta crescimento superior ao *Staphylococcus* spp., a contaminação de leite por *Klebsiella pneumoniae* (contaminação ambiental) irá influenciar mais na qualidade do produto final, comparando-se à contaminação por *Staphylococcus* spp., oriundo de mastite e a interação de microrganismos altera a

morte dos mesmos, recomendando-se que novos estudos sejam realizados para que se entenda melhor esse processo.

Palavras-Chave: *Staphylococcus* spp. *Klebsiella pneumoniae*. Comparação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Pasteurização. Mastite

ABSTRACT

FREITAS, G. D. **Comparison between the growth of Colony Form Units of *Staphylococcus* spp. and *Klebsiella pneumoniae* and the sensibility of these microorganisms to the process of slow pasteurization.** [Comparação entre o crescimento de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Staphylococcus* spp. e *Klebsiella pneumoniae* e a sensibilidade destas cepas ao processo de pasteurização lenta]. 2007. "88" f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Introduction: The milk can be considered one of the most complete food for its high contents of protein and minerals, but also it is considered an excellent medium of culture for microorganisms. **Objective:** To identify the number of the Colony Forming Units of *Staphylococcus* spp. and *Klebsiella pneumoniae*, in integral sterile milk, at different temperatures (6°C, 27°C e 37°C) and to describe a thermal curve death, when submitted to the process of slow pasteurization isolated or in association.

Materials and methods: Evaluation by counting of the colony forming units and the behavior of the *Staphylococcus* spp. and *Klebsiella pneumoniae*, isolated and in association occurred in the cooling tank, submitted to temperatures that simulate the conditions of milk in cooling (6°C), environmental condition (25°C) and the optimal temperature for the growth of microorganisms (36°C). Evaluation of the sensibility of *Staphylococcus* spp. and *Klebsiella pneumoniae* isolated and in association during the pasteurization process. **Results:** In Scale 1 of Mac Farland the average of the colony form units of the *K. pneumoniae* was greater than the colony of *Staphylococcus* spp. At 6°C the microorganisms in the milk isolated or in association grew at the same speed. At 25°C *K. pneumoniae* associated with *Staphylococcus* spp. grew more than when they were isolated. At 36°C *K. pneumoniae* associated with *Staphylococcus* spp. grew more then when it was isolated and more than at 25°C. So we can conclude that the slow pasteurization was effective, because it has reduced at least 90% of the colony form unity in the milk after 30 minutes at 65°C.

Conclusion: By raising the temperature up to 36°C, a *Klebsiella pneumoniae* had a superior growth when compared with *Staphylococcus* spp.; the contamination of milk by *Klebsiella pneumoniae* (environmental contamination) influences the most the quality of the final product when compared to the contamination by *Staphylococcus* spp. from mastitis, we can also conclude that the interaction of microorganisms

modify the death rate of them. New studies and researches are recommended to a deeper and better comprehension of this process.

Key Words: *Staphylococcus* spp. *Klebsiella pneumoniae* and Colony Forming Units (CFU). Pasteurization. Mastitis.

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Curva de Morte térmica da média de Unidades Formadoras de Colônia (UFC), durante o processo de pasteurização lenta para *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus* spp. pasteurizados isoladamente 61
- Gráfico 2 - Curva de Morte térmica da média de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) durante o processo de pasteurização lenta para *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus* spp. pasteurizados em associação 67

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 - Temperatura de armazenamento do Leite	76
--	----

LISTA DE FOTOS

Foto 1 -	Leite em temperatura ambiente de 30 °C na cidade de Dublin – Irlanda, Julho de 2006	25
Foto 2 -	Foto mais aproximada de leite em temperatura ambiente de 30 °C na cidade de Dublin – Irlanda, Julho de 2006.....	26
Foto 3 -	Microscopia óptica de <i>Staphylococcus</i> spp.....	31
Foto 4 -	Semeadura em placa de <i>Staphylococcus</i> spp. em meio de cultura de ágar sangue.....	31
Foto 5 -	Microscopia óptica de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	33
Foto 6 -	Semeadura em placa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> . em meio de cultura PCA.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Diluição da amostra de <i>Klebsiella pneumoniae</i> até 10^{-9} e plaqueamento em duplicata	44
Figura 2 -	Diluição da amostra de <i>Staphylococcus</i> spp. até 10^{-9} e plaqueamento em duplicata	45
Figura 3 -	Diluição da amostra de <i>Staphylococcus</i> spp. + <i>Klebsiella pneumoniae</i> até 10^{-9} e plaqueamento em duplicata	46
Figura 4 -	Pasteurização, diluição e semeadura das sub-amostras de <i>Staphylococcus</i> spp. + <i>Klebsiella pneumoniae</i>	47
Figura 5 -	Pasteurização, diluição e semeadura das sub-amostras de <i>Staphylococcus</i> spp. + <i>Klebsiella pneumoniae</i>	48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Média, mediana e valores mínimos e máximos do número de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro da Escala 1 de MacFarland. São Paulo, 2006/2007 50
- Tabela 2 - Mediana e valores mínimo e máximo na contagem de Unidades Formadoras de Colônias de *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus* spp. isolados e em associação. São Paulo, 2006/2007 52
- Tabela 3 - Crescimento de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Klebsiella pneumoniae* isolada e em associação com *Staphylococcus* spp. em meio de cultura Mac Conkey e PCA na temperatura de crescimento de 6 °C/ 24h. São Paulo, 2006/200753
- Tabela 4 - Crescimento de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Klebsiella pneumoniae* isolada e em associação com *Staphylococcus* spp. em meio de cultura Mac Conkey e PCA na temperatura de crescimento de 25 °C/ 24h. São Paulo, 2006/2007 54
- Tabela 5 - Crescimento de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Klebsiella pneumoniae* isolada e em associação com *Staphylococcus* spp. em meio de cultura Mac Conkey e PCA na temperatura de crescimento de 36 °C/ 24h. São Paulo, 2006/2007 55

Tabela 6 - Média, mediana e valores mínimo e máximo do processo de pasteurização lenta, demonstrando a curva de morte térmica a cada cinco minutos (0 a 30 minutos), para <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolada. São Paulo, 2006/2007	57
Tabela 7 - Resultados da média, mediana e valores mínimo e máximo do processo de pasteurização lenta, demonstrando a curva de morte térmica a cada cinco minutos (0 a 30 minutos), para <i>Staphylococcus</i> spp. isolado. São Paulo, 2006/2007	59
Tabela 8 - Resultados da média, mediana e valores mínimo e máximo do processo de pasteurização lenta, demonstrando a curva de morte térmica a cada cinco minutos (0 a 30 minutos), para <i>Klebsiella pneumoniae</i> associada à <i>Staphylococcus</i> spp. São Paulo, 2006/2007	63
Tabela 9 - Resultados da média, mediana e valores mínimo e máximo do processo de pasteurização lenta, demonstrando a curva de morte térmica a cada cinco minutos (0 a 30 minutos), para <i>Staphylococcus</i> spp. associado à <i>Klebsiella pneumoniae</i> . São Paulo, 2006/2007	65
Tabela 10 - Comparação entre o processo de pasteurização quando os microrganismos são submetidos ao processo isoladamente e em associação através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. São Paulo, 2006/2007	68
Tabela 11 - Representação da função que mais se adequou a distribuição espacial dos resultados no processo de pasteurização lenta para <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Staphylococcus</i> spp, isolados e em associação. São Paulo, 2006/2007	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

h	Hora
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
mcg	Micrograma
mcl	Microlitro
mg	Miligramas
mL	Mililitro
p	Página
sp	Espécie
spp	Espécies
U.F.C	Unidades Formadoras de Colônias
n°	Número
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
NMP	Número mais provável

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 REVISÃO DE LITERATURA	28
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivos específicos	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Pasteurização	41
4.1.1 Controle do processo de pasteurização	42
4.1.2 Fosfatase alcalina	42
4.1.3 Peroxidase	43
5 RESULTADOS	50
5.1 Resultados da pasteurização	56
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

A qualidade dos produtos alimentares é, hoje, uma das maiores preocupações tanto no ramo acadêmico e científico, onde uma grande variedade de projetos vem sendo desenvolvidos com o objetivo de averiguar a qualidade dos alimentos que chegam à mesa do consumidor, quanto na própria população que a cada dia mais se preocupa com a alimentação e com a qualidade do alimento que ingere ou oferece a sua família.

Entretanto muitas mudanças ainda necessitam ser realizadas, dentre elas, vários hábitos alimentares e culturais que podem provocar sérios danos à saúde dos consumidores. Estes costumes não se restringem apenas ao Brasil; nas duas fotos 1 e 2 a seguir, é possível visualizar uma prática extremamente difundida na população européia, onde o entregador de leite deixa os galões do lado de fora da porta do consumidor, a temperatura ambiente, até que este o resolva recolher, deixando o produto em temperatura inadequada onde pode ocorrer a multiplicação de diferentes tipos de microrganismos existentes no leite pasteurizado.

No Brasil, a maior dificuldade encontrada, principalmente entre a população menos urbana, é a idéia de que os produtos oriundos de sítios ou pequenas propriedades, onde não há qualquer tipo de inspeção sanitária ou controle de qualidade, sejam os produtos de melhor qualidade e os produtos mais “puros”, porque não passam por qualquer tipo de industrialização.

Dentre estes produtos, pode-se destacar o mercado ilegal de leite cru, onde se acredita que mais da metade do leite consumido no Brasil seja desprovido de qualquer tipo de inspeção ou controle de qualidade, deixando claro o grande risco ao qual a população que utiliza este produto está exposta.

Quando se pesquisa a microbiota encontrada no leite é possível dividir os microrganismos encontrados em dois grupos. Aqueles que são originários de contaminação ambiental e aqueles oriundos de processos de mastite. Dentro destes dois grupos os principais microrganismos encontrados são os *Staphylococcus* spp. e as *Klebsiella* spp.

Através das informações onde se relata que os microrganismos responsáveis pelo maior número de casos de mastites subclínica, é o *Staphylococcus aureus* e que o responsável pelo maior número de casos de mastites clínica é a *Klebsiella pneumoniae*, foi analisado neste trabalho, se existe alguma forma de interação entre os *Staphylococcus aureus* e as *Klebsiella pneumoniae* que possam causar algum tipo de supressão ou alteração no crescimento de um ou de ambos os microrganismos quando inseridos em um mesmo meio de cultura, o leite integral estéril, e oferecido-lhes as mesmas condições de crescimento e se o processo de pasteurização lenta seria eficaz na destruição destes microrganismos.

Foto 1 - Leite em temperatura ambiente de 30 °C na cidade de Dublin – República da Irlanda, Julho de 2006

Foto 2 - Foto mais aproximada de leite em temperatura ambiente de 30 °C na cidade de Dublin – República da Irlanda, Julho de 2006

2 REVISÃO DE LITERATURA

Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA, artigo 475, “entende-se por leite, sem outras especificações, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas” (BRASIL, 1997).

