

RESISTÊNCIA DE FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS ISOLADOS DE LEITE CRU BOVINO À PASTEURIZAÇÃO E FERVURA

Monica Ruz-Peres¹
Nilson Roberti Benites²
Eugenio Yokoya³
Priscilla Anne Melville^{4*}

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a avaliação da resistência à pasteurização e fervura de fungos filamentosos e leveduras isolados de leite cru bovino de rebanhos leiteiros. Foram avaliados um total de 27 fungos filamentosos (05 *Mucor* spp., 02 *Aspergillus* spp., 07 *Chrysosporium* sp., 05 *Acremonium* spp., 08 *Penicillium* spp.) e 275 leveduras (05 *Aureobasidium* sp., 50 *Candida krusei*, 22 *Candida parapsilosis*, 23 *Candida kefyr*, 03 *Candida albicans*, 40 *Candida guilliermondii*, 14 *Candida lusitaniae*, 36 *Candida tropicalis*, 33 *Rhodotorula* spp., 35 *Geotrichum* spp., 14 *Trichosporon* spp.). As estirpes estudadas foram originalmente isoladas de amostras de leite cru bovino oriundas de 50 tanques de refrigeração e 10 latões de propriedades leiteiras, bem como de 10 latões de transportadores e distribuidores que armazenavam e comercializavam diretamente ao consumidor o leite obtido das propriedades produtoras. A pasteurização rápida foi o procedimento no qual houve maior índice de resistência (72,18%) por parte das estirpes de leveduras e fungos filamentosos submetidos ao teste, seguida pela fervura (15,89%) e pasteurização lenta (0,99%). Deve-se atentar para a possibilidade da persistência de fungos no leite pasteurizado e fervido, o que pode representar risco para o consumidor. A resistência de leveduras e fungos filamentosos ao tratamento térmico representa um risco para o consumo de leite e seus derivados, tendo em vista que estes microrganismos podem vir a causar doenças bem como podem interferir com os procedimentos utilizados na elaboração de derivados lácteos.

Palavras-chave: fervura, fungos filamentosos, leite cru bovino, leveduras, pasteurização

RESISTANCE OF MOULDS AND YEASTS ISOLATED FROM BOVINE RAW MILK TO PASTEURIZATION AND BOILING

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the resistance of molds and yeasts isolated from bovine raw milk from dairy herds to pasteurization and boiling. A total of 27 molds (05 *Mucor* spp., 02 *Aspergillus* spp., 07 *Chrysosporium* sp., 05 *Acremonium* spp., 08 *Penicillium* spp.) and 275 yeasts (05 *Aureobasidium* sp., 50 *Candida krusei*, 22 *Candida parapsilosis*, 23 *Candida kefyr*, 03 *Candida albicans*, 40 *Candida guilliermondii*, 14 *Candida lusitaniae*, 36 *Candida tropicalis*, 33 *Rhodotorula* spp., 35 *Geotrichum* spp., 14 *Trichosporon* spp.) were submitted to the tests. The selected strains were originally isolated from 50 bulk tanks and 10

¹ Médica Veterinária Autônoma – Indaiatuba. E-mail: brinjhela@yahoo.it

² Prof. Associado do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-000, São Paulo-SP, Brazil. Fone 55 11 3091-7935. Fax 55 11 3091-7928 .E-mail:benites@usp.br

³ Médico Veterinário Autônomo – Leme

⁴ Médica Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. E-mail: melville@usp.br. *Autor para correspondência.

milk cans from dairy farms, and also from 10 milk cans of distributors that store and sell informal milk. High Temperature Short Time (HTST) pasteurization was the procedure in which there was a higher resistance (72.18%) of yeast and mold strains, followed by boiling (15.89%) and Low Temperature Long Time (LTLT) pasteurization (0.99%). Care should be taken regarding the possibility of fungi persistence in pasteurized and boiled milk, which can represent a risk to consumers. The resistance of yeasts and molds to thermal treatment represent a risk to the consumption of milk and dairy products, having in view that these microorganisms may cause diseases as well as interfere with the procedures used in the production of dairy products.

