

## O LEITE: COLIMETRIA, FOSFATASIMETRIA E CONTAGEM GLOBAL

Considerações a respeito da detenção de irregularidades na linha de pasteurização do leite, pela utilização das provas colimétricas das diluições e concentrações crescentes

ALEXANDRE MELLO FILHO (\*)

No vasto *menu* que a natureza pôs ao alcance do homem para que renovasse as energias gastas na luta pela vida ou para que servisse de argamassa de constituição de seu próprio organismo, na fase de crescimento, o leite, como alimento plástico, tem o primado indiscutível.

Nosso regime alimentar é classicamente, desde os tempos coloniais, senão proteoprivo, pelo menos hipoprotéico. Há os que pleiteiam a favor de uma alimentação pobre em carnes e ovos sob a afirmativa de que a proteinização da alimentação, que se vem verificando nos países de maior vitalidade econômica, se acompanha de uma patologia especial, com predomínio da hipertensão arterial e do diabetes.

Há, também, os que invocam o vasto capítulo de afecções proteinopênicas, em que avultam o edema de fome e a tuberculose, e sob o aspecto morfológico a pequenez da estatura e o atraso da puberdade. Não importam questões doutrinárias ou polemizações de tipo acadêmico. O certo é que, de todos os tempos, na construção do edifício animal, e na manutenção equilibrada do seu funcionamento, o leite é matéria prima definitiva. Até no mundo microscópico é o leite substrato de extraordinário potencial nutritivo, pois constitui para a imensa e variada flora microbiana, fator eugenético de crescimento e difusão.

---

(\*) Bacteriologista da Cooperativa Central de Laticínios. Médico do Hospital Municipal e Assistente da 6.<sup>a</sup> Medicina de Homens do Hospital Central da Santa Casa (Serviço do Dr. Alexandre Mello).

Recebido para publicação em 20 de dezembro de 1960.

Junte-se ao fato, circunstância de que, pelas suas próprias condições de produção, em fonte animal, em ambiente de higiene primitiva, inevitavelmente é o leite um vasto caudal onde crescem e se reproduzem assustadoramente centenas de milhares de células bacterianas, em ondas que se sucedem a cada quarto de hora, de novas gerações de extrema prolificidade (FOSTER & col., 1957; HAMMER & col., 1957). É a flora banal do leite, germinações pacíficas que apenas atuam sobre a qualidade do produto, a sua conservação, o seu organoleptismo. Mas há também a interferência da flora de luta, dos patogênicos, que promovem incursões devastadoras e mortíferas contra a sobrevivência humana. Entre nós, em 1938, MELLO & MASTROFRANCISCO evidenciaram a presença do bacilo da tuberculose vivo e virulento, no leite de consumo da Capital, entregue cru à população. Pouco tempo após, RANGEL PESTANA (1942), publicava o resultado de suas verificações, tendo isolado o *Mycobacterium tuberculosis* do líquido céfalorraqueano de crianças com meningite tuberculosa. E esse germe era de origem bovina. Esses trabalhos, feitos na mesma época, fecham o ciclo e caracterizam perfeitamente a perigosa decorrência das contaminações de um produto alimentar que é o principal artifice da criação da vida humana e animal. Note-se que, por feliz circunstância, o bacilo da tuberculose não tem a propriedade de se reproduzir no leite (Stand. meth. exam. dairy prod., 1953). Esta foi uma citação a êsmo, porque muitos capítulos da patologia poderiam ser desdobrados com enumerações desse tipo, objetivando outros morbos. É nesta altura que intervém a função saneadora e salvadora da pasteurização, cujo efeito fundamental, como técnica industrial, incluída no domínio dos preceitos bromatológicos, é, não só a profilaxia das contaminações humanas, como, também, a transmissão ao produto da durabilidade necessária à distribuição e ao consumo. Segundo VILLARES (1959), os resultados obtidos na estação Experimental de Laticínios de Hillerod, na Dinamarca, pelos processos recentes de pasteurização, na destruição de 99,4 a 99,99 por cento dos germes banais e 100 por cento dos germes patogênicos do leite, com leves modificações nas proteínas solúveis, vitaminas e outros elementos termolábeis, recebem contínuas confirmações em diferentes centros de investigações científicas de várias partes do mundo. Em São Paulo, com maquinaria moderna, a grande maioria das indústrias, empregando o processo de pasteurização rápida com aquecimento a 73-75° C, no período de 15 a 20 segundos, de acordo com

ROGICK (1959), cem por cento dos germes patogênicos do leite e cerca de 99,8 a 99,9 por cento dos germes banais são destruídos. Pelo exposto, chega-se à conclusão de que é o objetivo primordial dos Serviços de Saúde Pública, promover a distribuição de um produto de acurado padrão organoléptico e baixo teor microbiano, porque, embora uma elevada contagem não prove, obrigatoriamente, a presença de bactérias patogênicas, indica, certamente, a ação isolada ou conjunta de fatores diversos tais como: a contaminação na fonte de origem, transporte sob insatisfatórias condições de frigorificação, pasteurização tecnicamente deficiente ou recontaminação posterior ao beneficiamento (MELLO FILHO, 1958; MELLO, 1943). Entretanto, sabe-se que o Regulamento Federal (Reg. Insp. Ind. — Serv. Inf. Agric., 1953), não tem padrão determinado para o leite cru quanto aos coliformes e à contagem global, estipulando apenas que o produto não descobre o azul de metileno (prova da redutase), em tempo inferior a duas horas e meia. Não obstante, em várias cidades da França, Noruega e dos Estados Unidos, adota-se um apurado padrão bacterimétrico de 100.000 germes por ml, embora refira VILLARES (1959), a frequência com que esse severo índice é atingido ou suplantado. Na Itália e Bélgica, contém o leite cru, em média, 13 milhões de germes por ml e no Egito (Alexandria), e nas Ilhas da Madeira (Funchal), um achado de 150 milhões é fato comum (VILLARES, 1959). Em São Paulo, em 1943, consignava MELLO, os valores de 50 a 100 milhões, e, atualmente, para o leite vindo das fazendas, nos entrepostos do interior, e para o produto chegado à Capital, verifica-se, em média, o teor microbiano de 8 a 30 milhões, respectivamente, o que não deixa dúvidas quanto à melhora verificada na qualidade do leite. Também o índice limite, estipulado para o leite tipo C — 300.000 germes por ml — tornou-se um valor extremamente complacente em virtude dos aperfeiçoamentos tecnológicos do beneficiamento e higiênico-sanitários na produção. De fato, estatísticas elaboradas por técnicos do Departamento da Produção Animal, revelaram que 98,8% do produto examinado apresentaram contagem inferiores a 100.000 germes por ml, um padrão adotado em muitas nações do mundo, e que 91,1% das amostras do leite tipo C mostraram a ausência de coliformes em 0,1 ml, índice idêntico ao exigido em muitos países mais avançados em questões de laticínios (VILLARES, 1959; ROGICK, 1959).

## OBJETIVOS DESTA PUBLICAÇÃO

Feitas estas considerações iniciais, passaremos ao assunto dêste trabalho, que constará de uma breve recapitulação dos processos colimétricos e fosfatasimétricos comumente empregados nos laboratórios de contrôle sanitário do leite, com um estudo crítico a respeito e comparativo em relação a um outro processo colimétrico, o das diluições e concentrações crescentes, por nós proposto em 1951 (MELLO FILHO, 1951), ilustrado por exemplos que não deixam dúvidas quanto à superioridade destas últimas provas na detenção de irregularidades na linha de pasteurização, e, principalmente, na promoção da sua profilaxia. Segue-se uma análise comparativa das estatísticas numéricas das contagens globais em ágar padrão, em relação aos índices colimétricos.