Do ponto de vista biológico o leite pode ser considerado um dos alimentos mais completos por apresentar, entre outras características, alto teor de proteínas e sais minerais. Porém, também é considerado excelente meio de cultura, podendo ser facilmente contaminado por muitos grupos de microrganismos que encontram ótimas condições para multiplicação (ZOCHE et al., 2002). Alguns desses microrganismos podem estar presentes no momento em que o leite é ordenhado. Outros são incorporados ou pelo ordenhador, utensílios mal higienizados ou mesmo pelo meio ambiente (MENDONÇA et al., 2005).

A obtenção de leite de boa qualidade depende de vários fatores como o estado sanitário do rebanho, as propriedades genéticas dos animais, a higiene do local, a qualidade da água utilizada na propriedade, as condições de exploração, o clima, as instalações, a alimentação, a mão-de-obra, as políticas comerciais e a sanidade do rebanho (AMARAL et al., 2003).

Embora o Brasil seja o sexto produtor de leite do mundo e a taxa de crescimento aumente 4% ao ano (EMBRAPA, 2003), todos os fatores acima mencionados, influenciam diretamente na receita final do produtor.

Comparando-se a produção leiteira brasileira com a mundial, em relação à quantidade e a qualidade do leite produzido por animal, é fácil observar que muitas medidas ainda devem ser tomadas para que esta atividade seja mais lucrativa e produtiva (VOLTOLINI et al., 2001).

Um dos maiores problemas dos produtores de leite é a mastite, uma enfermidade da glândula mamária que se caracteriza por processo inflamatório, quase sempre decorrente da presença de microrganismos infecciosos, interferindo diretamente na função do órgão, uma vez que uma vaca com mastite tem sua

produtividade de leite diminuída, podendo chegar a níveis de perda entre 15 a 20% em relação à produção láctea normal (INTERVET, 2005).

Segundo Voltolini et al. (2001), a mastite é considerada a doença que mais onera a produção de leite, acarretando graves prejuízos econômicos aos produtores e à indústria leiteira, entretanto, muitos produtores ainda não se preocupam com este problema, talvez por não saberem das perdas decorrentes dessa enfermidade, um dos motivos da altíssima incidência da doença no rebanho brasileiro.

Além dos prejuízos contabilizados pela redução na produção, descarte do leite de vacas em tratamento, custos com medicamentos, gastos com assistência técnica e reposição de vacas e do tempo extra, perdido no manejo e na aplicação de medicamentos (VOLTOLINI et al., 2001), as mastites depreciam a qualidade nutritiva do leite, com a diminuição dos teores de açúcares, proteínas e minerais como a lactose, caseína, gordura, cálcio, fósforo e aumento significativo de imunoglobulinas, cloretos e lipases, tornando o produto inadequado para ser consumido ou utilizado para fabricação de seus derivados como iogurtes e queijos, sem considerar os prejuízos causados pela condenação do leite na plataforma das usinas (INTERVET, 2005).

Segundo Barbalho e Mota (2001), os principais microrganismos causadores de mastite bovina podem ser divididos em cinco grupos: cocos Gram-positivos, bactérias Gram-negativas, corinebactérias e *Actinomyces*, *Mycoplasma* e outros como *Nocardia spp.*, *Prototheca spp.* e leveduras; entretanto os cocos Gram-positivos constituem o principal grupo, responsável por mais de 90% das ocorrências, sendo o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* as espécies mais frequentes.

De acordo com Voltolini et al. (2001), os microrganismos dos cinco grupos acima descritos, podem ser divididos em dois grupos, ou seja, aqueles que provocam a mastite infecciosa, normalmente, com sintomatologia subclínica e são isolados no úbere, podendo ser transmitidos para outras vacas no momento da ordenha, e aqueles que são isolados do meio ambiente infectando a vaca antes ou após a ordenha, normalmente produz mastite com sintomatologia clínica.

De acordo com Reis, Silva e Brescia et al. (2003), a denominação de mastite subclínica é utilizada quando não há alterações visíveis na glândula mamária, porém

o leite apresenta alta contagem de células somáticas (CCS), o que caracteriza uma inflamação na glândula mamária. Normalmente, este tipo de mastite tem como agente(s) etiológico(s) os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase-negativo, *Bacillus spp.*, *Corynebacterium bovis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

Enquanto que Ribeiro et al. (2003), classificam a mastite como clínica quando é possível observar alterações na glândula mamária tais como: edema, endurecimento, dor, grumos, pus, ou qualquer alteração das características do leite. As mastites clínicas normalmente são causadas por bactérias provenientes de contaminação ambiental, e normalmente são causadas por *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sp* dentre outros (INTERVET, 2005).

De acordo com Zia et al. (1987), as enterobactérias causam mastite com forte sintomatologia clínica, pois produzem enterotoxinas que induzem a severa reação inflamatória nas glândulas mamárias.

De acordo com Salasia et al. (2004) e Wilson, Gonçalves e Das et al. (1997), os estafilococos, principalmente o *Staphylococcus aureus* são mundialmente reconhecidos como os maiores patógenos causadores de mastite, principalmente a subclínica, em rebanhos leiteiros provocando a perda de milhões de dólares por ano (aproximadamente \$170,00 por animal em cada lactação).

De acordo com Barbalho e Mota (2001), o gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococaceae*, são cocos Gram-positivos, catalase positivos, que tendem a formar agrupamentos semelhantes a cachos de uva (Fotos 3 e 4). São amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas de mamíferos e aves. Tradicionalmente são divididos em duas categorias: coagulase positivos e coagulase negativos (MENDONÇA et al., 2005). Essa divisão é baseada na capacidade de coagular o plasma, que é uma propriedade considerada como importante marcador de patogenicidade dos estafilococos (MARTINS, 1999).

Fonte: SOUTO, L. I. M. (2006)

Foto 3 - Microscopia óptica de *Staphylococcus* spp

Fonte: SOUTO, L. I. M. (2006)

Foto 4 - Semeadura em placa de *Staphylococcus* spp. em meio de cultura de ágar sangue

Quanto à patogenicidade, os estafilococos, principalmente o *Staphylococcus aureus*, é o agente mais frequentemente isolado de infecções piogênicas. Estas infecções podem se localizar na pele ou em regiões mais profundas, como a glândula mamária. Além de infecções piogênicas, este agente pode causar vários tipos de intoxicações, seja na vigência de um processo infeccioso ou não (MARTINS, 1999).

Segundo Silva e Gandra (2004), além de infecções, o *Staphylococcus aureus*, é a espécie mais relacionada a casos de surtos de intoxicação alimentar, devido à capacidade da maioria de suas cepas produzirem enterotoxinas. Estas toxinas são proteínas extracelulares, com baixo peso molecular, hidrosolúveis e possuem uma característica de extrema relevância; são termoestáveis, sendo capazes de resistir a processos térmicos como a pasteurização e a ultra pasteurização.

Quando ocorre a intoxicação, os sintomas aparecem, em média, após 4 horas da ingestão do alimento contaminado e é caracterizado por vômitos, náuseas, diarreia, contrações abdominais e dores de cabeça muito fortes. Geralmente duram entre 24 e 48 horas e o índice de mortalidade da doença não é alto (SILVA et al., 2000).

Como descreveram Amaral et al. (2003) os maus hábitos na ordenha e no processamento do leite, levam contaminações ao produto como material fecal ou microrganismos que podendo causar danos à saúde do consumidor quando ingerirem o alimento contaminado.

Segundo Jasper, Dellinger e Bushnell et al. (1975), o acompanhamento veterinário com a intenção de diminuir a incidência de mastites nos rebanhos e a utilização de programas de pré-dipping e pós-dipping tem diminuído consideravelmente, os problemas com *Staphylococcus* spp. e com *Streptococcus agalactiae*, mas, não tem efeito significativo quanto à prevenção da contaminação por *Streptococcus uberis* e por coliformes. Além do que, de acordo com o autor, rebanhos leiteiros relativamente livres dos *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus agalactiae* tendem a ser, mais susceptíveis as infecções por coliformes.

Quando se pesquisa mastites provocadas por coliformes (28% dos casos), observa-se, que em aproximadamente 52% dos casos podem ser isolados *Klebsiellas pneumoniae*, sendo que normalmente, os animais com este padrão de mastite são daqueles rebanhos onde a higienização da cama e das instalações da propriedade é precária. Isso acontece, pois, ao contrário do que ocorre com a

maioria dos estreptococos e dos estafilococos, onde o maior índice de transmissão da infecção é entre os animais do rebanho, os coliformes alcançam os animais através do contato com contaminações do próprio meio ambiente (JASPER, DELLINGER; BUSHNELL et al., 1975).

Segundo Trabulsi e Campos (1999) as *Klebsiellas spp.* pertencem à família das enterobactérias, são bacilos Gram-negativos, encontrados amplamente na natureza, como habitantes dos intestinos do homem e dos animais, como membros da microbiota normal ou como agentes de infecção (Fotos 5 e 6).

Fonte: FREITAS, G. D. (2007)

Foto 5 - Microscopia óptica de *Klebsiella pneumoniae*

Fonte: FREITAS, G. D. (2007)

Foto 6 - Semeadura em placa de *Klebsiella pneumoniae*. em meio de cultura PCA

De acordo com Nonnecke e Newbould (1984), as bactérias do gênero *Klebsiella*, causam mastites nos animais com diferentes graus de gravidade, sendo que, grandes números desses microrganismos estão envolvidos com problemas nas glândulas mamárias, principalmente naqueles rebanhos onde se utiliza serragem ou lascas de madeira como cama para os animais.

Kikuchi et al. (1995), relatam que os animais que desenvolvem mastite tendo a *K. pneumoniae* como agente etiológico, normalmente estão com baixa imunidade, o que facilita para que o prognóstico de recuperação nesses casos seja desfavorável, ou com grande chance de perda da habilidade de produzir leite na glândula mamária afetada.

A quantidade e as espécies de microrganismos presentes no leite cru, imediatamente após a ordenha refletem diretamente a contaminação microbiana ocorrida durante a produção. Quando o leite deixa a fazenda, a sua microbiota é determinada pela relação tempo/temperatura na qual ele foi mantido e estocado. Quando o leite é mantido a 4°C ou menos, previne-se a multiplicação bacteriana por 24h (ROBINSON, 1989).

A temperatura constitui um dos principais parâmetros responsáveis pelo controle do crescimento e da velocidade de multiplicação microbiana. A temperatura exerce ação seletiva sobre os microrganismos do alimento, retardando o seu crescimento se for suficientemente baixa. Para se manter a qualidade do leite após a ordenha, deve-se tomar uma série de cuidados, como proceder à pasteurização, por exemplo (BEHMER, 1991).