Key words: boiling, molds, pasteurization, bovine raw milk, yeasts.

RESISTENCIA DE HONGOS FILAMENTOSOS Y DE LEVADURAS AISLADOS DE LA LECHE CRUDA BOVINA A LA PASTERIZACIÓN Y A LA EBULLICIÓN

RESUMEN

El objetivo de este estudio fué la evaluación de la resistencia de los hongos filamentosos y de las levaduras aislados de muestras de leche cruda bovina de rebaños lecheros a la pasterización y a la ebullición. Un total de 27 hongos filamentosos (05 *Mucor* spp., 02 *Aspergillus* spp., 07 *Chrysosporium* sp., 05 *Acremonium* spp., 08 *Penicillium* spp.) y 275 levaduras (05 *Aureobasidium* sp., 50 *Candida krusei*, 22 *Candida parapsilosis*, 23 *Candida kefyr*, 03 *Candida albicans*, 40 *Candida guilliermondii*, 14 *Candida lusitaniae*, 36 *Candida tropicalis*, 33 *Rhodotorula* spp., 35 *Geotrichum* spp., 14 *Trichosporon* spp.) fueron evaluados. Las especies estudiadas fueron aisladas a partir de 50 tanques de refrigeración y 10 cantinas de leche de las granjas lecheras, y también a partir de 10 cantinas de distribuidores que almacenan y venden leche informal obtenida de las granjas lecheras. La pasterización rápida (HTST) fué el procedimiento en el cual hubo una resistencia más grande (72,18%), seguido por la ebullición (15,89%) y la pasterización lenta (LTLT) (0,99%). Debese tomar cuidado con respecto a la posibilidad de la persistencia de hongos en la leche pasterizada y hervida, que puede representar un riesgo al consumidor. La resistencia de levaduras y de moldes al tratamiento termal representa un problema para la leche y los productos lácteos, pués estos microorganisms pueden causar enfermedades así como pueden interferir con los procedimientos usados en la producción de derivados lácteos.

Palabras-clave: ebullición, hongos filamentosos, leche cruda, levaduras, pasterización

INTRODUÇÃO

Os fungos desempenham um importante papel na indústria de produtos lácteos pois podem promover deterioração ou então desencadear fermentação e/ou maturação desejáveis aos derivados do leite (1-4). Por outro lado, pouco se conhece sobre a importância, sob o ponto de vista de saúde pública, da presença destes microorganismos em produtos lácteos, embora existam relatos que apontem para sua associação a doenças relacionadas ao consumo dos mesmos (2).

Diversos fungos podem estar associados a doenças infecciosas no ser humano e animais, enquanto outros podem produzir metabólitos tóxicos (micotoxinas) quando estão se multiplicando nos alimentos e, quando ingeridos, podem acarretar diferentes afecções (4, 5). Os fungos saprófitas geralmente não são patogênicos, mas podem atuar como patógenos

oportunistas. Quando o paciente apresenta algum tipo de debilitação, esses microrganismos podem se multiplicar e causar doenças, muitas vezes com conseqüências fatais (4).

Estes microrganismos podem estar presentes no leite como contaminantes de medicamentos para mastite, diluentes de antibióticos, oriundos da água de lavagem dos equipamentos de ordenha ou ainda, das mãos do ordenhador (6, 7). Medidas higiênic-sanitárias não conduzidas adequada ou satisfatoriamente podem facilitar a contaminação do leite por microrganismos indesejáveis como os fungos, os quais podem causar alterações físico-químicas no mesmo, limitando sua durabilidade e de seus derivados, além de determinar problemas econômicos e de saúde pública (8).

A manutenção da qualidade do leite após a ordenha requer algumas precauções tendo em vista que o mesmo é perecível e pode servir como meio de cultura para inúmeros microrganismos. Assim sendo, recomenda-se o emprego da pasteurização e/ou fervura, métodos que consistem no uso conveniente do calor com a finalidade de destruir totalmente a microbiota patogênica sem alteração sensível da constituição física e do equilíbrio químico do leite, bem como sem prejuízo de seus elementos bioquímicos assim como de suas propriedades organolépticas normais (9, 10).