Como fecho, um breve ensaio experimental, fazendo o confronto do valor da colimetria e da fosfatasimetria na acuidade da determinação de pequenos desvios da técnica de pasteurização, traduzindo-se por subpasteurização, e da recontaminação do leite devidamente beneficiado dentro do próprio pasteurizador, através da mistura indevida com pequenas frações do leite cru, que, nestas condições, agiria como um verdadeiro "inoculum".

## COLIMETRIA E FOSFATASIMETRIA — PROCESSOS ROTINEIROS

Desde que não seja viável o emprêgo de métodos rotineiros de contrôle e identificação da presença ocasional de germes patogênicos, como índice de um tratamento higiênico adequado, convencionou-se utilizar o teste da verificação da presença presuntiva dos coliformes no leite e a prova química da fosfatase, como evidência da eficiência maior ou menor dos trabalhos executados.

De fato, os germes patogênicos mais comuns, excluídos os esporulados, são destruídos a temperaturas inferiores àquelas requeridas para eliminar os coliformes e inativar a fosfatase, um fermento termolábil que ocorre normalmente no leite cru.

Verifica-se, pois, que um teste negativo, indicando a destruição da fosfatase no leite beneficiado, não só é uma certeza da ausência de germes patogênicos, como uma afirmativa do tratamento térmico adequado; podendo igualmente a fosfatase revelar recontaminações posteriores pela mistura com quantidades detectáveis de leite cru.

Pelas mesmas razões, não sobrevivendo os coliformes, em número apreciável, a uma pasteurização bem conduzida, o teste positivo

indica sempre uma recontaminação, sendo a prova tão seletiva que permite a detenção daqueles microorganismos mesmo quando se constituam pequena percentagem da flora global.

Em face do exposto, conclui-se que, com a prova da fosfatase como índice de adequada pasteurização e o teste para coliformes como afirmativa de recontaminação, poderemos, seguramente, ter uma poderosa visão de conjunto de toda a linha de pasteurização e uma acurada noção topográfica da sua sanidade segmentar.

Entendendo-se por pasteurização a destruição total da flora patogênica com redução do teor microbiano global, sem prejuízo sensível nas propriedades físico-químicas, bioquímicas e organolépticas do produto, passaremos a analisar o leite tipo C, objeto dos nossos estudos, que obedece, como já foi visto, às seguintes determinações regulamentares: ausência de coliformes em 0,1 (um décimo) de ml; contagem global inferior a 300.000 germes por ml; e controle obrigatório do teor enzimático em fosfatase e peroxidase (Reg. Insp. Ind. — Serv. Inf. Agric., 1953; LOPES, 1954).

É da rotina dos serviços de controle sanitário do leite, para a colimetria, a semeadura do produto em meio bile-lactose-verde brilhante, com tubos de Durham invertidos, lidos os resultados após 48 horas,  $\pm$  3 horas, de permanência em estufa a 32-35 ° C (Stand. meth. exam. dairy prod., 1953).

Para a contagem da flora global semeia-se o leite em placas de gelose padrão. Entretanto, é importante salientar o caráter de estimativa destes dois métodos, sujeitos a erros frequentes dos quais o principal é o originado pela imperfeita distribuição das bactérias na amostra examinada, causando, portanto, pela sua maior ou menor densidade na parcela semeada, falsos resultados positivos, ou enganadoras respostas negativas.

Dêste conceito, tira-se a noção da obrigatoriedade da extensão dos exames ao maior número possível de frações da amostra em estudo.

De fato, exemplificando, suponhamos que uma dada amostra contenha 1 coliforme por ml, nessas condições cerca de 37 por cento dos tubos de fermentação contendo 1 ml podem acusar resultados negativos, o que não acontece se lançarmos mão do concurso de 5 tubos, semeados com 1 ml (Stand. meth. exam. dairy prod., 1953; Stand. meth. exam. water..., 1955).

Com a utilização dos 5 tubos, em apenas 1 por cento dos casos ocorreria um resultado completamente negativo, mas, mesmo nessas

condições, a precisão dos resultados obtidos não é de alta ordem, obrigando o analista a grande ponderação quando se interpretam, em termos de significação sanitária, os resultados obtidos com a utilização de poucos tubos em cada diluição da amostra (Stand. meth. exam. dairy prod., 1953; Stand. meth. exam. water..., 1955).

Pela mesma razão, para a maior acuidade na avaliação dos resultados consignados, faz-se necessário o exame seriado do produto pelo menos em 3 ou 4 amostras, colhidas em dias diferentes, em busca de um resultado médio (Stand. meth. exam. dairy prod., 1953).

Na verdade, o próprio Regulamento estipula que as sanções a serem aplicadas no caso de discordância com o texto legal, ultrapassando o padrão permitido, devam aguardar a totalização de 3 análises sucessivas, ou 5 interpoladamente em discordância, no período de um mês, o que além de tudo, permitiria as providências saneadoras necessárias.

Na rotina dos serviços públicos de contróle sanitário do leite, tomam-se amostras em cinco situações diferentes: 1.º — no tanque de recepção do leite cru; 2.º — na torneira do pasteurizador (nos processos rápidos, após a refrigeração); 3.º — nos tanques estoques; 4.º — na máquina de engarrafar; 5.º — na máquina para colocação de tampas (MELLO FILHO, 1951; LOPES, 1950).

Esta segmentação da linha de pasteurização tem a vantagem de oferecer, ao analista, indicação exata, topográfica, da contaminação do produto já beneficiado, e, se o mesmo foi convenientemente pasteurizado, facilitando o tratamento local higienizador, através dos processo mecânicos, físicos e químicos conhecidos.

No contróle dos coliformes do leite pasteurizado, tipo C, para o produto colhido no próprio pasteurizador e nos tanques estoques, segue o órgão oficial competente, o método da sementeira em 1,3 ou 5 tubos de fermentação, nas parcelas de 0,1 e 1 ml, e 0,1 e 0,2 ml para o produto quando engarrafado.

Na interpretação dos resultados, a verificação nessa série, de um só tubo gaseificado, é o suficiente para estabelecer, por motivos lógicos, baseados na interpretação do texto da lei, a presença presuntiva indesejável do coliforme.