Segundo Alterthum e Carvalhal (1999) o método mais empregado para matar microrganismos é o calor, por ser eficaz, barato e prático. Do ponto de vista microbiológico são considerados mortos quando perdem, de forma irreversível, a capacidade de se multiplicar.

De acordo com Behmer (1991), as fases para o tratamento do leite após a ordenha são:

- . **Filtração:** tem como finalidade eliminar as impurezas grosseiras, que eventualmente possam cair no leite.

- . **Resfriamento:** o leite ordenhado possui a temperatura do animal, ou seja, aproximadamente 35°C, temperatura ideal para que grande parte dos microrganismos possa se multiplicar. A função do resfriamento até 4°C é retardar a multiplicação microbiana, prolongando o tempo de vida do produto. O leite cru

resfriado não deve ser armazenado por mais de 24 horas, pois existem microrganismos que se desenvolvem em baixas temperaturas.

. **Tratamento térmico:** os mais utilizados são a fervura e a pasteurização. Louis Pasteur, em 1864, desenvolveu um método de prevenção da perda da qualidade dos vinhos, destruindo pelo calor bactérias capazes de deteriorar esta bebida. Tal método, posteriormente, foi aplicado ao tratamento do leite para eliminar possíveis patógenos veiculados por este alimento, o qual recebeu o nome de pasteurização.

No Brasil pode ser empregada a pasteurização de curta duração, que consiste no aquecimento do leite a 72-75°C por 15 a 20 segundo, e pasteurização lenta, a qual consiste no aquecimento do leite a 62-65°C por 30 minutos. Imediatamente após o aquecimento em ambos os procedimentos o leite deve ser resfriado entre 2 a 5°C (BRASIL, 1980).

Assim como relata Alterthum e Carvalhal (1999) a pasteurização destrói as bactérias patogênicas, eventualmente transmissíveis pelo leite e reduz o número de todos os microrganismos presentes.

Através das informações onde se relata que os microrganismos responsáveis pelo maior número de intoxicações alimentares e casos de mastites subclínica, é o *Staphylococcus aureus* e que o responsável pelo maior número de casos de mastites clínica é a *Klebsiella pneumoniae*, foi analisado neste trabalho, se existe alguma forma de interação entre os *Staphylococcus spp.* e as *Klebsiellas pneumoniae* que possam causar algum tipo de supressão ou alteração no crescimento de um ou de ambos os microrganismos quando inseridos em um mesmo meio de cultura, o leite integral estéril, e oferecido-lhes as mesmas condições de crescimento e se o processo de pasteurização lenta é eficaz na destruição destes microrganismos.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a interatividade entre *Staphylococcus* spp e *Klebsiella pneumoniae*, isolados de leite mastítico e de tanques de resfriamento, quando analisados os mecanismos de interferência, na multiplicação de cada microrganismos separadamente e juntos, para avaliar a “inibição” ou “interferência” de crescimento por parte das espécies envolvidas, quando cultivadas, num mesmo meio de cultura, o leite integral estéril, em três diferentes temperaturas; 6°C (temperatura de refrigeração), 25°C (temperatura ambiente) e 36°C (temperatura ideal de crescimento dos microrganismos em estudo).

Avaliar o efeito da pasteurização lenta nas colônias de *Staphylococcus* e *Klebsiella pneumoniae*, quando submetidas ao processo isoladamente e em associação.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- . Identificar o número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Staphylococcus* spp., quando cultivadas isoladamente, em leite estéril, em três diferentes temperaturas (6°C, 25°C e 37°C).
- . Identificar o número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Klebsiella pneumoniae*, quando cultivadas isoladamente, em leite estéril, em três diferentes temperaturas (6°C, 25°C e 37°C).
- . Identificar o número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Staphylococcus* spp., e de *Klebsiella pneumoniae* quando cultivadas juntas, em leite integral estéril, em três diferentes temperaturas (6°C, 25°C e 37°C).
- . Descrever a curva de morte térmica das cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus* spp. quando submetidas ao processo de pasteurização lenta.

. Descrever se há diferença na curva de morte térmica quando os microrganismos são pasteurizados isolados ou em associação.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi realizado no laboratório de doenças infecciosas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no período de agosto de 2005 a dezembro de 2007.

Os microrganismos utilizados foram: *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus* spp., isolados de amostras de leite de tanque de refrigeração de propriedades de exploração de leite cru, tipo 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 Placa de Petri e incubados a 36°C, e a leitura realizada 24 horas após a semeadura. As colônias selecionadas foram coradas pelo método de Gram, para diferenciar as bactérias em Gram negativas (*Klebsiella* spp.) das Gram positivas (*Staphylococcus* spp.).

Para os microrganismos já previamente isolados e identificados, foram preparadas duas suspensões na Escala Mac Farland (suspensão de sulfato de bário, escala 1,0) sendo a primeira com uma linhagem de *Klebsiella pneumoniae* (Figura 1) e a segunda com estirpe de *Staphylococcus* spp. (Figura 2).

A partir destas amostras, foi colhida uma alíquota de 0,5 mL da solução de *Klebsiella pneumoniae* e 0,5 mL da solução de *Staphylococcus* spp., que foram adicionadas respectivamente em tubos de ensaios contendo 4,5 mL de leite integral estéril cada um (Figuras 1 e 2). Em outro tubo de ensaio contendo 4 mL de leite integral estéril, foi adicionado 0,5 mL da suspensão de *Klebsiella pneumoniae* e 0,5 mL da solução de *Staphylococcus* spp. (Figura 3). Todos os tubos foram armazenados, por 24 horas, em três temperaturas diferentes, 6°C, 25°C e 36°C. Foi realizada após 24 horas a diluição, até 10^{-9} das soluções de *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus* spp. e *Klebsiella pneumoniae* + *Staphylococcus* spp. Uma alíquota de 0,1 mL foi colhida de cada diluição para cultivo (utilizando-se a técnica de spread plate ou, espalhamento em placas), em ágar para contagem padrão (PCA - Plate Count Agar) e Mac Conkey (quando cultivadas amostras de *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus* spp em associação), com incubação a 36°C por um período de 24 horas, e após este período foram contadas as UFC/mL. Este processo foi realizado 14 vezes.

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 e o resultado anotado.

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

4.1 PASTEURIZAÇÃO

Para os microrganismos já previamente isolados e identificados, foram preparadas duas suspensões na Escala Mac Farland 1 sendo a primeira com uma linhagem de *Klebsiella pneumoniae* e a segunda com estirpe de *Staphylococcus* spp. A partir destas amostras, foram colhidas alíquotas de 1 mL da solução de *Klebsiella pneumoniae* e 1 mL da solução de *Staphylococcus* spp., que foram adicionadas respectivamente em 6 tubos de ensaios contendo 9 mL de leite integral estéril cada um; em outros 6 tubos de ensaio foram adicionados 1 mL de *Klebsiella pneumoniae* e 1 mL *Staphylococcus* spp. em 8 mL de leite integral estéril. Estes processos foram repetidos 7, 9 e 10 vezes respectivamente, de acordo com a disponibilidade de Unidades Formadoras de Colônias, viáveis, de cada microrganismo.

Com o intuito de agilizar o processo de aquecimento do leite e mimetizar o processo natural de pasteurização lenta feita em tanques, foi realizada uma etapa de pré-aquecimento dos tubos em banho-maria a 85°C até que fosse atingida a temperatura de 65°C.

Ao atingir a temperatura de 65°C, retirou-se para análise a sub-amostra 0 (zero), que foi colocada em banho de gelo e o restante das sub-amostras foram transferidas ao banho-maria a 65°C, para manutenção da temperatura, iniciando-se a contagem do tempo de pasteurização.

A sub-amostra 0 (zero) foi utilizada para avaliar esta etapa de aquecimento do leite, até que atingisse a temperatura desejada de 65°C (Figura 4).

Alcançando-se o tempo desejado de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos, os respectivos tubos eram retirados do banho-maria e colocados em um banho de gelo para cessar o efeito térmico sobre as células. A cada temperatura, uma

alíquota de 0,1 mL foi semeada ao meio de cultura PCA, utilizando a técnica de spread plate ou espalhamento em placa (Figura 5).

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

4.1.1 Controle do processo de pasteurização

Foram colocados no banho-maria mais 4 tubos com leite integral não inoculado, e com o mesmo volume de leite das sub-amostras, desde o aquecimento até o fim do tratamento térmico. Em um desses tubos foi colocado um termômetro, com o intuito de controlar a temperatura, tomando-se o cuidado para que o bulbo do termômetro não entrasse em contato com as paredes do tubo. Os outros tubos foram empregados para pesquisa das enzimas fosfatase alcalina (1 tubo) e peroxidase (2 tubos) (BRASIL, 1981).

Para as análises estatísticas foram utilizados os softwares Graphpad Instat, Epiinfo 6.04d, Microsoft Office® versão 2003 e SPSS 9.0. O teste estatístico utilizado foi Kruskal Wallis, Intervalo de Confiança de 95%, com nível de significância (valor de $p < 0,05$) e foi realizada análises para ajuste de função (Quadrática, Cúbica, Linear).

4.1.2 Fosfatase Alcalina

Após o tratamento térmico, utilizou-se o teste colorimétrico da Laborclin para determinação qualitativa da enzima fosfatase alcalina no leite. É um teste que consiste na mistura 2 mL de amostra de leite para 1 mL de reagente e posterior incubação em banho-maria a 37°C por 10 minutos. A presença de fosfatase alcalina é caracterizada pela coloração amarela na mistura.

4.1.3 Peroxidase

A verificação qualitativa da enzima peroxidase foi realizada seguindo-se os procedimentos recomendados pelos Métodos Analíticos para o controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes - Métodos Físico-Químicos, do Laboratório Nacional de Referência Animal - LANARA (BRASIL, 1981).

Figura 1 - Diluição da amostra de *Klebsiella pneumoniae* até 10^{-9} e plaqueamento em duplicata

Figura 2 - Diluição da amostra de *Staphylococcus* spp. até 10^{-9} e plaqueamento em duplicata

Figura 3 - Diluição da amostra de *Staphylococcus* spp. + *Klebsiella pneumoniae* até 10^{-9} e plaqueamento em duplicata

Figura 4 - Pasteurização, diluição e semeadura das sub-amostras

Figura 5 - Pasteurização, diluição e semeadura das sub-amostras

5 RESULTADOS

Na tabela 1, descreve-se a média, mediana, valor mínimo e máximo encontrados na escala 1 de Mac Farland, utilizada para inocular *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus* spp. nas amostras de leite integral estéril para estudar o crescimento de unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus* spp. e *Klebsiella pneumoniae*, isoladas de tanque de refrigeração de leite e o efeito da pasteurização lenta nestes microrganismos, em culturas puras e em associação.