Dados referentes a doenças de origem alimentar associadas ao consumo de leite cru e seus derivados no Brasil, são escassos e inconsistentes, havendo poucos relatos sobre a ocorrência de patógenos e seu envolvimento em surtos de doenças relacionadas ao consumo de produtos lácteos (11, 12). Em um relatório datado de 2000, por exemplo, elaborado pela Organização Pan Americana da Saúde, o leite foi apontado como o terceiro maior responsável por surtos de doenças relacionadas ao consumo de alimentos na América Latina, sendo que 50% delas estavam associadas a bactérias habitualmente eliminadas pelo processo de pasteurização, tais como *Brucella* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* spp. (13). Dados publicados em 2003 pela mesma entidade (OPAS), por sua vez, apontam a ocorrência de 1169 surtos de doenças de origem alimentar na América do Sul, sendo 11% deles associados a produtos lácteos (14). Assim sendo, a presença destes microrganismos no leite pode representar potencial risco à saúde humana principalmente quando se considera que em vários locais no mundo existe o hábito do consumo de leite cru e seus derivados (12, 13, 15-21). Ainda que a legislação brasileira determine que todo leite produzido deva ser previamente submetido a um tratamento térmico antes de ser comercializado, observa-se desde a década de 90 o crescimento do “leite informal”, que consiste no produto que não é submetido a qualquer tipo de inspeção oficial e que não possui garantias quanto à sua qualidade microbiológica (13).

Considerando que o leite não inspecionado pode conter diversos microrganismos que podem oferecer risco potencial à saúde (12, 15-19) e, tendo em vista que pouco se conhece sobre a importância da presença de fungos no leite sob o ponto de vista de saúde pública (2, 3, 22), este trabalho teve como objetivo a avaliação da resistência à pasteurização e fervura de fungos filamentosos e leveduras isolados de leite cru de rebanhos leiteiros.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção das estirpes avaliadas

Um total de trezentas e duas (N=302) estirpes de fungos isoladas de amostras de leite cru bovino foram utilizadas no presente estudo, sendo 27 fungos filamentosos (05 *Mucor* spp., 02 *Aspergillus* spp., 07 *Chrysosporium* sp., 05 *Acremonium* spp., 08 *Penicillium* spp.) e 275 leveduras (05 *Aureobasidium* sp., 50 *Candida krusei*, 22 *Candida parapsilosis*, 23 *Candida kefyr*, 03 *Candida albicans*, 40 *Candida guilliermondii*, 14 *Candida lusitaniae*, 36 *Candida tropicalis*, 33 *Rhodotorula* spp., 35 *Geotrichum* spp., 14 *Trichosporon* spp.).

As estirpes utilizadas foram isoladas a partir de amostras de leite cru obtido de diferentes origens: 50 tanques de refrigeração de propriedades leiteiras que armazenavam leite dos tipos A, B e cru refrigerado cujo destino final era o processamento em estabelecimento industrial; 10 latões de propriedades produtoras de leite cru dos tipos B e cru refrigerado, as quais participavam efetivamente do mercado de leite “informal”; 10 latões de transportadores e distribuidores que armazenavam e comercializavam diretamente ao consumidor o leite cru obtido das propriedades produtoras de leite tipo cru refrigerado. Todas estas amostras de leite foram obtidas nas regiões de Campinas, Itu e Pirassununga, localizadas no Estado de São Paulo, Brasil. O leite era proveniente predominantemente de bovinos mestiços e da raça Holandesa preta e branca, sendo que as propriedades leiteiras às quais pertenciam, apresentavam ordenha mecânica ou manual. Todas as estirpes de fungos isoladas destas amostras de leite foram avaliadas no presente estudo, sendo que a identificação das leveduras foi feita de acordo com Lodder (23) e Kreeger-Van-Rig (24) e a identificação dos fungos filamentosos foi realizada de acordo com Barnett e Hunter (25).