Essa resposta presuntiva pode-se transformar como informação adicional, em tradução exata, pelo exame completado, pela sementeira dêsse material em meios especiais de identificação, com a devida exclusão da presença de esporulados. Desde que mais de

## ESTIMATING COLIFORM GROUP DENSITY

TABLE 21b—TABLE OF PROBABLE NUMBERS (MPN) PER 100 ML OF SAMPLE  
Using 5 Tubes

With 10, 1 and 0.1 ml Volumes

POS *	MPN	POS *	MPN	POS *	MPN	POS *	MPN	POS *	MPN	POS *	MPN
10 1 0.1		10 1 0.1		10 1 0.1		10 1 0.1		10 1 0.1		10 1 0.1	
0 0 0	0	1 0 0	2	2 0 0	4.5	3 0 0	7.8	4 0 0	13	5 0 0	23
0 0 1	1.8	1 0 1	4	2 0 1	6.8	3 0 1	11	4 0 1	17	5 0 1	31
0 0 2	3.6	1 0 2	6	2 0 2	9.1	3 0 2	13	4 0 2	21	5 0 2	43
0 0 3	5.4	1 0 3	8	2 0 3	12	3 0 3	16	4 0 3	25	5 0 3	58
0 0 4	7.2	1 0 4	10	2 0 4	14	3 0 4	20	4 0 4	30	5 0 4	76
0 0 5	9	1 0 5	12	2 0 5	16	3 0 5	23	4 0 5	36	5 0 5	95
0 1 0	1.8	1 1 0	4	2 1 0	6.8	3 1 0	11	4 1 0	17	5 1 0	33
0 1 1	3.6	1 1 1	6.1	2 1 1	9.2	3 1 1	14	4 1 1	21	5 1 1	46
0 1 2	5.5	1 1 2	8.1	2 1 2	12	3 1 2	17	4 1 2	26	5 1 2	64
0 1 3	7.3	1 1 3	10	2 1 3	14	3 1 3	20	4 1 3	31	5 1 3	84
0 1 4	9.1	1 1 4	12	2 1 4	17	3 1 4	23	4 1 4	36	5 1 4	110
0 1 5	11	1 1 5	14	2 1 5	19	3 1 5	27	4 1 5	42	5 1 5	130
0 2 0	3.7	1 2 0	6.1	2 2 0	9.3	3 2 0	14	4 2 0	22	5 2 0	49
0 2 1	5.5	1 2 1	8.2	2 2 1	12	3 2 1	17	4 2 1	26	5 2 1	70
0 2 2	7.4	1 2 2	10	2 2 2	14	3 2 2	20	4 2 2	32	5 2 2	95
0 2 3	9.2	1 2 3	12	2 2 3	17	3 2 3	24	4 2 3	38	5 2 3	120
0 2 4	11	1 2 4	15	2 2 4	19	3 2 4	27	4 2 4	44	5 2 4	150
0 2 5	13	1 2 5	17	2 2 5	22	3 2 5	31	4 2 5	50	5 2 5	180
0 3 0	5.6	1 3 0	8.3	2 3 0	12	3 3 0	17	4 3 0	27	5 3 0	79
0 3 1	7.4	1 3 1	10	2 3 1	14	3 3 1	21	4 3 1	33	5 3 1	110
0 3 2	9.3	1 3 2	13	2 3 2	17	3 3 2	24	4 3 2	39	5 3 2	140
0 3 3	11	1 3 3	15	2 3 3	20	3 3 3	28	4 3 3	45	5 3 3	180
0 3 4	13	1 3 4	17	2 3 4	22	3 3 4	31	4 3 4	52	5 3 4	210
0 3 5	15	1 3 5	19	2 3 5	25	3 3 5	35	4 3 5	59	5 3 5	250
0 4 0	7.5	1 4 0	11	2 4 0	15	3 4 0	21	4 4 0	34	5 4 0	130
0 4 1	9.4	1 4 1	13	2 4 1	17	3 4 1	24	4 4 1	40	5 4 1	170
0 4 2	11	1 4 2	15	2 4 2	20	3 4 2	28	4 4 2	47	5 4 2	220
0 4 3	13	1 4 3	17	2 4 3	23	3 4 3	32	4 4 3	54	5 4 3	280
0 4 4	15	1 4 4	19	2 4 4	25	3 4 4	36	4 4 4	62	5 4 4	350
0 4 5	17	1 4 5	22	2 4 5	28	3 4 5	40	4 4 5	69	5 4 5	430
0 5 0	9.4	1 5 0	13	2 5 0	17	3 5 0	25	4 5 0	41	5 5 0	240
0 5 1	11	1 5 1	15	2 5 1	20	3 5 1	29	4 5 1	48	5 5 1	350
0 5 2	13	1 5 2	17	2 5 2	23	3 5 2	32	4 5 2	56	5 5 2	540
0 5 3	15	1 5 3	19	2 5 3	26	3 5 3	37	4 5 3	64	5 5 3	920
0 5 4	17	1 5 4	22	2 5 4	29	3 5 4	41	4 5 4	72	5 5 4	1600
0 5 5	19	1 5 5	24	2 5 5	32	3 5 5	45	4 5 5	81	5 5 5	2400+

(\*) Number of positive tubes with each of 3 volumes used.

TABELA N.º 1 — Tabela dos mais prováveis números (M.P.N.), de coliformes, em 100 ml da amostra, usando 5 tubos (Stand. meth. exam. dairy prod., 1953).

um organismo coliforme possa ser responsável pela positividade de cada tubo, muitas vezes além da análise qualitativa, lança-se mão da pesquisa quantitativa, baseada no princípio de que o provável número dos organismos é uma função logarítmica dos resultados, quando as frações testadas são da ordem decimal (Stand. meth. exam. dairy prod., 1953; Stand. meth. exam. water..., 1955).

Para tanto, é suficiente semear o leite em uma série de 3 ou 5 tubos, nas quantidades de 0,1, 1 e 10 ml, e procurar interpretar os resultados de acordo com tabelas preexistentes, indicativas dos mais prováveis números (M.P.N.), de coliformes em 100 ml, segundo HOSKINS (1933, 1934), e os trabalhos básicos de MAC-CRADY (1915, 1918).

O emprêgo dêste processo fornece, na maioria das vezes, uma boa noção do grau da poluição da amostra examinada, mas leva, ao nosso ver, o analista ao encontro de uma série de resultados paradoxais. De fato, entre a primeira possibilidade — 15 tubos negativos — índice de zero coliformes em 100 ml e a extrema — 15 tubos positivos — tradução da presença de 2.400 ou mais organismos, existem na tabela valores gradativamente mais ou gradativamente menos em contraposição com o critério do bom senso, chegando a ser admitida a possibilidade de resultados acusando 5 tubos positivos para 0,1 ml e os demais completamente negativos para as quantidades maiores de 0,1 e 10 ml.

Porém, na prática corrente, estas incongruências não são observadas e a tabela funciona, para a média dos casos, perfeitamente.

### O MÉTODO COLIMÉTRICO DAS DILUIÇÕES E CONCENTRAÇÕES CRESCENTES

Os processos vistos, adotados, visando o controle do teor de coliformes, quer o qualitativo da presença presuntiva ou completo, e mesmo o quantitativo (M.P.N.), apenas registram a situação atual dessa flora, a sua presença no momento do exame e portanto quando o leite pasteurizado já se acha, "ipso facto", contaminado. Entretanto, as leituras das amostras são feitas após 48 horas da semeadura e, mesmo que pudessem ser efetuadas imediatamente, como no método de Breed, não sendo permitido a repasteurização do produto, o mesmo seria entregue ao consumo em contravenção às exigências regulamentares.

As providências decorrentes dos exames são sempre "a posteriori", para o leite do dia ou dos dias seguintes. De modo que, a



instituição de um processo que permitisse a previsão dos resultados, de maneira a entreter o leite estritamente dentro dos padrões legais; ou, mesmo, com uma apreciável margem de segurança mantida acima das limitações regulamentares, seria de inestimável valia, sobretudo levando-se em conta o fato de que as disposições da lei estabelecem uma rigorosa e contínua vigilância sobre toda a linha de beneficiamento do produto.