A média de UFC/mL nas cepas de *Klebsiella pneumoniae* foi de 121,96, a mediana encontrada 107 e o valores mínimo e máximo foi 56 e 235, UFC/mL respectivamente (Tabela 1).

A média de UFC/mL para *Staphylococcus* spp. 79,288, com mediana de 66,25 e valores mínimo e máximo de 9,5 e 182,5 UFC/mL respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Média, mediana e valores mínimos e máximos do número de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro da Escala 1 de Mac Farland - São Paulo - 2006/2007

Microrganismo	Unidades Formadoras de Colônias			
	Média ¹	Mediana ²	Mínimo ³	Máximo ⁴
<i>Klebsiella pneumonie</i>	121.96	107	56	235.5
<i>Staphylococcus</i> spp.	79.288	66.25	9.5	182.5

1: Indica o valor da média da contagem de UFC

2: Indica o valor da mediana da contagem de UFC

3: Indica menor valor da contagem de UFC em pelo menos uma amostra

4: Indica maior valor da contagem de UFC em pelo menos uma amostra

De acordo com os resultados da tabela 2 e com a aplicação do teste não paramétrico de Kruskal Wallis, há resultados estatisticamente significativos quando se analisa *K. pneumoniae* associada ao *Staphylococcus spp.* entre as temperaturas de 6°C e 25°C e entre 6°C e 36°C, nestes valores há maior crescimento de *K. pneumoniae* quanto maior a temperatura de incubação das colônias.

Quando se analisa *Staphylococcus spp.* associado a *K. pneumoniae* não é observado diferença no crescimento bacteriano nas três diferentes temperaturas (Tabela 2).

Quando se compara a interação entre as bactérias a 6°C não verificou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre o crescimento das linhagens, ou seja, houve crescimento igual de UFC entre as bactérias isoladas e em associação a 6°C (Tabela 2).

A 25°C observou-se diferença estatisticamente significativa entre o crescimento de (Tabela 2):

- *Klebsiella pneumoniae* isolada cresce mais que o *Staphylococcus spp.* isolado;
- *Staphylococcus spp.* isolado cresce mais que este associado a *K. pneumoniae*;

Na temperatura de 36 °C encontra-se diferença entre (Tabela 2):

- *K. pneumoniae* associada ao *Staphylococcus spp.* cresce mais e *Staphylococcus spp.* isolado;
- *Staphylococcus spp.* associado a *K. pneumoniae* cresce mais que *Staphylococcus spp* isolado.

Em todas as temperaturas a *K. pneumoniae* isolada ou em associação cresce mais que *Staphylococcus spp* isolado ou em associação (Tabela 2).

Tabela 2 - Mediana e valores mínimo e máximo na contagem de Unidades Formadoras de Colônias de *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus* spp. isolados e em associação - São Paulo - 2006/2007

Temperatura	Microrganismos e associações	Mediana	Mínimo	Máximo
7 °C	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.004575	0.001025	0.008575
	<i>Staphylococcus</i> spp	0.003488	0	0.01280
	<i>K. pneumoniae</i> associada ao <i>Staphylococcus</i> spp.	0.008113	0.0012	0.03393
	<i>Staphylococcus</i> spp. associado a <i>K. pneumoniae</i>	0.001050	0	0.01395
25 °C	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	46.5	4.5	64.5
	<i>Staphylococcus</i> spp	6.625	0	16
	<i>K. pneumoniae</i> associada ao <i>Staphylococcus</i> spp.	25	7.25	130
	<i>Staphylococcus</i> spp. associado a <i>K. pneumoniae</i>	0	0	4
36 °C	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	67	16.5	89
	<i>Staphylococcus</i> spp	20.5	6	114.75
	<i>K. pneumoniae</i> associada ao <i>Staphylococcus</i> spp.	35	7.5	163.5
	<i>Staphylococcus</i> spp. associado a <i>K. pneumoniae</i>	0	0	18.75

1: Indica o valor da média da contagem de UFC

2: Indica o menor valor da contagem de UFC em pelo menos uma amostra

3: Indica o maior valor da contagem de UFC em pelo menos uma amostra

De acordo com os resultados da tabela 3, quando as linhagens de *Klebsiella pneumoniae*, semeadas em associação com cepas de *Staphylococcus* spp., desenvolvem-se em meio de cultura Mac Conkey, a mediana de crescimento foi de 0,00305 UFC/mL, mínimo de 0 UFC/mL e máximo de 0,01083 UFC/mL.

Quando as mesmas estirpes são semeadas em meio PCA, em associação com cepas de *Staphylococcus* spp., a mediana de crescimento foi de 0,008113 UFC/mL, mínimo de 0,0012 UFC/mL e máximo de 0,03393 UFC/mL. Entretanto quando as mesmas cepas são semeadas, isoladamente em meio de cultura PCA, a mediana de crescimento foi de 0,004575 UFC/mL, mínimo de 0,001025 UFC/mL e máximo de 0,008575 UFC/mL (Tabela 3).

A 6°C não há diferença entre o crescimento de UFC de *K. pneumoniae* isolada ou em associação com *Staphylococcus* spp., como pode ser visto na tabela 3 em ambos os meios utilizados ($p=0,209$).

Tabela 3 - Crescimento de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Klebsiella pneumoniae* isolada e em associação com *Staphylococcus* spp. em meio de cultura Mac Conkey e PCA na temperatura de crescimento de 6 °C/ 24h - São Paulo - 2006/2007

Meio de Cultura	Mediana ¹	Mínimo ²	Máximo ³
Mac Conkey	0.00305	0	0.01083
PCA	0.008113	0.0012	0.03393
<i>(K. pneumoniae + Staphylococcus spp.)</i>			
PCA isolada	0.004575	0.001025	0.008575

1: Indica o valor da mediana da contagem de UFC

2: Indica o menor valor da contagem de UFC em pelo menos uma amostra

3: Indica o maior valor da contagem de UFC em pelo menos uma amostra

Na temperatura de crescimento de 25 °C quando as cepas de *Klebsiella pneumoniae*, semeadas em associação com cepas de *Staphylococcus* spp., desenvolvem-se em meio de cultura Mac Conkey, a mediana de crescimento foi de 26,625 UFC/mL, mínimo de 10,25 UFC/mL e máximo de 91 UFC/mL (Tabela 4).

Quando as mesmas cepas são semeadas em meio PCA, em associação com cepas de *Staphylococcus* spp., a mediana de crescimento foi de 25 UFC/ mL, mínimo de 7,25 UFC/ mL e máximo de 130 UFC/ mL. Entretanto quando as mesmas cepas são semeadas, isoladamente em meio de cultura PCA, a mediana de crescimento foi de 46,5 UFC/mL, mínimo de 4,5 UFC/mL e máximo de 64,5 UFC/mL (Tabela 4).

A 25°C não há diferença entre o crescimento de UFC de *K. pneumoniae* isolada ou em associação com *Staphylococcus* spp., como pode ser visto na tabela 4, em ambos os meios utilizados ($p=0,64$).

Tabela 4 - Crescimento de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Klebsiella pneumoniae* isolada e em associação com *Staphylococcus* spp. em meio de cultura Mac Conkey e PCA na temperatura de crescimento de 25 °C/ 24h - São Paulo - 2006/2007

Meio de Cultura	Mediana ¹	Mínimo ²	Máximo ³
Mac Conkey	26,625	10,25	91
PCA	25	7,25	130
<i>(K. pneumoniae + Staphylococcus spp.)</i>			
PCA isolada	46,5	4,5	64,5

1: Indica o valor da mediana da contagem de UFC

2: Indica o menor valor da contagem de UFC em pelo menos uma amostra

3: Indica o maior valor da contagem de UFC em pelo menos uma amostra

Quando os microrganismos ficaram expostos à temperatura de crescimento de 36°C, as cepas de *Klebsiella pneumoniae* semeadas em associação com cepas de *Staphylococcus* spp., em meio de cultura Mac Conkey, a mediana de crescimento foi de 20,25 UFC/mL, mínimo de 5,5 UFC/mL e máximo de 123,75 UFC/mL (Tabela 5).

Quando as mesmas cepas foram semeadas em meio PCA, em associação com cepas de *Staphylococcus* spp., a mediana de crescimento foi de 35 UFC/mL, mínimo de 7,5 UFC/mL e máximo de 163,5 UFC/mL (Tabela 5).

Entretanto quando as mesmas cepas são semeadas, isoladamente em meio de cultura PCA, a mediana de crescimento foi de 67 UFC/mL, mínimo de 16,5 UFC/mL e máximo de 89 UFC/mL (Tabela 5).

Quando se comparou o crescimento das cepas de *Klebsiella pneumoniae* no meio de cultura PCA semeadas isoladamente e em associação com cepas de *Staphylococcus* spp., como pode ser observado na tabela 5, o valor de p foi de 0,0109 considerado estatisticamente significativo, ou seja, a 36 °C, no meio de cultura PCA, a *K. pneumoniae* isolada cresce mais que a mesma cepa semeada em meio de cultura Mac Conkey.

Tabela 5 - Crescimento de Unidades Formadoras de Colônias de cepas de *Klebsiella pneumoniae* isolada e em associação com *Staphylococcus* spp. em meio de cultura Mac Conkey e PCA na temperatura de crescimento de 36 °C/ 24hn- São Paulo - 2006/2007

Meio de Cultura	Mediana ¹	Mínimo ²	Máximo ³
Mac Conkey	20,25	5,5	123,75
PCA			
(<i>K. pneumoniae</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.)	35	7,5	163,5
PCA isolada	67	16,5	89

1: Indica o valor da mediana da contagem de UFC

2: Indica o menor valor da contagem de UFC em pelo menos uma amostra

3: Indica o maior valor da contagem de UFC em pelo menos uma amostra

5.1 RESULTADOS DA PASTEURIZAÇÃO LENTA

Na tabela 6, está descrito o tempo de pasteurização de 0 (zero) a 30 minutos (intervalo a cada 5 minutos), com as respectivas médias de cada tempo de pasteurização, mediana, mínimo e máximo.

No início do processo de pasteurização (**0 Minuto**), a média, mediana, mínimo e máximo encontrados de foram de 250 UFC/mL, com desvio padrão igual a zero; após **5 minutos** de pasteurização a média foi de 10,43 UFC/mL com desvio padrão de 14,58, mediana 5, mínimo 1 e máximo 41 UFC/mL; após **10 minutos** de pasteurização a média foi de 2,86 UFC/mL com desvio padrão de 4,22, mediana 1, mínimo 0 e máximo 12 UFC/mL; após **15 minutos** de pasteurização a média foi de 2,7 UFC/mL com desvio padrão de 5,53, mediana e mínimo 0 e máximo 15 UFC/mL; após **20 minutos** de pasteurização a média foi de 1,14 UFC/mL com desvio padrão de 3,02, mediana e mínimo 0 e máximo 8 UFC/mL; após **25 minutos** de pasteurização a média, desvio padrão, mediana, mínimo, e máximo foi de 0 UFC/mL; após **30 minutos** de pasteurização a média foi de 0,14 UFC/mL com desvio padrão de 0,19, mediana e mínimo 0 e máximo 1 UFC/mL (Tabela 6).