Testes de pasteurização e fervura

Os testes de pasteurização e fervura foram realizados com base na metodologia descrita por Melville et al. (26) adaptada para fungos filamentosos e leveduras. Assim sendo, foram utilizados cultivos recentes de fungos em ágar Sabouraud-dextrose. Inicialmente, foi obtida uma suspensão celular de cada uma das estirpes em 5 mL de solução salina (0,85%) estéril, ajustada a uma turbidez equivalente ao tubo número 3 da escala de McFarland. A seguir, uma alíquota de 2 mL da suspensão do microrganismo foi transferida para um tubo de vidro estéril (18 x 180 mm) contendo 18 mL de leite integral esterilizado obtendo-se assim uma diluição da ordem de 10^{-1} (correspondente à solução mãe/controle). O conteúdo desta foi homogeneizado e então distribuído em volumes de 1 mL em cada um dos tubos de vidro estéreis (13 x 90 mm) referentes aos diferentes tratamentos térmicos aos quais foram submetidos (cinco para teste de pasteurização rápida, cinco para pasteurização lenta e cinco para fervura).

Foram testados tratamentos térmicos de 65°C/30 minutos (pasteurização lenta) e 75°C/20 segundos (pasteurização rápida), utilizando-se para tanto um equipamento de banho-maria. Uma vez atingidas as temperaturas desejadas, os tubos com as amostras de leite foram imediatamente submetidos a um choque térmico em um recipiente contendo gelo. Foi também realizada a avaliação da resistência das estirpes dos fungos filamentosos e das leveduras à temperatura empregada no processo de fervura do leite. Para tanto, os cinco tubos preparados anteriormente para este teste, foram submetidos ao calor e, ao atingir a temperatura de fervura (aproximadamente 98° C), foi colhida uma alíquota de 0,1 mL de cada tubo para plaqueamento.

Após a realização dos três tratamentos térmicos, foram colhidas alíquotas de 0,1 mL das suspensões testadas (inclusive da solução mãe/controle), as quais foram plaqueadas, utilizando-se a técnica de espalhamento em superfície em ágar Sabouraud-dextrose, com incubação a 25°C por um período mínimo de 7 dias, para a avaliação da presença e quantidade de unidades formadoras de colônias dos microrganismos. As colônias foram identificadas da mesma forma como descrito anteriormente.

Os testes que visaram a avaliação da resistência de cada isolado foram repetidos por cinco vezes para cada tratamento térmico. A estirpe foi considerada resistente quando foi observada ausência total de crescimento de colônias em pelo menos três dos cinco testes realizados.

A análise estatística baseou-se na utilização do teste de Fischer, tendo sido empregado o “software” Graphpad InStat 1992-98 (27) para sua execução.

RESULTADOS

Em relação às estirpes de leveduras, 76%, 1,09% e 17,45% foram resistentes à pasteurização rápida, pasteurização lenta e fervura, respectivamente (Tabela 1). Considerando as 27 estirpes de fungos filamentosos, 33,33%, 0% e 0%, respectivamente, foram resistentes à pasteurização rápida, pasteurização lenta e fervura (Tabela 1).

Em relação à pasteurização rápida, 72,18% do total de isolados resistiram à temperatura de 75°C/20 segundos, o que correspondeu a uma mediana de 12,6 (valor mínimo de 0 - valor máximo de 281,7) X 10 U.F.C./mL/estirpe testada. As diferentes espécies de fungos avaliados apresentaram percentagens distintas de resistência frente a este procedimento como demonstrado na Tabela 1. Em relação à pasteurização lenta, abaixo de 1% das estirpes testadas resistiram à temperatura de 65°C/30 minutos (Tabela 1), o que correspondeu a uma mediana de 0 (0-2,6) U.F.C./mL/estirpe. Em relação à fervura, 15,89% dos isolados resistiram a este teste, correspondendo a uma mediana de 0 (0-116,30) U.F.C./mL/estirpe.