### O MÉTODO DAS CONCENTRAÇÕES CRESCENTES

Ao lado da técnica comum da sementeira em bile-lactose-verde brilhante, do leite pasteurizado colhido nos pontos clássicos — torneira do pasteurizador (T.P.), tanque estoque (T.E.), leite engarrafado (L.E.) — e submetido às diluições de rotina, fazemos, também, a sementeira dessas mesmas amostras, *não diluídas*, ao contrário, em concentrações crescentes, em 3 tubos para cada sementeira, a razão de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 ml e lidas nas mesmas condições, após 48 h em estufa a 35° C. Os métodos que trabalham com leite diluído — rotina dos laboratórios — informam sobre as condições atuais do beneficiamento, sobre a eficiência da máquina pasteurizadora no ato do beneficiamento do produto ou a acuidade da higienização das canalizações, dos tanques-estoques, das máquinas de engarrafar.

Os resultados obtidos pelo método das concentrações crescentes, procedido num leite "in natura", não diluído, propõe-se a esclarecer sobre a situação de toda a linha de pasteurização prevendo, com 24, 48, 72 horas de antecipação, os desvios que o teor colimétrico do leite irá sofrer, possibilitando, em consequência, as devidas providências.

Realmente, no processo comum das diluições, de acordo com os resultados obtidos, o leite é classificado como correspondendo ou não ao padrão legal sem outra qualquer solução, sujeitando-se as usinas às sanções legais. Resultados satisfatórios de um dia não permitem para o dia seguinte, nem sequer para o mesmo dia, em outro ciclo de pasteurização, ou, até em outra amostra do mesmo leite, verificações idênticas, podendo haver largas flutuações nas leituras.

Pelo método das concentrações, por nós proposto em 1951 (MELLO FILHO, 1951), tais surpresas desaparecem, o trabalho do beneficiamento do leite corre em segurança na previsão estudada dos resultados futuros. Sementeado o leite em concentrações crescentes

tes: 0,1 - 1 - 2 - 4 - 6 - 8 - 10 ml, e até mais, vai-se obter um teto de segurança fixado pelo tubo anterior àquele que resultou positivo.

Obtida a gasogenia, usando os coliformes como teste, *v.g.*, no tubo de 8 ml de leite, o teto de segurança estará na altura do tubo de 6 ml, sendo as sementeiras de 0,1 - 1 - 2 - 4 - 6 chamadas de margem de segurança do produto e 6 ml o teto de segurança do beneficiamento do produto.

À proporção que o teto vai baixando, diminuindo portanto a margem de segurança, serão intensificados os trabalhos de desinfecção da aparelhagem, a regulação mais exata da temperatura e da velocidade de trânsito. Dentro desse critério, o leite beneficiado de um dia é o teste da eficiência do beneficiamento do dia subsequente. Com um teto de segurança mantido em bom nível, na altura de 4 a 6 ml de leite, os trabalhos das usinas correrão com satisfatória margem de garantia. Excluída a possibilidade de ocorrências de momento, de maior gravidade, quer nos parecer que o método funciona com razoável regularidade e eficiência. Transcrevendo uma ficha do nosso assentamento, relativo a um exame global do leite temos o seguinte.

Ficha n.º 85 —

1.º segmento — Leite cru, de Roseira, tipo C.

10 milhões de colônias por ml (em placa de gelose-padrão).

Coliformes positivos em 1 x 100.000 e 1 x 1 milhão.

Coliformes negativos em 1 x 10 milhões.

Prova da peroxidase +++

2.º segmento — T. P. (Pasteurizador).

Método comum das diluições: coliformes negativos em 5 tubos a 0,1 ml.

Método das concentrações:

a) Margem de segurança: coliformes negativos em 1 - 2 - 4 - 6 ml;  
coliformes positivos em 8 ml.

b) Teto de segurança: igual a 6 ml.

3.º segmento — T. E. (Tanque estoque).

Método comum das diluições: coliformes negativos em 5 tubos a 0,1 ml.

Método das concentrações:

- a) Margem de segurança: coliformes negativos em  
1 - 2 - 4 ml;  
coliformes positivos em  
em 6 e 8 ml.
- b) Teto de segurança: igual a 4 ml.

4.º segmento — L. E. (Leite engarrafado).

12.000 colônias por ml.

Método comum das diluições: coliformes negativos  
em 5 tubos a 0,1 ml.

Método das concentrações crescentes:

- a) Margem de segurança: coliformes negativos em  
1 - 2 - 4 ml;  
coliformes positivos em  
6 - 8 ml.
- b) Teto de segurança: igual a 4 ml.

Prova da peroxidase: ++

Prova da fosfatase: menos de 1 unidade azul Scharer.

Verifica-se o elevado teor da margem de segurança. Em caso de pioramento progressivo das condições higiênicas da linha de pasteurização, muito antes de as deficiências se exteriorizarem com os resultados do método das diluições, começam a incidir sobre os índices do método das concentrações crescentes, rebaixando o teto de segurança, dando margem suficiente para as medidas corretivas, nos setores indicados pelos resultados das respectivas amostras. Exemplificando:

Ficha n.º 182 —

1.º segmento — Leite cru de Jacareí, tipo C.

15 milhões de colônias por ml.

Coliformes positivos em 1 x 100.000 e 1 x 1 milhão.

Coliformes negativos em 1 x 10 milhões.

Prova da peroxidase: +++

2.º segmento — T. P.

Método das diluições: coliformes negativos em 5  
tubos a 0,1 ml.

Método das concentrações:

- a) Margem de segurança: coliformes negativos em  
1 - 2 - 4 - 6 - 8 ml;  
coliformes positivos em  
10 ml.
- b) Teto de segurança: igual a 8 ml.

3.º segmento — T. E.

Método das diluições: coliformes negativos em 5 tubos a 0,1 ml.

Método das concentrações:

a) Margem de segurança: coliformes negativos em 1 - 2 - 4 ml;  
coliformes positivos em 6 - 8 - 10 ml.

b) Teto de segurança: igual a 4 ml.

4.º segmento: L. E.

13.000 colônias por ml.

Método das diluições: coliformes negativos em 5 tubos a 0,1 ml.

Método das concentrações:

a) Margem de segurança: coliformes negativos em 1 - 2 ml;  
coliformes positivos em 4 - 6 - 8 - 10 ml.

b) Teto de segurança: igual a 2 ml.

Prova da peroxidase: ++

Prova da fosfatase: menos de 1 unidade Scharer.

Teto de segurança igual a 8 ml no 2.º segmento, a 4 ml no 3.º segmento e igual a 2 ml no 4.º segmento. Contaminação localizada no trecho correspondente à canalização que transporta leite do pasteurizador aos tanques de estoque ou nestes. Essa conclusão não poderia ser feita sob a orientação das provas simples das diluições, que apenas acusou:

2.º segmento: T. P. — Coliformes negativos em 5 tubos a 0,1 ml.

3.º segmento: T. E. — Coliformes negativos em 5 tubos a 0,1 ml.

4.º segmento: L. E. — Coliformes negativos em 5 tubos a 0,1 ml.