Tabela 6 - Média, mediana e valores mínimo e máximo do processo de pasteurização lenta, demonstrando a curva de morte térmica a cada cinco minutos (0 a 30 minutos), para *Klebsiella pneumoniae* isolada - São Paulo - 2006/2007

Pasteurização lenta - <i>K. Pneumoniae</i> ISOLADA – Tempo (min) /UFC				
Tempo (minuto)	Média/ (DP) ¹	Mediana ²	Mínimo ³	Máximo ⁴
0 (zero)	250 (± 0)	250	250	250
5	10,43 (± 14,58)	5	1	41
10	2,86 (± 4,22)	1	0	12
15	2,7 (± 5,53)	0	0	15
20	1,14 (± 3,02)	0	0	8
25	0 (± 0)	0	0	0
30	0,14 (± 0,19)	0	0	1

* DP= ± Desvio Padrão

1: Indica o valor da média da contagem de UFC

2: Indica o valor da mediana da contagem de UFC

3: Indica menor valor da contagem de UFC em pelo menos uma amostra

4: Indica maior valor da contagem de UFC em pelo menos uma amostra

Na tabela 7 , está descrito o tempo de pasteurização de 0 (zero) a 30 minutos (intervalo a cada 5 minutos), com as respectivas médias de cada tempo de pasteurização, mediana, mínimo e máximo.

No início do processo de pasteurização (0 Minuto), a média, mediana, mínimo e máximo encontrados de foi de 250 UFC/mL, com desvio padrão igual a zero; após 5 minutos de pasteurização a média foi de 64,2 UFC/mL com desvio padrão de 100,66, mediana 15,5, mínimo 1 e máximo 250 UFC/mL; após 10 minutos de pasteurização a média foi de 8,2 UFC/mL com desvio padrão de 11,03, mediana 5, mínimo 0 e máximo 37 UFC/mL; após 15 minutos de pasteurização a média foi de 36,2 UFC/mL com desvio padrão de 77,65, mediana 1,5, mínimo 0 e máximo 250 UFC/mL; após 20 minutos de pasteurização a média foi de 26 UFC/mL com desvio padrão de 44,42, mediana 1,5, mínimo 0 e máximo 139 UFC/mL; após 25 minutos de pasteurização a média foi de 9,8 UFC/mL, desvio padrão de 22,41, mediana 1,5, mínimo 0, e máximo de 73 UFC/mL; após 30 minutos de pasteurização a média foi de 7,2 UFC/mL com desvio padrão de 6,78, mediana 4, mínimo 0 e máximo 21 UFC/mL (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados da média, mediana e valores mínimo e máximo do processo de pasteurização lenta, demonstrando a curva de morte térmica a cada cinco minutos (0 a 30 minutos), para *Staphylococcus* spp. isolado - São Paulo - 2006/2007

Pasteurização lenta - <i>Staphylococcus</i> spp. ISOLADO				
Tempo (minuto)	Média/ (DP) ¹	Mediana ²	Mínimo ³	Máximo ⁴
0 (zero)	250 (± 0)	250	250	250
5	64,2 (± 100,66)	15,5	1	250
10	8,2 (± 11,03)	5	0	37
15	36,2 (± 77,65)	1,5	0	250
20	26 (± 44,42)	1,5	0	139
25	9,8 (± 22,41)	1,5	0	73
30	7,2 (± 6,78)	4	0	21

* DP= ± Desvio Padrão

1: Indica o valor da média da contagem de UFC

2: Indica o valor da mediana da contagem de UFC

3: Indica menor valor da contagem de UFC em pelo menos uma amostra

4: Indica maior valor da contagem de UFC em pelo menos uma amostra

Está representada no gráfico 1, a curva de morte térmica durante o processo de pasteurização lenta quando as cepas de *Staphylococcus* spp. e *Klebsiella pneumoniae* foram pasteurizadas isoladamente .

A curva azul demonstra o processo nas cepas de *Staphylococcus* spp., no início do processo (**0 minuto**) há 250 UFC/ mL, após **5 minutos** de pasteurização a 65°C o número de UFC/mL passa para 64,2, após **10 minutos** para 8,2, após **15 minutos** para 36,2, após **20 minutos** para 26, após **25 minutos** para 9,8 e após **30 minutos** de pasteurização foram contadas 7,2 UFC/mL (Gráfico 1).

A curva rosa demonstra o processo nas cepas de *Klebsiella pneumoniae*, no início do processo (**0 minuto**) há 250 UFC/ mL, após **5 minutos** de pasteurização a 65°C o número de UFC/mL passa para 10,43, após **10 minutos** para 2,86, após **15 minutos** para 2,7, após **20 minutos** para 1,14, após **25 minutos** para 0 e após **30 minutos** de pasteurização foram contadas 0,14 UFC/mL (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Curva de Morte térmica da média de Unidades Formadoras de Colônia (UFC), durante o processo de pasteurização lenta para *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus spp.* pasteurizados isoladamente

Na tabela 8, está descrito o tempo de pasteurização de 0 (zero) a 30 minutos (intervalo a cada 5 minutos), com as respectivas médias de cada tempo de pasteurização, mediana, mínimo e máximo.

No início do processo de pasteurização (**0 Minuto**), a média, mediana, mínimo e máximo encontrados de foi de 250 UFC/mL, com desvio padrão igual a zero; após **5 minutos** de pasteurização a média foi de 37,3 UFC/mL com desvio padrão de 24,37, mediana 35, mínimo 3 e máximo 80 UFC/mL; após **10 minutos** de pasteurização a média foi de 62,4 UFC/mL com desvio padrão de 72, mediana 46,5, mínimo 3 e máximo 250 UFC/mL; após **15 minutos** de pasteurização a média foi de 112,8 UFC/mL com desvio padrão de 89,33, mediana 76, mínimo 28 e máximo 250 UFC/mL; após **20 minutos** de pasteurização a média foi de 110,8 UFC/mL com desvio padrão de 83,06, mediana 127,5, mínimo 2 e máximo 250 UFC/mL; após **25 minutos** de pasteurização a média de 51,1 UFC/mL, desvio padrão de 60,2, mediana 15,5, mínimo 3 e máximo de 150 UFC/mL; após **30 minutos** de pasteurização a média foi de 91 UFC/mL com desvio padrão de 105,12, mediana 27,5, mínimo 3 e máximo 250 UFC/mL (Tabela 8).

Tabela 8 - Resultados da média, mediana e valores mínimo e máximo do processo de pasteurização lenta, demonstrando a curva de morte térmica a cada cinco minutos (0 a 30 minutos), para *Klebsiella pneumoniae* associada à *Staphylococcus* spp. - São Paulo - 2006/2007

Pasteurização lenta - *Klebsiella pneumoniae* associada à *Staphylococcus* spp.

Tempo (minuto)	Média/ (DP) ¹	Mediana ²	Mínimo ³	Máximo ⁴
0 (zero)	250 (± 0)	250	250	250
5	37.3 (± 24,37)	35	3	80
10	62.4 (± 72)	46.5	3	250
15	112.8 (± 89.33)	76	28	250
20	110.8 (± 83.06)	127.5	2	250
25	51,1 (± 60.2)	15,5	3	150
30	91 (± 105.12)	27.5	3	250

* DP= ± Desvio Padrão

1: Indica o valor da média da contagem de UFC

2: Indica o valor da mediana da contagem de UFC

3: Indica menor valor da contagem de UFC em pelo menos uma amostra

4: Indica maior valor da contagem de UFC em pelo menos uma amostra

Na tabela 9, está descrito o tempo de pasteurização de 0 (zero) a 30 minutos (intervalo a cada 5 minutos), com as respectivas médias de cada tempo de pasteurização, mediana, mínimo e máximo.

No início do processo de pasteurização (**0 Minuto**), a média, mediana, mínimo e máximo encontrados de foi de 250 UFC/mL, com desvio padrão igual a zero; após **5 minutos** de pasteurização a média foi de 123,78 UFC/mL com desvio padrão de 105,22, mediana 100, mínimo 1 e máximo 250 UFC/mL; após **10 minutos** de pasteurização a média foi de 94,22 UFC/mL com desvio padrão de 99,93, mediana 50, mínimo 2 e máximo 250 UFC/mL; após **15 minutos** de pasteurização a média foi de 78,56 UFC/mL com desvio padrão de 83,45, mediana 60, mínimo 1 e máximo 250 UFC/mL; após **20 minutos** de pasteurização a média foi de 73,11 UFC/mL com desvio padrão de 81,16, mediana 38, mínimo 1 e máximo 250 UFC/mL; após **25 minutos** de pasteurização a média de 62,11 UFC/mL, desvio padrão de 61,87, mediana 30, mínimo 10 e máximo de 175 UFC/mL; após **30 minutos** de pasteurização a média foi de 105,44 UFC/mL com desvio padrão de 98,41, mediana 102, mínimo 1 e máximo 250 UFC/mL (Tabela 9).

Tabela 9 - Resultados da média, mediana e valores mínimo e máximo do processo de pasteurização lenta, demonstrando a curva de morte térmica a cada cinco minutos (0 a 30 minutos), para *Staphylococcus* spp. associado à *Klebsiella pneumoniae* - São Paulo - 2006/2007

Pasteurização lenta - *Staphylococcus* spp. associado à *Klebsiella pneumoniae*

Tempo (minuto)	Média/ (DP) ¹	Mediana ²	Mínimo ³	Máximo ⁴
0 (zero)	250 (± 0)	250	250	250
5	123,78 (± 105,22)	100	1	250
10	94,22 (± 99,93)	50	2	250
15	78,56 (± 83,45)	60	1	250
20	73,11 (± 81,16)	38	1	250
25	62,11 (± 61,87)	30	10	175
30	105,44 (± 98,41)	102	1	250

* DP= ± Desvio Padrão

1: Indica o valor da média da contagem de UFC

2: Indica o valor da mediana da contagem de UFC

3: Indica menor valor da contagem de UFC em pelo menos uma amostra

4: Indica maior valor da contagem de UFC em pelo menos uma amostra

Está representada no gráfico 2, a curva de morte térmica durante o processo de pasteurização lenta quando as cepas de *Staphylococcus* spp. e *Klebsiella pneumoniae* foram pasteurizadas em associação .