Tabela 1. Frequências de resistência (em número absoluto e percentagem) frente à pasteurização rápida, pasteurização lenta e fervura, demonstradas por estirpes de leveduras (N=275) e fungos filamentosos (N=27) isolados a partir de amostras de leite cru bovino no Brasil.

Fungos isolados	Estirpes testadas N	Pasteurização rápida		Pasteurização lenta		Fervura	
		N	%	N	%	N	%
<i>Aureobasidium</i> spp.	5	1	20	0	0	0	0
<i>C. albicans</i>	3	1	33,3	0	0	0	0
<i>C. krusei</i>	50	37	74	1	2	8	16
<i>C. parapsilosis</i>	22	19	86,36	0	0	3	13,63
<i>C. guilliermondii</i>	40	33	82,5	0	0	9	22,5
<i>C. tropicalis</i>	36	26	72,22	0	0	3	8,3
<i>C. kefyri</i>	23	16	69,56	0	0	8	34,78
<i>C. lusitanae</i>	14	12	85,71	0	0	5	35,7
<i>Geotrichum</i> spp.	35	27	77,14	0	0	4	11,42
<i>Trichosporon</i> spp.	14	12	85,71	0	0	3	21,42
<i>Rhodotorula</i> spp.	33	25	75,75	2	6,06	5	15,15
Total Leveduras	275	209	76	3	1,09	48	17,45
<i>Penicillium</i> spp.	8	0	0	0	0	0	0
<i>Acremonium</i> spp.	5	3	60	0	0	0	0
<i>Chrysosporium</i> spp.	7	2	28,57	0	0	0	0
<i>Mucor</i> spp.	5	3	60	0	0	0	0
<i>Aspergillus</i> spp.	2	1	50	0	0	0	0
Total Fungos Filamentosos	27	9	33,33	0	0	0	0
Total	302	218	72,18^a	3	0,99	48	15,89

a = A pasteurização lenta foi o procedimento para o qual observou-se maior (P<0,01) resistência (72,18 %) por parte dos isolados, seguida pela fervura (15,89 %) e pasteurização lenta (0,99 %).

Verificou-se que o processo de pasteurização rápida foi o tratamento térmico no qual houve o maior ($P < 0,01$) índice de resistência (72,18%) por parte das estirpes de leveduras e fungos filamentosos testados, seguido pela fervura (15,89%) e pasteurização lenta (0,99%).

DISCUSSÃO

Os microrganismos utilizados para os testes neste estudo, tais como *Aureobasidium* spp., *Candida* spp., *Geotrichum* spp., *Trichosporon* spp., *Rhodotorula* spp., *Penicillium* spp., *Acremonium* spp., *Chrysosporium* spp., *Mucor* spp., *Aspergillus* spp., geralmente estão associados a quadros de micoses oportunistas, as quais consistem em infecções cosmopolitas causadas por fungos de baixa virulência, que convivem pacificamente com o hospedeiro, mas ao encontrar condições favoráveis, como distúrbios do sistema imunológico, desenvolvem seu poder patogênico, invadindo os tecidos (5, 28-31). Muitos destes fungos, como *Penicillium* spp., *Acremonium* spp., *Chrysosporium* sp., *Mucor* spp. e *Aspergillus* spp. estão associados a afecções de natureza crônica (5), fato este que dificilmente permitiria uma associação entre a doença com o consumo de leite, o que poderia explicar a pouca quantidade de estudos nesta área (2, 22).

Os fatores que predisõem às micoses oportunistas podem ser classificados em fatores intrínsecos ou próprios do hospedeiro (neoplasias, diabetes, dentre outras, bem como todas as doenças que alteram a imunidade celular) e fatores extrínsecos (antibioticoterapia, corticoidoterapia, etc.) (32).