O leite teria sido dado como de bom teor colifórmico, não se podendo suspeitar da anomalia, ocorrente em caráter progressivo, até o momento em que se apresentasse na diluição de 0,1 ml, o que o retira do padrão mínimo exigido. O método das concentrações é preventivo, faz a profilaxia das infrações regulamentares; o método das diluições é o método dos fatos consumados. Nos casos

porém em que o teste presuntivo para o coliforme seja positivo já nas diluições habituais — 0,1 ml para o leite tipo C — desaparecem as indicações do método das concentrações proposto, que já não terá aplicação. Sucede freqüentemente, que, apesar de todos os cuidados e da atenção a todos os requisitos de ordem técnica, a presença de coliformes persiste, não havendo recursos, nas rotinas usadas, para prever a evolução da melhoria ou da piora de tal situação.

### O MÉTODO DAS DILUIÇÕES CRESCENTES

A fim de atender a êsse aspecto do problema é que propusemos o método das superdiluições, que é exatamente um processo inverso ao das concentrações crescentes. Nêle usam-se diluições inferiores às habituais, em busca das margens de segurança negativa e do teto de segurança negativo. À proporção que a negatividade do teste fôr correndo, os tubos, de baixo para cima, da diluição menor para a maior, estamo-nos aproximando da normalidade funcional da aparelhagem e êsses resultados guiam e orientam os trabalhos de desinfecção e regulação da pasteurização. Pelo método rotineiro das diluições, comumente adotado, obteríamos sempre a cada medida higiênica indicada, um inexpressivo resultado: coliformes positivos em 5 tubos e 0,1 ml. É bem verdade que, dificilmente, na prática corrente, chega-se a empregar o processo das superdiluições, pois as medidas saneadoras costumam ser rápidas e de tal modo efetivas que se fazem sentir imediatamente após o resultado desfavorável que colocou o leite fora do padrão. Com a utilização rotineira, desde 1950, do método das concentrações crescentes, em o nosso laboratório de contrôlê sanitário do leite, na Cooperativa Central de Laticínios, abrangendo pois um decênio de observações, não pudemos deixar de consignar a excelência do processo na prática corrente, e, principalmente, quanto à sua finalidade profilática. Pela orientação que adotamos, semeando o leite tipo C, em série de 21 tubos em escala crescente — 0,1 - 1 - 2 - 4 - 6 - 8 - 10 ml — , com três tubos de fermentação para cada valor, promovemos a fusão harmoniosa dos três métodos: o qualitativo, da presença presuntivo, o quantitativo, que estabelece o mais provável número, e o profilático, das concentrações crescentes, num verdadeiro "check-up" da linha de pasteurização. A leitura dos mais prováveis números, com o emprêgo de 3 tubos, pela utilização das sementeiras de 0,1 — 1 e 10 ml, contidas naquela série, é interpretada por tabela especial, correspondente, que passamos a transcrever:

TABLE 21c—TABLE OF MOST PROBABLE NUMBERS (MPN)  
PER 100 ML OF SAMPLE

Using 3 Tubes  
With 10, and 0.1 ml Volumes

No. of positive tubes in dilutions			MPN per 100 ml.	No. of positive tubes in dilutions			MPN per 100 ml.
10 ml.	1 ml.	0.1 ml.		10 ml.	1 ml.	0.1 ml.	
0	0	0		2	0	0	9.1
0	0	1	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	20
0	0	3	9	2	0	3	26
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6.1	2	1	1	20
0	1	2	9.2	2	1	2	27
0	1	3	12	2	1	3	34
0	2	0	6.2	2	2	0	21
0	2	1	9.3	2	2	1	28
0	2	2	12	2	2	2	35
0	2	3	16	2	2	3	42
0	3	0	9.4	2	3	0	29
0	3	1	13	2	3	1	36
0	3	2	16	2	3	2	44
0	3	3	19	2	3	3	53
1	0	0	3.6	3	0	0	23
1	0	1	7.2	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	64
1	0	3	15	3	0	3	95
1	1	0	7.3	3	1	0	43
1	1	1	11	3	1	1	75
1	1	2	15	3	1	2	120
1	1	3	19	3	1	3	160
1	2	0	11	3	2	0	93
1	2	1	15	3	2	1	150
1	2	2	20	3	2	2	210
1	2	3	24	3	2	3	290
1	3	0	16	3	3	0	240
1	3	1	20	3	3	1	460
1	3	2	24	3	3	2	1100
1	3	3	29				

TABELA N.º 2 — Tabela dos mais prováveis números (M.P.N.), de coliformes, em 100 ml da amostra, usando 3 tubos (Stand, Meth. exam. water..., 1955).

Como ficou consignado, perfazemos então, uma série de 21 tubos utilizando 3 tubos para cada volume semeado e estabelecendo o resultado pela leitura da parcela maior à menor.

10 +++ 8 ++- 6 +-- 4 ---- 2 ---- 2 ---- 0,1 ----

O teto de segurança no caso, é o de 4 ml e a margem de 0,1 a 4 ml. Às vezes, entretanto, podem surgir situações aparentemente incongruentes, como a que vamos apresentar:

10 +++ 8 ++- 6 ---- 4 +-+ 2 ---- 1 ---- 0,1 ----

Fazemos a leitura estabelecendo em 2 ml o teto de segurança, pois, de acôrdo com o critério do próprio "Standard Methods", quando duas ou mais amostras são comparadas, a que melhor indica a estimativa microbiana, possivelmente também será a que mais bactérias contém. Transportando o raciocínio para o caso presente, o tubo contendo 6 ml de leite falhou na sua ação de vigilância, pela irregular distribuição dos coliformes, embora contendo uma parcela maior do material semeado. Não se pode, entretanto, negar, em comparação com êsse resultado negativo, que o tubo seguinte — 4 ml — gaseificou-se porque havia, presuntivamente, presença de coliformes. Para determinar, nos exemplos apontados, o mais provável número de coliformes, procuramos nos valer da tabela correspondente, lembrando que, se os três tubos contendo 10 ml haviam-se positivado, os demais se mostraram negativos tanto para 1 como para 0,1 ml (3/3, 0/3, 0/3). Encontramos, como resultante, o M.P.N. de 23 coliformes por 100 ml ou sejam 2,3 por 1,0 ml.

Com a utilização de 5 tubos, em circunstâncias semelhantes, isto é, 5 tubos positivos para 10 ml e os demais negativos, verificamos, na tabela adequada, que o número encontrado é o mesmo. A identidade de valores entre as duas verificações, no entanto, como facilmente pode ser verificado pela comparação dos dados das tabelas do M.P.N., usando 3 e 5 tubos, nem sempre é absoluta, sendo mais comum obterem-se resultados aproximados, embora bastante coerentes (ver tabela n.º 1 e 2).

Entretanto, ao expor o método por nós idealizado, encontramos muitas vêzes a argumentação de que a prova é excessivamente dispendiosa, por se valer de 21 tubos e que com 9 tubos de fermentação (M.P.N. usando 3 tubos para cada volume semeado), ou mesmo 15 tubos (M.P.N. usando 5 tubos), pode-se realizar operação semelhante, de caráter igualmente profilático, baseado no aumento numérico progressivo dos coliformes. Realmente, à primeira vista a argumentação é poderosa, mas, pela longa prática adquirida a respeito, sabemos que o método do M.P.N. também dotado de clarividência, nem sempre conseguiu detectar, com precisão, as situações anômalas ocorridas, acusadas exclusivamente pelo processo das concentrações crescentes. Documentaremos a afirmativa com fato ocorrido na secção de tanques-estoques da Cooperativa Central de Laticínios. Como rotina de laboratório, colhemos e semeamos amostras do leite cru, pasteurizado, dos tanques, e, no engarrafamento, com resultados coerentes em situações normais. Entretanto, certa ocasião, ao examinarmos tanques-estoques, obser-

vamos um resultado divergente: sete tanques isotérmicos, em média, apresentando os seguintes dados:

10 ++++ 8 +++- 6 ---- 4 ---- 2 ---- 1 ---- 0,1 ----  
(M.P.N. igual a 23 coliformes em 100 ml).