A curva azul demonstra o processo nas cepas de *Staphylococcus* spp., no início do processo (**0 minuto**) há 250 UFC/ mL, após **5 minutos** de pasteurização a 65 °C o número de UFC/mL passa para 123,78, após **10 minutos** para 94,22, após **15 minutos** para 78,56, após **20 minutos** para 73,11, após **25 minutos** para 62,11 e após **30 minutos** de pasteurização foram contadas 105,44 UFC/mL (Gráfico 2).

A curva rosa demonstra o processo nas cepas de *Klebsiella pneumoniae*, no início do processo (**0 minuto**) há 250 UFC/ mL, após **5 minutos** de pasteurização a 65 °C o número de UFC/mL passa para 37,3, após **10 minutos** para 62,4, após **15 minutos** para 112,8, após **20 minutos** para 110,8, após **25 minutos** para 51,1 e após **30 minutos** de pasteurização foram contadas 91 UFC/mL (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Curva de Morte térmica da média de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) durante o processo de pasteurização lenta para *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus spp.* pasteurizados em associação

Quando se analisa se há diferença estatística na pasteurização lenta com a *Klebsiella pneumoniae* isolada comparado à pasteurização lenta da *Klebsiella pneumoniae* associada ao *Staphylococcus* spp. encontra-se que há diferença estatisticamente significativa através do teste de Kruskal-Wallis e o respectivo valor de “p” em todas as etapas do processo (Tabela 10), ou seja há maior eliminação de microrganismos quando esses são pasteurizados isoladamente.

Entre a pasteurização isolada de *Staphylococcus* spp. e associada entre *Staphylococcus* spp. e *Klebsiella pneumoniae* apenas não se encontra resultados estatisticamente significativa através do teste Kruskal-Wallis no tempo de 15 e 20 minutos, ou seja, no tempo, 5, 10, 25 e 30 minutos há maior eliminação de microrganismos quando esses são pasteurizados isoladamente (Tabela 10).

Tabela 10 - Comparação entre o processo de pasteurização quando os microrganismos são submetidos ao processo isoladamente e em associação através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis - São Paulo - 2006/2007

Tempo (min)	K. pneumoniae	<i>Staphylococcus</i> spp.
	isolada X associada	isolado X associado
	valor de p	valor de p
5	0,01*	0,17
10	0,001*	0,01*
15	0,0006*	0,06
20	0,0007*	0,05
25	0,0004*	0,001*
30	0,03*	0,01*

* Resultados estatisticamente significantes

De acordo com a tabela 11, a função mais adequada aos valores obtidos com o processo de pasteurização é a função cúbica, onde se observa que:

- 92,24 % dos valores são enquadrados na função cúbica quando a *Klebsiella pneumoniae* é pasteurizada isoladamente;
- 77,6 % dos valores são enquadrados na função cúbica quando a *Staphylococcus* spp. é pasteurizado isoladamente;
- 32,6 % dos valores são enquadrados na função cúbica quando a *Klebsiella pneumoniae* é pasteurizada em associação ao *Staphylococcus* spp.
- 32,8 % dos valores são enquadrados na função cúbica quando o *Staphylococcus* spp. é pasteurizado em associação a *Klebsiella pneumoniae*.

Tabela 11 - Representação da função que mais se adequou à distribuição espacial dos resultados no processo de pasteurização lenta para *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus* spp, isolados e em associação - São Paulo - 2006/2007

o

Microrganismos								
e associações	Modelo	Rsq	d.f	Sigf	b0	b1	b2	b3
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Isolada	Linear	0,403	47	0	120,712	-5,5107		
	Quadrático	0,745	46	0	193,879	-23,071	0,5853	
	Cúbico	0,924	45	0.000	233,594	-49,547	2,9682	-0,53
<i>Staphylococcus</i> spp. Isolado	Linear	0,411	61	0	144,03	-5,9385		
	Quadrático	0,666	60	0	211,665	-22,171	0,5411	
	Cúbico	0,776	59	0.000	244,851	-44,294	2,532	-0,44
<i>Klebsiella pneumoniae</i> associada ao <i>Staphylococcus</i> spp.	Linear	0,092	68	0,011	145,05	-2,867		
	Quadrático	0,195	67	0,001	188,818	-13,371	0,3501	
	Cúbico	0,326	66	0.000	225,718	-37,971	2,564	-0,05
<i>Staphylococcus</i> spp. associado à <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Linear	0,179	68	0,011	172,343	-4,231		
	Quadrático	0,312	67	0.000	224,819	-16,826	0,4198	
	Cúbico	0,328	66	0.000	238,661	-26,053	1,25	-0,0185

Rsq: qualidade do ajuste da função

d.f: grau de liberdade

Sigf: Significância (P<0,05)

b0, b1,b2,b3: parâmetros das equações

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, ênfase crescente vem sendo dada à segurança alimentar, principalmente visando assegurar a melhor proteção do consumidor e possibilitando que fundamentos científicos sejam utilizados no estabelecimento de padrões, especificações e recomendações aplicadas ao controle de alimentos (BARBOSA; JORGE; UENO et al., 2007), uma vez que a presença de microrganismos patogênicos, aliada às práticas inadequadas de processamento, armazenamento e falta de higiene, podem provocar intoxicações alimentares, constituindo potencial risco à Saúde Pública (SOUZA et al., 2005).

A estreita relação entre o consumo de leite e seus derivados e a melhoria da qualidade de vida é sistematicamente defendida por pesquisadores de todo o mundo. Os derivados do leite são apreciados tanto pelo seu valor nutritivo como pelo seu sabor, que atendem aos mais exigentes paladares. No entanto, as condições de obtenção da matéria prima, do processamento e armazenamento, podem comprometer suas características organolépticas, bem como torná-las impróprias para o consumo, em virtude da contaminação por microrganismos responsáveis por toxinfecções alimentares (FREO; REOLON, 2006).

Como os *Estafilococos* são os microrganismos que causam, com maior frequência, mastites em vacas leiteiras e as *Klebsiellas* são encontradas no leite devido à falta de higiene durante o processo de obtenção e manipulação da matéria prima, foi estudada nesse trabalho a interação, entre as estirpes de *Staphylococcus spp.* e *Klebsiella pneumoniae*, isolados de leite mastíticos e de tanque de refrigeração, em cultura pura e associação, em temperaturas que reproduzem a possível conservação desse alimento, e, o efeito da pasteurização lenta nos mesmos microrganismos, a fim de conhecer a interação destas linhagens, após o tratamento térmico, e com isso, a qualidade do produto final ao qual o consumidor está tendo acesso. Entretanto, há a necessidade de mais pesquisas semelhantes para avaliar a interação entre diferentes tipos de microrganismos, pois, não foi verificado na literatura, trabalhos semelhantes a este.

Na avaliação da média de UFC da Escala 1 de Mac Farland, em ágar PCA, utilizadas para realização deste trabalho, observou-se maior número de UFC de *Klebsiella pneumoniae*, quando comparada à de *Staphylococcus* spp.; como, em ambas as culturas, a turvação na escala 1 de Mac Farland foi rigorosamente respeitada, acredita-se que esta diferença deva-se às características estruturais de cada gênero, tais como tamanho, cor e densidade.

Quando se comparou o crescimento bacteriano entre os dois meios de culturas, PCA e Mac Conkey, não foi encontrado diferença no crescimento bacteriano nas estirpes estudadas, após 24 horas nas temperaturas de 6 e 25 °C, mostrando que os dois meios podem ser utilizados como padrão para contagem de UFC em placas, nestas condições. Entretanto, a 36 °C, houve maior crescimento de UFC no meio de cultura PCA, demonstrando que caso seja utilizado o meio de cultura Mac Conkey, pode ocorrer uma subestimação do número real de UFC em leite.

O gênero *Staphylococcus* é formado, atualmente, por 32 espécies, destas o *Staphylococcus aureus* é a mais relacionada a casos e a surtos de intoxicação alimentar, devido à capacidade da maioria de suas cepas de produzir enterotoxinas. Na literatura é descrito inúmeros surtos de intoxicação alimentar causada pela ingestão de alimentos contendo enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas. Em função do risco à saúde pública que sua presença representa em alimentos, estabeleceu-se, em diversos países, a obrigatoriedade de sua pesquisa e enumeração, como parte das ações de fiscalização sanitária de órgãos governamentais (SILVA; GANDRA, 2004).

Além de intoxicações alimentares, os Estafilococos são os agentes mais comuns de infecções piogênicas, tais como: foliculite, furunculose, carbúnculo e impetigo. Em indivíduos debilitados, podem provocar infecções de caráter mais grave como osteomielite, bacteremia, endocardite, pneumonia, meningite e artrite bacteriana. Além de infecções piogênicas, os estafilococos podem causar vários tipos de intoxicações, tais como a Síndrome da pele escaldada e a síndrome do choque tóxico (MARTINS, 1999).

Em relação a alimentos, o grupo dos estafilococos coagulase positiva (capazes de produzir a enzima coagulase) são os mais importantes, porque sua presença nesses produtos, pode indicar deficiência de processamento ou condições

higiênicas inadequadas do processo, e que suas enterotoxinas, uma vez presente no alimento, poderão causar intoxicação alimentar mesmo que o alimento tenha passado pelo tratamento térmico como a pasteurização e a ultra-pasteurização, devido a sua termoestabilidade (SILVA; GANDRA, 2004).

Neste trabalho, a maior quantidade de *Staphylococcus* spp. foi encontrada quando o leite permaneceu, por 24 horas, armazenado em temperatura de refrigeração (6°C). Como este microrganismo é frequentemente isolado de glândulas mamárias mastísticas, o cuidado na prevenção à infecção deve ser intensificado para evitar que o consumidor adquira leite contaminado com *Staphylococcus* spp. e possa desenvolver qualquer um dos problemas descritos, uma vez que esse microrganismo é capaz de se reproduzir mesmo em temperatura de geladeira.

Sabe-se que os *Staphylococcus* tendem a produzir toxina quando passam por algum tipo de “stress” térmico, ou seja, quando há uma oscilação brusca da temperatura em um tempo relativamente pequeno. Com isso, vale lembrar que, em muitas situações, os leites no Brasil são transportados a temperatura ambiente até as usinas beneficiadoras, quando irão ser refrigerados. Nesse período há a possibilidade da produção da toxina, que não será degradada após o tratamento térmico, e poderá causar intoxicação alimentar no consumidor.

No trabalho de Almeida, Mendes e Silva (2005), a maior frequência de isolamento em leites provenientes de coleta de latões na plataforma de recepção de indústrias de laticínios da região sul de Minas Gerais, foram os *S. aureus* (64,55%) e que esses microrganismos estavam relacionados às fazendas onde o manejo da ordenha dos rebanhos acontecia de maneira deficiente relacionado ao uso de ordenhadeira mecânica, à não realização do pré e pós *dipping* e aos rebanhos onde ocorriam falhas no diagnóstico de mastite.