As micoses em humanos tem sido descritas assumindo diferentes formas de ocorrência, dependendo do microrganismo envolvido. Em geral estes agentes estão associados a condições patológicas como alergias, otomicoses, meningites, endocardites e doenças nos mais variados locais do organismo, como pulmão, sistemas gastrointestinal, genitourinário, cutâneo, dentre outros (5). Todos os fungos filamentosos e leveduras avaliados no presente estudo apresentam potencial patogênico, principalmente se o hospedeiro encontrar-se debilitado pelos fatores já mencionados. Desta forma, o consumo de leite contaminado por algum destes microrganismos, ou mesmo de toxinas por eles produzidas, poderia acarretar danos à saúde do consumidor.

A importância da presença de leveduras e fungos filamentosos no leite foi enfatizada por Fleet e Mian (2), os quais citaram relatos que associavam a ingestão de alimentos contaminados por fungos com a ocorrência de afecções em humanos. Todd (33) em levantamento acerca de doenças associadas ao consumo de alimentos, referiu um total de 51 casos nos quais fungos filamentosos ou leveduras seriam os microrganismos suspeitos.

A instabilidade do mercado de leite no Brasil faz com que pequenos produtores de leite busquem alternativas de comércio de sua produção, o que inclui a venda de leite cru (12, 13). Em muitas regiões do Brasil é a comercialização do leite informal - embora trate-se de prática não permitida no país - que permite a sobrevivência de muitos pequenos produtores (34). Diversos autores apontam para os riscos em termos de saúde pública, associados ao consumo de alimentos que apresentam elevada carga microbiana, inclusive com microrganismos patogênicos (11-13, 15, 34-37).

Torkar e Vengust (38) avaliaram 60 amostras de leite cru e detectaram leveduras e fungos filamentosos, respectivamente, em 95% e 63,3% das amostras. Por sua vez, Melville et al. (39) analisaram 70 amostras de leite cru bovino, tendo isolado em diferentes percentagens, fungos filamentosos e leveduras a partir de todas as amostras analisadas.

No presente estudo, a pasteurização rápida foi o tratamento térmico no qual houve maior ($P < 0,01$) índice de resistência (72,18%) por parte das estirpes de leveduras e fungos filamentosos submetidas ao teste, seguido pela fervura (15,89%) e pasteurização lenta (0,99%). Os resultados obtidos permitem concluir que a pasteurização lenta foi o método mais

eficiente para a eliminação dos microrganismos em estudo. Por sua vez, Vadillo et al. (22) observaram uma maior ocorrência de fungos quando da utilização da pasteurização lenta. Estes autores avaliaram o efeito de diferentes tipos de pasteurização sobre amostras de leite provenientes de um tanque de refrigeração de uma Cooperativa de Laticínios de Madri e, após os testes envolvendo tratamentos térmicos, analisaram a frequência de ocorrência de fungos nas mesmas. Verificaram diferentes gêneros de fungos isolados após algum dos tipos de tratamento térmico realizados, tais como: *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp. e *Aspergillus* spp. No presente estudo por sua vez, pode-se verificar que os gêneros que apresentaram resistência a algum dos tratamentos térmicos realizados foram: *Aureobasidium* spp., *Candida* spp., *Geotrichum* spp., *Trichosporon* spp., *Rhodotorula* spp., *Penicillium* spp., *Acremonium* spp., *Chrysosporium* spp., *Mucor* spp. e *Aspergillus* spp.

Segundo Jodral et al. (40), uma estirpe de *Aspergillus* isolada a partir de leite pasteurizado, produziu aflatoxina “in vitro”, o que reforça a importância da presença destes agentes e/ou produtos oriundos de seu metabolismo no leite, particularmente do produto consumido “in natura”, obtido diretamente dos tanques de refrigeração ou latões nas propriedades de exploração leiteira ou então a partir de distribuidores de leite clandestino, sem ser submetido a qualquer tipo de tratamento térmico antes do consumo.