Porém, já para o oitavo recipiente da série, recebendo o mesmo leite pasteurizado, a resposta coliforme foi bem diferente, denotando evidência de contaminação no local.

10 ++++ 8 ++++ 6 ++++ 4 +- 2 ---- 1 ---- 0,1 ----  
(M.P.N. igual a 23 coliformes em 100 ml).

Com os valores apresentados à luz da tabela do M.P.N., encontramos o mesmo e inexpressivo índice numérico - 23 coliformes -, sem evidenciar o ocorrido, o que vem demonstrar que entre 10 e 1, ou 0,1 ml, existe um intervalo silencioso muito grande, só funcionando ativamente o processo do M.P.N. quando os coliformes já estão positivando 1,0 ml ou 0,1 ml, o que também retira o leite do padrão exigido. Para maior exatidão da pesquisa do M.P.N., procuramos também semear os valores 10 - 1 e 0,1 ml em 5 tubos de fermentação encontrando igualmente o índice 23 (5/5 - 0/5 - 0/5), para toda a série de tanques. Persistindo a anomalia apresentada, durante toda uma semana de exames, e ainda mais, havendo nítido pioramento da situação pela retração, cada vez maior, da margem de segurança, que rapidamente se aproximava dos valores 1 e 0,1 ml, procuramos estabelecer, no setor apontado (tanque 8), uma ação saneadora enérgica, controlando a eficiência da higienização local, pelo artifício da sementeira de água esterilizada, derramada como teste nas paredes do tanque o que resultou negativo para presença de coliforme, mesmo nos volumes de 10 ml. Entretanto, apesar da excelência da sanitização efetuada, a situação perdurava, denunciada, firmemente, pela escala das concentrações crescentes sob o silêncio das outras provas colimétricas. Confiados, entretanto, na indicação do nosso método, intensificamos a vigilância sobre o setor afetado, e, numa pormenorizada inspeção local, penetramos no interior do próprio tanque, um espaçoso recipiente cônico horizontal. E, finalmente, detectamos a incorreção, pela presença, teoricamente impossível, de uma gota de leite naquela imensidão higienizada. Surgia lentamente do corpo cilíndrico do eixo sustentador da hélice de homogeneização, colocado na parte central do tanque (ver fig. n.º 1). Retirada, tornava insistentemente a se formar, mostrando provir da parte ôca daquela haste. Estava resolvida a questão. Desmontada a peça, verificou-se a existência de



discreta efração longitudinal que permitia a progressão ascensional do leite, dentro do extenso eixo ôco, obedecendo ao princípio dos vasos comunicantes e que, ao se coagular, formava um conglomerado caseoso, funcionando como "inoculum" para o leite do dia seguinte, pela dispersão através dos movimentos rotativos da haste. O mal foi prontamente sanado e, no mesmo dia, graças às provas de concentrações crescentes, todos os tanques se harmonizaram na estandarização quase que perfeita dos resultados obtidos.

Igualmente, no setor da pasteurização, graves anomalias têm sido detectadas e corrigidas, pelo método acima referido. De fato, ao examinar o leite pasteurizado, de hábito, colhemos amostra, no setor frio, momentos antes do produto se encaminharem aos tanques-estoques.

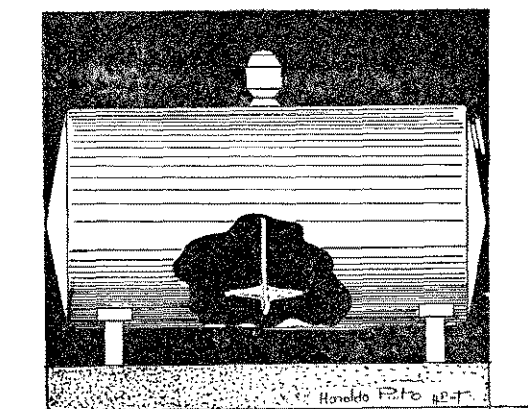


Fig. 1 — Corte esquemático de um tanque-estoque, mostrando o eixo central e a hélice homogeneizadora do leite.

Porém, se os resultados obtidos forem fugindo do esquema conhecido, pela retração progressiva da margem de segurança, devemos então segmentar o exame efetuado, passando também à investigação topográfica do próprio aparelho pasteurizador, que nos métodos rápidos, em placas, possui várias secções, nas quais se processam operações distintas, sempre em circuito fechado: recuperação, filtração, retardamento e refrigeração. Vejamos, para clareza de raciocínio, esquematicamente, como se processa a pasteurização, num aparelho em placas, tipo A.P.V., dotado de duas secções de recuperação e com a capacidade horária de 15 mil litros (ver fig. 2 e 3). O leite cru, penetrando no aparelho em sentido contrário ao leite quente, pasteurizado, que sai demandando a secção de refrigeração, perde frio e ganha calor, em uma operação de dupla troca, no chamado setor de recuperação e, filtrado, dirige-se ao tanque de equilíbrio onde, bombeado, vai às placas de aquecimento e daí ao retardador (15-20 segundos a 75°), onde se encerra a operação quente que constitui a pasteurização propriamente dita. Dêsse trajeto em diante, já pasteurizado, vai perdendo calor, contra

a corrente do leite cru que entra, e, finalmente, refrigerado no setor frio ( $4-5^{\circ}\text{C}$ ), é recolhido nos tanques isotérmicos e estocado. No aparelho pasteurizador, uma queda brusca acidental da temperatura do beneficiamento (abaixo de  $73^{\circ}\text{C}$ ), põe, instantaneamente, em ação um mecanismo de alarme, com retrocesso automático da corrente láctea, através do fechamento da válvula de segurança, situada no final do retardamento e que impede o fluxo do leite subpasteu-

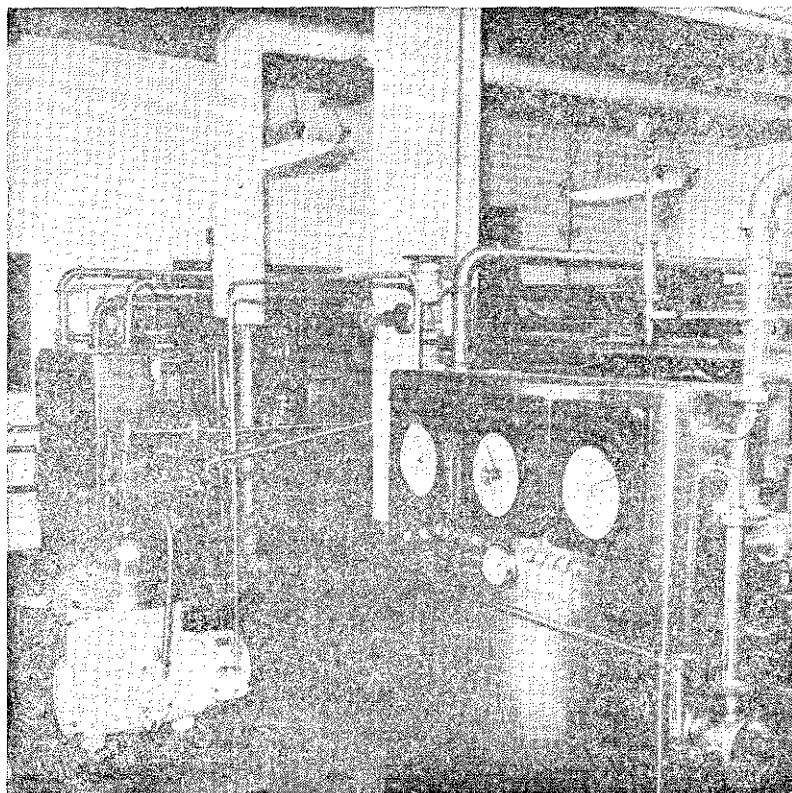


Fig. 2 — Aspecto parcial dos aparelhos A.P.V., de placas, da Cooperativa Central de Laticínios.