Hoffmann et al. (2004), também pesquisou a presença de *Staphylococcus* em queijos ralados e demonstrou que das 100 amostras analisadas, 10% apresentavam-se em desacordo com a legislação federal, ressaltando a importância da qualidade da matéria prima e do processamento dos produtos que se tornam potenciais fontes de toxinfecção alimentar e prejuízos para a indústria e o consumidor.

No trabalho de Leite, Lima e Reis (2005), das 47 cepas isoladas de *Staphylococcus aureus*, 85,1% revelou-se presuntivamente de origem animal, sendo que o autor atribui esse resultado à falhas nas condições higiênico-sanitárias.

É importante destacar que a presença de Estafilococos em qualquer quantidade em alimentos é reconhecida como um risco potencial para a saúde pública, uma vez que poderá vir a se multiplicar causando intoxicação alimentar (BARROS et al., 2004).

Já a *Klebsiella pneumoniae*, pertencente ao gênero dos coliformes e da família Enterobacteriaceae, apresentam variado potencial de patogenicidade para o homem, sendo o trato intestinal do homem e de outros animais de sangue quente, o habitat natural e principal nicho das enterobactérias. Assim, a presença dessas bactérias no leite indica que o mesmo entrou em contato, de forma direta ou indireta, com material de origem fecal (SILVA; JUNQUEIRA, 1995; NOVAK et al., 2001).

A contaminação de indivíduos, através de alimentos, por *Klebsiella* spp. pode se tornar um problema de saúde pública, uma vez que é observado na literatura um número cada vez mais freqüente de microrganismos desse gênero resistentes a grande parte dos antibióticos e com envolvimento de infecções hospitalares severas (CASSETARI et al., 2006), infecções urinárias (BLATT; MIRANDA, 2005) e surtos de diarreia aguda (BRASIL, 2007).

Neste trabalho, observou-se que quando se analisa o crescimento bacteriano no leite das cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus* spp., encontra-se que, à medida que aumenta a temperatura de armazenamento, passa a haver o predomínio de bactérias gram negativas (*K. pneumoniae*) nas amostras de leite analisadas, este fato passa a ser preocupante uma vez que indica que o consumidor pode estar ingerindo alimentos com grande quantidade de bactérias causadoras de diarreia ou infecções secundárias, caso o leite não seja procedente de local com higiene e manipulação satisfatórias ou não tenha sido armazenado adequadamente durante as etapas de fabricação.

O trabalho de Barros et al. (2004) demonstra a importância do controle da qualidade da matéria prima (leite) até a elaboração do produto final, uma vez que em seu experimento, encontrou-se 19 amostras de queijo fresco, das 30 amostras analisadas, em desacordo com o limite de até 5×10^2 /g de coliformes a 45 °C

estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2001) e 8 amostras das 30 analisadas em desacordo com o máximo permitido pela mesma legislação que é de até 10^3 /g de *Estafilococos* coagulase positiva.

No trabalho de Sousa, Toro e Neves (2005) demonstra precariedade dos processos de obtenção e qualidade do leite, uma vez que três das 15 amostras analisadas apresentavam número superior a 5×10^2 /g. a 45 °C. de coliformes.

Avaliando-se os trabalhos acima citados é possível observar que grande parte dos alimentos lácteos podem estar contaminados por *Klebsiella* spp. Associando estes dados com os resultados obtidos neste trabalho, onde ficou evidenciado que à medida que aumenta a temperatura de armazenamento do leite, passa a haver o predomínio de bactérias gram negativas (*K. pneumoniae*), e sabendo-se que esses microrganismos podem causar uma série de infecções severas e antibiótico resistentes, fica registrado a necessidade de implantar medidas mais efetivas de higiene e controle de qualidade, para evitar a contaminação dos alimentos por esses patógenos e com isso, que pessoas fiquem doentes devido às falhas de produção.

Em relação ao processo de pasteurização, de acordo com a Instituição Normativa nº 51 (BRASIL, 2002), leite pasteurizado é o leite elaborado a partir do leite cru, refrigerado na propriedade rural, que apresente as especificações de produção, de coleta e de qualidade dessa matéria-prima contidas em Regulamento Técnico próprio e que tenha sido transportado a granel até o estabelecimento processador.

Antes da Pasteurização		
Produto	Temperatura (saída)	Temperatura (chegada)
Leite tipo A	Granja leiteira	Granja leiteira
Leite tipo B	Maior que 4 °C por 48h	Estabelecimento Industrial adequado maior 7 °C
Leite tipo C	25 °C por até 10h	Posto de refrigeração ou Estabelecimento Industrial adequado
Após a Pasteurização		
Leite tipo A, B e C: temperatura igual ou inferior a 4 °C		
Temperatura máxima de conservação do leite: 7 °C na propriedade rural ou no tanque comunitário e 10 °C no estabelecimento processador.		

Fonte adaptada: Instrução Normativa 51, Brasil, 2002.

Quadro 1 - Temperatura de armazenamento do Leite

No presente estudo avaliou o efeito no processo de pasteurização lenta, quando inserido uma quantidade pré-determinada de microrganismos (*Staphylococcus spp.*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus spp.*, junto à *Klebsiella pneumoniae*) em leite integral estéril, para observar a curva de morte térmica quando se adiciona cada microrganismo em amostras de leite e quando se adiciona os dois microrganismos na mesma amostra de leite.

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que na pasteurização lenta, do leite com a associação de microrganismos (processo similar à realidade dos leites *in natura* no Brasil), há menos eliminação de UFC quando comparadas, ao mesmo processo, com os microrganismos isolados.

Catão e Ceballos (2001) encontraram leites, com grande quantidade de microrganismo e de diferentes tipos, após a pasteurização, demonstrando que há no mercado, leite com potencial patogênico à população.

Estes resultados são diferentes àqueles obtidos na dissertação de Zappa (2006), onde a autora consegue eliminar todos os microrganismos, utilizando os mesmos métodos de associação entre *Cândida spp.* e *Klebsiella pneumoniae*, entretanto, só medindo o número de UFC antes e após a pasteurização lenta.

Já na dissertação de Ruz-Peres (2005), 1,09% das leveduras e 0,99% dos fungos filamentos encontrados em amostras de leites crus sobreviveram ao processo de pasteurização lenta, resultado semelhante foi encontrado neste trabalho quando se analisa que 0,03% das *Klebsiella pneumoniae* e 3,07% dos *Staphylococcus spp.* sobreviveram ao mesmo processo. Entretanto, quando se analisa os microrganismos pasteurizados em associação, observa-se que 36,32% das *Klebsiella pneumoniae* e 37,92% dos *Staphylococcus spp.* sobreviveram à pasteurização lenta, demonstrando a importância de produzir leite com a menor quantidade de contaminação possível, para que esse seja oferecido ao consumidor alimentos que não coloque em risco sua saúde.

Freo e Reolon (2006), encontraram no respectivo trabalho; no leite *in natura* índice de coliformes totais e fecais três vezes maior que o permitido pela legislação (1000 NMP/mL). O leite pasteurizado obteve um índice dez vezes maior do que a

legislação permite (4 NMP/mL). O queijo frescal obteve índice três vezes maior que o permitido pela legislação (1000 NMP/mL), concluindo-se que a contaminação dos produtos pode ter sido proveniente da contaminação inicial do leite, falhas no processo de pasteurização ou no envase do produto.

O trabalho de Mendes et al. (2005), avaliou a qualidade microbiológica de leites pasteurizados tipo “C”, de três diferentes marcas, comercializadas em Alfenas – MG, sendo que uma das marcas analisadas apresentou um lote com resultados em desacordo com a legislação brasileira, evidenciando que ainda existem irregularidades higiênico-sanitárias durante o processamento, envase e/ou armazenamento do leite pasteurizado do tipo “C”, sendo necessário maior compromisso dos produtos e usinas beneficiadoras com as boas práticas de fabricação, análise de perigos e pontos críticos de controle e maior fiscalização nesses estabelecimentos, fazendo-se cumprir a legislação vigente e oferecendo ao consumidor um produto com qualidade higiênico-sanitária satisfatória e que não implique em riscos para a saúde.

O trabalho Bortolozo et al. (2004) destaca a importância do tempo em relação à quantidade de microrganismos encontrados em produtos lácteos. No referido trabalho, o autor observa que no tempo 0 (zero) de análise todas as amostras (5) de leite (humano) encontravam-se dentro dos padrões biológicos desejáveis, entretanto, quando analisava-se as mesmas amostras armazenadas em geladeira após 12 e 24h, a população de microrganismos mesófilos aumentou a tal ponto de tornar duas das cinco amostras impróprias para consumo. Neste trabalho, descreve-se a importância de se garantir o menor número possível de microrganismo no produto final para que mesmo após o crescimento natural das bactérias, durante o armazenamento, o consumidor adquira o produto de acordo com as legislações vigentes e seguro para a alimentação.

No trabalho de Barbosa, Jorge e Ueno (2007), encontrou-se dentre as 175 amostras de leite coletadas na plataforma de uma usina de processamento de Taubaté, 108 (61,7%) amostras contaminadas com *Staphylococcus* com contagem entre $1,0 \times 10^2$ e $2,1 \times 10^5$ UFC/mL (acima de 1×10^5 UFC/mL é considerado perigoso para a produção de enterotoxina).

Os mesmos autores relatam sobre a importância do processo de pasteurização neste leite devido à alta incidência de microrganismo encontrada, entretanto lembram que o processo de pasteurização apenas diminui a quantidade de cepas viáveis no produto, demonstrando a importância de se trabalhar com alimentos de boa qualidade para que após o processo de pasteurização reste um valor bastante reduzido de cepas viáveis.

Outro ponto importante é lembrar que a cada dia cresce na população, indivíduos com imunidade deficiente, seja pelo aumento do número de pacientes com AIDS, câncer ou outras doenças imunossupressoras, seja pelo crescente nível de estresse em que a população está exposta, e que leva à diminuição da imunidade deixando a população mais exposta a problemas de ordem alimentar quando ingerirem um alimento de qualidade duvidosa.

Através dos resultados obtidos neste trabalho, observa-se que há grande interação no crescimento bacteriano quando o alimento é submetido a um tempo de armazenamento e esse processo tem relação direta com a temperatura na qual o produto permanece armazenado, demonstrando a importância do cuidado com a higiene durante toda a cadeia produtiva, antes e após o processo de pasteurização, uma vez que esse tipo de tratamento térmico apenas elimina parte das células bacterianas, as quais continuaram a se multiplicar durante o tempo de armazenamento até o que alimento seja consumido.

Também fica evidente que quanto melhor a qualidade do leite antes do processo de pasteurização melhor a qualidade do mesmo após o processo de pasteurização.