Praticamente todos os fatores que envolvem a presença de fungos no leite cru, de alguma maneira estão relacionados a aspectos de higiene em diferentes estágios da produção do mesmo. Por sua vez, há a possibilidade da persistência de fungos no leite pasteurizado e fervido, especialmente no que se refere à pasteurização rápida, conforme observado no presente estudo, o que pode representar risco ao consumidor. Assim sendo, a resistência de leveduras e fungos filamentosos após a realização de tratamento térmico, representa um risco para o consumo de leite e seus derivados, tendo em vista que estes microrganismos podem vir a causar doenças bem como podem interferir com os procedimentos utilizados na elaboração de derivados lácteos.

REFERÊNCIAS

1. Bullerman LB. Public health significance of molds and mycotoxins in fermented dairy products. *J Dairy Sci.* 1981; 64: 2439-52.
2. Fleet GH, Mian MA. The occurrence and growth of yeasts in dairy products. *Int J Food Microbiol.* 1987; 4: 145-55.
3. Jakobsen M, Narvhus J. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int Dairy J.* 1996; 6: 755-68.
4. Minervini F, Montagna MT, Spilotros G, Monaci L, Santacroce MP, Visconti A. Survey on mycoflora of cow and buffalo dairy products from Southern Italy. *Int J Food Microbiol.* 2001; 69: 141-6.
5. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Tratado de micologia médica. São Paulo: Sarvier; 2002.
6. Crawshaw WM, Macdonald NR, Duncan G. Outbreak of *Candida rugosa* mastitis in a dairy herd after intramammary antibiotic treatment. *Vet Rec.* 2005; 156: 812-3.
7. Williamson JH, Menna MEDI. Fungi isolated from bovine udders, and their possible sources. *N Z Vet J.* 2007; 55: 188-90.
8. Andrade MA. Mastite bovina subclínica: prevalência, etiologia e testes de sensibilidade a drogas antimicrobianas. *Rev Vet News.* 2001; 49: 10-6.

9. Ministério da Agricultura. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, alterado pelo Decreto nº1255, de 25 de junho de 1962. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília: Ministério da Agricultura; 1980. p.89.
10. Porcionato MAF, Reis CBM, Barreiro JR, Moreno JFG, Mestieri L. Efeito da fervura, resfriamento ou congelamento na qualidade do leite cru. Rev Acad Ciênc Agrar Ambient. 2008; 6: 511-7.
11. Franco BDGM, Landgraf M, Destro MT, Gelli D. Foodborne diseases in Southern South America. In: Miliotis M, Bier J, editors. International Handbook of Foodborne Pathogens. Nova Iorque: Marcel Dekker; 2003. p.733-43.
12. Nero LA, Mattos MR, Beloti V, Barros MAF, Netto DP, Pinto JPAN et al. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and chemical residues. Braz J Microbiol. 2004; 35: 211-5.
13. Olival AA, Spexoto AA, Campos DFS, Ferreira F, Fonseca LFL, Santos MV, et al. Hábitos de consumo do leite informal, associados ao risco de transmissão de doenças, no município de Pirassununga, SP. Rev Hig Aliment. 2002; 16: 35-40.
14. Pan American Health Organization. World Health Organization. In: Proceedings of the 13th Inter-American meeting, at the ministerial level, on health and agriculture; 2003, Washington. [Cited 2009 Oct 22]. Available from: <http://www.paho.org/english/ad/dpc/vp/rimsa13-05-e.pdf>
15. Avila CR, Gallo CR. Survey of *Salmonella* in raw milk, pasteurized milk and Minas Frescal cheese commercialized in Piracicaba, Brazil. Sci Agric. 1996; 53: 159-63.
16. Boor KJ. Pathogenic microorganisms of concern to the dairy industry. Dairy Food Environ Sanit. 1997; 17: 714-7.
17. Beloti V, Barros MAF, Souza JA, Nero LA, Santana EHW, Balarin O, et al. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado em Cornélio Procópio, Paraná. Controle do consumo e da comercialização. Semina. 1999; 20: 12-5.
18. Franco RM, Cavalcanti RMS, Wood PCB, Loretti VP, Gonçalves PMR, Oliveira LAT. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. Rev Hig Aliment. 2000; 14: 70-7.
19. Reed BA, Grivetti LE. Controlling on-farm inventories of bulk tank raw milk -an opportunity to protect public health. J Dairy Sci. 2001; 83: 2988-91.
20. Nero LA, Maziero D, Bezerra MMS. Alimentary habits of raw milk consumer from Campo Mourão - PR. Semina. 2003; 24: 21-6.
21. Sousa DP. Consumo de produtos lácteos informais, um perigo para a saúde pública. Estudo dos fatores relacionados a esse consumo no município de Jacareí – SP [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2005.
22. Vadillo S, Paya MJ, Cutuli MT, Suarez G. Mycoflora of milk after several types of pasteurization. Lait. 1987; 67: 265-73.
23. Lodder L. The yeast: a taxonomic study. 2^a ed. Amsterdam: North Holland Publishing; 1970.
24. Kreeger-Van-Rig NJW. The yeasts: a taxonomic study. 3^aed. Amsterdam: Elsevier Science Publisher; 1984.