rizado, ao tanque-estoque e desvia o seu curso para o tanque de equilíbrio (ver no esquema gráfico), de onde o leite passa ao retardador e novamente ao tanque de equilíbrio, em circuito interno, fechado, sem possibilidade de ir ao estoque, até restauração da normalidade funcional do aparelho. Para a execução de um exame segmentar devemos, pois, colher amostra nas seguintes situações:

- a) no fim do retardamento, isto é, logo após ter o produto recebido

todo o benefício calórico necessário; b) na primeira secção de recuperação; c) na segunda secção de recuperação; d) e na parte final, após o resfriamento, momentos antes de ir o leite à estocagem.

Um resultado indevido no retardamento delata desajustamento do binômio tempo-temperatura; se na primeira ou na segunda recuperação, acusa perfurações ou mau ajustamento das placas, o que

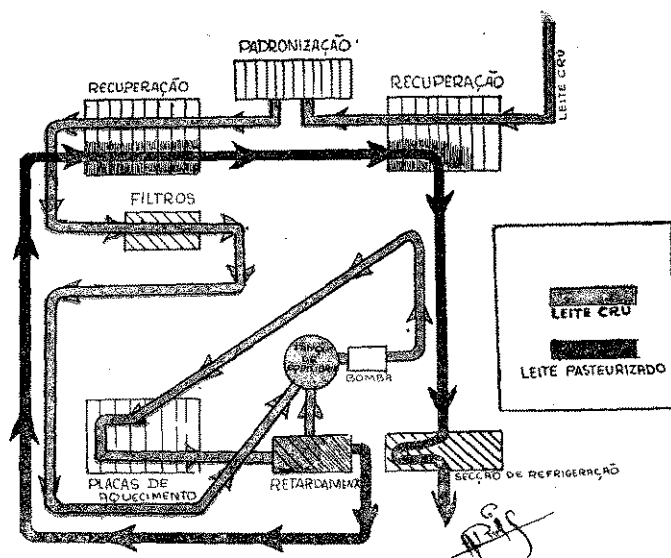
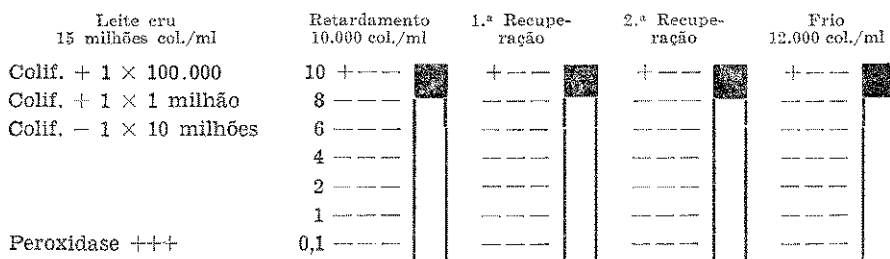


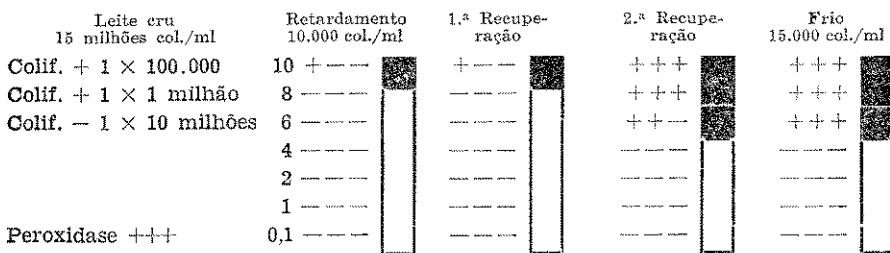
Fig. 3 — Fluxograma representativo do circuito do leite no interior de um aparelho pasteurizador, de placas, dotado de duas secções de recuperação.

permitirá, além do intercâmbio calórico necessário, trocas indevidas entre o leite cru altamente microbiano e o produto já beneficiado. Naturalmente, deve-se, antes de mais nada, excluir a possibilidade da recontaminação do produto, por falta de higienização da maquinaria o que se faz facilmente, pela promoção de uma acurada sanitização, controlada pela sementeira da água quente (85-90° C), que circula no aparelho momentos antes de se iniciarem os trabalhos de pasteurização e colhida na última secção, onde a temperatura é menor (80-85° C). A leitura desta temperatura faz-se no termômetro colocado na secção de salmoura — secção fria. É evidente que esta água, para apresentar resultado satisfatório, não deverá conter coliformes. Acompanharemos o raciocínio feito, com a transcrição do resultado de exame segmentar efetuado em condições de funcionamento normal do aparelho (ver gráfico).



(M.P.N. = 3,6 coliformes por 100 ml)

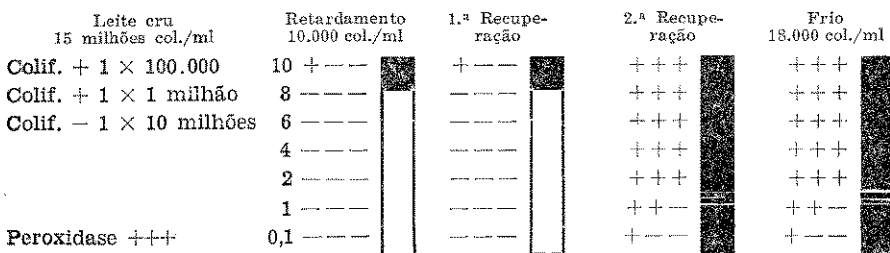
Como se pode verificar pelo esquema gráfico obtido, mantemos, graças a uma elevada margem de segurança, um teto de 8 ml, bem superior ao limite exigido pelos dispositivos legais (0,1 ml). Em caso de surgir uma intercorrência, como a do aparecimento de perfurações nas placas situadas, por exemplo, na segunda recuperação, a margem de segurança começa pouco a pouco a se retrair, aproximando-se da diluição 0,1 ml e uma linha gráfica traçada, tendo como base o valor do teto de segurança, sofreria acentuada queda, a partir deste setor afetado.