7 CONCLUSÕES

Na temperatura de 6°C não há diferença no crescimento de *Staphylococcus* spp. e *Klebsiella pneumoniae*, no leite, e a medida que aumenta a temperatura, até 36°C, a *Klebsiella pneumoniae* apresenta crescimento superior ao *Staphylococcus* spp.

Nas temperaturas de 25 e 36°C a *Klebsiella pneumoniae* associada ao *Staphylococcus* spp. cresce mais do que quando em cultura pura, o que indica que a contaminação de leite por *Klebsiella pneumoniae* (contaminação ambiental) irá influenciar mais na qualidade do produto final, comparando-se à contaminação por *Staphylococcus* spp., oriundo de mastite.

Apesar da curva de morte térmica observada ser mais bem descrita na função cúbica, verificou-se que esta curva é alterada quando há a associação de *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus* spp., portanto, a interação de microrganismos altera a morte dos mesmos, recomendando-se que novos estudos sejam realizados para que se entenda melhor esse processo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. C.; MENDES, C. P. A.; SILVA, D. B. Fatores determinantes da ocorrência de mastite bovina, detectada em rebanhos através da análise de leite em latões. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 134, p. 81-88, Ago. 2005.
- ALTERTHUM, F.; CARVALHAL, L. **Controle dos microrganismos**. [S.l.:s.n.], 1999. cap. 7, p.75-86.
- AMARAL L. A.; ROSSI JUNIOR; O. D.; NADER FILHO; A.; FERREIRA, F. L. A.; BARROS, L. S. S. Ocorrência de *Staphylococcus sp.* em água utilizada em propriedades leiteiras do Estado de São Paulo. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 5, p. 620-623, Out. 2003.
- BARBALHO, T. C. F.; MOTA, R. A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Bahia, v. 2, n. 2, p. 31-36, 2001.
- BARBOSA, L.; JORGE, A. O. C.; UENO, M. Incidência de *Staphylococcus coagulase positiva* em leite tipo C e sensibilidade das cepas aos antibióticos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, n. 148, p. 105-109, jan/fev. 2007.
- BARROS, P. C. O. G.; NOGUEIRA, L. C.; RODRIGUEZ, E. M.; CHIAPPINI, C. C. J. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município do Rio de Janeiro, RJ. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 122, p. 57-61, Jul. 2004.
- BLATT, J. M.; MIRANDA, M. C. Perfil dos microrganismos causadores de infecção do trato urinário em pacientes internados. **Revista panamericana de infectologia**. v. 7, n. 4, p. 10-14, 2005.
- BEHMER, M. L. A. A. **Tecnologia do leite**, 15. ed. São Paulo: Ed. Nobel, 1991.
- BORTOLOZO, E. A. F. Q.; PIETROSKI, G.; BAGGIO, R.; CÂNDIDO, L. M. B. Padrão microbiológico e sanitário do leite humano, processado em banco de leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 122, p. 85-88, Jul. 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>> Acesso em: mar. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 51. 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**. Brasília, 20 Set. 2002 , Séc. 1, pg. 13. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=8932>> . Acesso em: 20 abr. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**: aprovado pelo Decreto n 30.691, de 29-3-52, alterado pelo Decreto n 1255, de 25-6-62. Brasília, D.F.: Ministério da Agricultura, 1980. p. 89. (inspeção Industrial e Sanitária do Leite e Derivados).

Brasil. Ministério da Agricultura. **RIISPOA - Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, artigo 475 (Brasil)**, Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Aprovado pelo decreto nº 30691 de 29 de março de 1952, alterado pelo Decreto 1255 de 25 de junho de 1962. Alterado pelo Decreto 2244 de 04 de junho de 1997. Brasília-DF.: Ministério da Agricultura, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal – LANARA. **Métodos Analíticos para o controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes** – Métodos Físico-Químicos. Brasília – DF.: Ministério da Agricultura, 1981.

BRASIL, Ministério da Saúde. Nota técnica. **Surto de diarreia aguda em municípios do Estado do Amazonas**. Acesso outubro de 2007. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_amazonas_2511.pdf>. Acesso em: 10 Out. 2007.

CASSETTARI, V. C.; SILVEIRA, I. R.; BALSAMO, A. C.; FRANCO, F. Surto em berçário por *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro estendido atribuído à colonização de profissional de saúde portador de onicomicose. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 4, jul-ago, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572006000500015. Acesso em: 10 Out. 2007.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp, coniformes totais e fecais e *E. coli* no leite crus e pasteurizados de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 281-287, Set/Dez. 2001.

EMBRAPA GADO DE LEITE. Importância econômica. Janeiro, 2003. Disponível em:<
<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/importancia.html>>. Acesso em: 6 Ago. 2005.

FREO, J. D.; REOLON, J. Qualidade dos produtos derivados de carne e leite, industrializados pelas agroindústrias de Frederico Westphalen, RS. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, n. 140, p. 53-59, Abr. 2006.

HOFFMAN, F. L.; GONÇALVES, T. M. V.; COELHO, A. R.; HIROOKA, E. Y.; HOFFMANN, P. Qualidade microbiológica de queijos ralados de diversas marcas comerciais, obtidos do comércio varejista do município de São José do Rio Preto, SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 122, p. 62-66, Jul. 2004.

INTERVET. Mastite-Doenças. Disponível em: < Internet:
 <http://www.intervet.com.br/Doencas/mastites/070_Solu_o_Intervet.asp>
 Acesso em: 3 Fev. de 2005.

JASPER, D. E.; DELLINGER, J. D.; BUSHNELL, R. B. Herd studies on coliform mastitis. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 166, n. 8, p. 778-780, Abr. 1975.

KIKUCHI, N.; KAGOTA, C.; NOMURA, T.; HIRAMUNE, T.; TAKAHASHI, T.; YANAGAWA, R. Plasmid profiles of *Klebsiella pneumoniae* isolated from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 47, p. 9-15, 1995.

LEITE, M. M.; LIMA, M. G.; REIS, R. B. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo minas tipo frescal. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 132, p. 89-93, Jun. 2004.

MARTINS, L. T.; TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo, Editora Atheneu, 1999. p. 149-170.

MENDES, J. B.; TAHAN, F.; OLIVEIRA, F. L. R.; BUENO, J. M.; MONTEIRO, M. R. P.; VEIGA, S. M. O. M. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado tipo "C" comercializado na cidade de Alfenas, MG. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 135, p. 64-67, Set. 2005.

MENDONÇA, A. T.; LEAL, D. D. M.; LONDONO, M. M. D.; CARVALHO, E. P. Um microrganismo contaminante de grande importância para o leite e produtos lácteos. Disponível em: < http://www.editora.ufla.br/Boletim/pdfextensao/bol_59.pdf > Acesso em: 3 Fev. 2005.

NONNECKE, J.; NEWBOULD, F. H. S. Biochemical and serologic characterization of Klebsiella strains from bovine mastitis and the environment of dairy cow. **American Journal of Veterinary Research**. v. 45, n. 11, Nov. 1984.

NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G.; ASENSI, M. D.; MORAES, B. A.; RODRIGUES, D. P. Resistência antimicrobiana de coliformes isolados de leite humano ordenhado. **Caderno de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v.17, n.3 Maio/Jun, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2001000300026&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 20 Abr. 2007.

REIS, S. R.; SILVA, N.; BRESCIA, M.V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 6, Dec. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352003000600001>. Acesso em: 20 Out. 2005.

RIBEIRO, M. E. R.; PETRINI, L. A.; AITA, M. F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JR. W.; GOMES, J. F.; SCHRAMM, R. C.; MARTINS, P. R.; BARBOSA, R. S. Relação entre mastite clínica, infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteira na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista brasileira de agrociências**, v. 9, n. 3, p. 287-290, Jul-Set. 2003.

ROBINSON, R, K. (Ed.). **Dairy microbiology**. Departament of food science, University of Reading, UK. London; New York: E'sevier Applied Science Publishers, 1989. v. 1, 38 p.

RUZ-PERES, M. **Avaliação da presença de fungos em amostras de leite cru e estudo da susceptibilidade destes microrganismos às relações temperatura/tempo empregadas nos processos de pasteurização e fervura**. 2005. 92 f. Dissertação (Mestrado em epidemiologia experimental e aplicas às zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SALASIA, S. I. O.; KHUSNAN, Z.; LÄMMLER, C.; ZSCHÖCK, M. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. **Journal of Veterinary Science**, v. 5, n. 2, p. 103-109, 2004.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A. Métodos de análise microbiológica de alimentos. Campinas: ITAL, 1995. p. 228.

SILVA, W. P.; GANDRA, E. A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Higiene alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 122, p. 32-40, 2004.

SILVA, W. P.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental sample of Brazilian dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, Abr/Jun, v. 31, n. 2, 2000.

SOUSA, C. L.; TORO, M. J. U.; NEVES, E. C. A. Avaliação microbiológica e físico-química do queijo *cottage* comercializado na cidade de Belém, PA. **Higiene alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 133, p. 86-91, Jul. 2005.

SOUZA, D. L.; SILVÉRIO, F. L.; OLIVEIRA, T. S.; BIANCHI, M. C.; GOLLUCKE, A. P. B. Ocorrência de *Staphylococcus coagulase-positiva* em doces recheados vendidos em feiras-livres. **Higiene alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 132, p. 49-57, Jun. 2005.

TRABULSI, L. R.; CAMPOS, L. C. Bacteriologia médica In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo, Editora Atheneu, 1999. p. 119-329.

VOLTOLINI, T. V.; SANTOS, G. T.; ZAMBOM, M. A.; RIBAS, N. P.; MÜLLER, E. E.; DAMASCENO, J. C.; ÍTAVO, L. C. V.; VEIGA, D. R. Influência dos estágios de lactação sobre a contagem de células somáticas do leite de vacas da raça holandesa e identificação de patógenos causadores de mastite no rebanho, **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 4, p. 961-966, 2001.

WILSON, D. J.; GONZALEZ, R. N.; DAS, H. H. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania – Prevalência and effects on somatic cell count and milk production. **Journal Dairy Science**, v. 80, p. 2592-2598, 1997.

ZAPPA, V. **Comparação entre o crescimento no leite de unidades formadoras de colônias de *Cândida* spp. e *Klebsiella pneumoniae*, isoladas de tanque de refrigeração de leite, em culturas puras e em associações.** 2006. 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

ZIA, S.; GIRI, S. N.; CULLOR, J.; EMAU, P.; OSBURN, B. I.; E BUSHNELL, R. B. Role of eicosanoids, histamine, and serotonin in the pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*-induced bovine mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, n. 11, Nov. 1987.

ZOCHE, F.; BERSOT, L. S.; BACELLOS, V. C.; PARANHOS, J. K.; ROSA, S. T. M.; RAYMUNDO, N. K. Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na região do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, Brasil, v. 7, n.2, p. 59-67, 2002