25. Barnett HL, Hunter BB. Illustrated genera of imperfect fungi. Minneapolis: Burgess Publishing; 1998.
26. Melville PA, Watanabe ET, Benites NR, Ribeiro AR, Bueno JA, Garino F, et al. Evaluation of the susceptibility of *Prototheca zopfii* to pasteurization of milk. Mycopathologia. 1999; 146: 83-9.
27. Graphpad Instat, 1992-1998: "Software" used for statistical analysis.
28. Anaissie EJ, Bodey GP, Rinaldi MG. Emerging fungal pathogens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1989; 8: 323-30.
29. Vartivarian SE, Anaissie EJ, Bodey GP. Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis, and management. Clin Infect Dis. 1993; 17: 487-91.
30. Larone DH. Medically important fungi. A guide to identification. 3^aed. Washington: ASM Press; 1995.
31. Groll AH, Walsh TJ. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. Clin Microbiol Infect. 2001; 7: 8-24.
32. Gompertz OF, Gambale W, Paula CR, Corrêa B. Micoses oportunistas e outras micoses. In: Trabulsi LR, Alterthum F, editors. Microbiologia. São Paulo: Atheneu; 2005. p.495-9.
33. Todd ECD. Foodborne disease in Canada - a five year summary. J Food Prot. 1983; 46: 650-7.
34. Ritter R, Santos D, Bergmann GP. Análise da qualidade microbiológica de queijo colonial, não pasteurizado, produzido e comercializado por pequenos produtores no Rio Grande do Sul. Rev Hig Aliment. 2001; 15: 51-4.
35. Correia M, Roncada MJ. Características microscópicas de queijos prato, mussarela e mineiro comercializados nas feiras livres da Cidade de São Paulo. Rev Saude Publica. 1997; 31: 296-301.
36. Filho ES, Filho AN. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo Frescal. Rev Saude Publica. 2000; 34: 578-80.
37. Ponsano EHG, Pinto MF, Delbem ACB, Lara JAF, Perri SHV. Avaliação da qualidade de amostras de leite cru comercializado no município de Araçatuba e potenciais riscos decorrentes de seu consumo. Rev Hig Aliment. 2001; 15: 31-8.
38. Torkar KG, Vengust A. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M-1 in raw milk and cheese in Slovenia. Food Control. 2008; 19: 570-7.
39. Melville PA, Ruz-Peres M, Yokoya E, Benites NR. Ocorrência de fungos em leite cru proveniente de tanques de refrigeração e latões de propriedades leiteiras, bem como de leite comercializado diretamente ao consumidor. Arq Inst Biol. 2006; 73: 295-301.
40. Jodral M, Linan E, Acosta I, Gallego C, Rojas F, Bentabol A. Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish milks. Int J Food Microbiol. 1993; 18: 171-4.

Recebido em: 19/11/2008

Aceito em: 02/12/2009