(M.P.N. = 3,6 col. em 100 ml)

(M.P.N. = 23 col. em 100 ml)

Em caso de agravamento da anormalidade verificada obteremos os seguintes resultados:



(M.P.N. = 3,6 col. em 100 ml)

(M.P.N. = 150 col. em 100 ml)

As perfurações surgidas nas placas podem ser únicas ou múltiplas, macroscópicas ou invisíveis a olho desarmado, e, neste caso,

o acerto das providências adotadas poderá ser controlado pela elevação gradual do teto de segurança, apreciado pelo processo das concentrações crescentes, já que pela avaliação do M.P.N., o índice permanece inexpressivamente o mesmo, desde que deixem de se positivar os valores 1 e 0,1 ml. É de se notar que, na maioria dos casos, a não ser quando as perfurações foram muito grandes, a prova da fosfatase permaneceu negativa, não acusando a presença anormal, indetectada, do leite cru.

\* \* \*

Tendo observado nos exames rotineiros de laboratório, por inúmeras vezes, o aparecimento de perfurações nas placas dos nossos aparelhos A.P.V., causadas pelo desgaste originado na justaposição rigorosa das placas, pelas contínuas operações de higienização e ajustagem da maquinaria e corrosões por causas diversas, nessas circunstâncias pudemos levar a efeito um estudo comparativo entre o valor da prova colimétrica, fosfatasimétrica e a da contagem global. Segundo critério conhecido, sabe-se que o teste para a fosfatase é capaz de indicar a presença mínima de 1 ml de leite cru misturado em cada litro do produto beneficiado (HAMMER & col., 1957; BURGWALD, 1939; HAHN & col., 1939; LOPES, 1944).

No caso visto, do encontro de perfurações na segunda secção de recuperação com presença de coliformes em 0,1 ml e negatividade fosfatasimétrica, é evidente que o leite cru associado estaria agindo como "inoculum" bacteriano mas não como "inoculum" fosfatásico, pelo menos em quantidade detectável. Tal fato vem demonstrar, sem dúvida alguma, a maior acuidade da prova da pesquisa dos coliformes que apontou a origem da anomalia sendo o teste da fosfatase negativo, naturalmente por se encontrar o leite cru misturado no produto pasteurizado em parcelas menores do que 1 ml por mil, que seria o limite da detectibilidade fosfatasimétrica. Sabemos, desde Kay & Graham (CECILIA, 1956), e SCHARER (1938), que 96% da fosfatase são inativos a 75° C no período de 15 segundos, e, ainda, segundo critério mais recente, completamente inativados (Stand. meth. exam. dairy prod., 1953; ROGICK, 1959). Fazendo um raciocínio paralelo ao já visto, podemos, sem dificuldade, chegar à conclusão de que, nos desvios ligeiros da pasteurização, o leite imperfeitamente beneficiado poderá funcionar como se fôsse leite cru passado em parcelas mínimas, indetectável por meios fosfatasimétricos mas evidenciável pela prova mais sensível dos coliformes. Tal fato já foi por nós observado e costuma suceder principalmente

quando há variação na duração do tempo de retardamento, pois a temperatura da pasteurização é de fácil contrôlo através da leitura do traçado termográfico ou do termômetro aferido, situado na parte terminal do retardamento. Este é um aspecto da questão que deve ser bem examinado, pois, se aceito, virá modificar o critério clássico de que o teste da fosfatase é índice de boa pasteurização e a prova para coliformes, afirmativa de posteriores recontaminações. Pelo novo critério a se adotar, além da prova da fosfatase, e, melhor do que ela, o teste de coliformes indicaria a correção da pasteurização efetuada. Quando negativo no retardamento, sua posterior positividade seria então índice de recontaminação, quer por imperfeita higienização da maquinaria ou pela mal ajustagem ou existência de perfurações nas placas, nas secções de recuperação, o que indiretamente corresponderia, até certo ponto, a uma subpasteurização do produto. Voltando à questão da presença de perfurações, nas placas recuperadoras, para avaliarmos a quantidade do leite cru que vinha de mistura com o leite pasteurizado, retirando-o do padrão colimétrico, sabendo pela prova da fosfatase negativa, que era menor do que 1 ml por mil, idealizamos o seguinte recurso experimental: colhemos o leite em duas situações diversas, na secção quente (retardamento), e na 2.<sup>a</sup> secção de recuperação, semeamos e obtivemos em função das soluções de continuidade existentes nas placas, para o mesmo produto beneficiado, dois resultados diferentes quanto à expressão coliforme, aproximados quanto à contagem global e idênticos pelo método da fosfatase.

Leite cru 15 milhões col./ml	Leite do retardamento 4.000 col./ml	Leite da 2. <sup>a</sup> secção de recuperação 10.000 col./ml
Colif. + 1 × 100.000	10 + — —	10 + + +
Colif. + 1 × 1 milhão	8 — — —	8 + + +
Colif. — 1 × 10 milhões	6 — — —	6 + + +
	4 — — —	4 + + +
	2 — — —	2 + + +
	1 — — —	1 + + —
Peroxidase + + +	0,1 — — —	0,1 + + —

{ Peroxidase + + Fosfatase: ausência de coloração M.P.N. = 3,6 colif. em 100 ml	{ Peroxidase + + Fosfatase: idem M.P.N. — 210 colif. em 200 ml

De posse desses dados, coletamos ainda no retardamento, oito litros de leite corretamente pasteurizado, semeando-os com quantidades crescentes de lei cru — 0,01 - 0,05 - 0,1 - 0,3 - 0,5 - 0,7 - 1, e

2 ml — isto é, parcelas infra e suprafosfatasimétricas, tentando reproduzir, no laboratório, a anomalia verificada no aparelho pasteurizador. Obtivemos, pela sementeira do material:

## LEITE COLHIDO NO RETARDAMENTO + LEITE CRU

Leite cru 15 milhões col./ml	Retard. 4.000 col./ml	+0,01 5.000	+0,05 5.500	+0,1 11.000	+0,3 15.000	+0,5 20.000	+0,7 25.000	+1 50.000	+2 90.000
Colif. + 1 × 100.000	10 +---	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Colif. + 1 × 1 milhão	8 ----	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Colif. - 1 × 10 milhões	6 ----	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	4 ----	---	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	2 ----	---	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	1 ----	---	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	0,1 ----	---	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Peroxidase +++	Fosfatase: ausência de coloração azul Peroxidase ++	M.P.N. = 3,6 colif. por 100 ml	M.P.N. = 150 col. por 100 ml	M.P.N. = + de 1.100 coliformes por 100 ml	menos de 1 U.S.	mais de 1 U.S.	mais de 2 U.S.

Enquanto a contagem global pouco se modificava, mostrando, pela sua relativa inércia, uma pequena sensibilidade, o teste para coliformes acusou, seguramente, desde a parcela mínima de 0,01 ml do leite cru inoculado, pela positividade dos valores da escala das concentrações crescentes, a contaminação por nós provocada.

Com a sementeira de 0,1 ml do leite cru, conseguimos reproduzir, no laboratório, a mesma condição criada no aparelho A.P.V., na sua segunda secção de recuperação, pela presença anômala das perfurações nas placas de aço inoxidável. Então chegamos à conclusão de que, teoricamente, a passagem do leite cru contaminante estava se fazendo na ordem de 0,1 ml por mil de leite pasteurizado. Desde que a prova da fosfatase somente conseguiu detectar o leite cru quando da mistura de 0,5, 0,7 e 1 ml, e mesmo assim pela evidência discreta de uma delicada nuance azulada, menor de que 1 unidade Schärer, chegamos à conclusão de que o teste para coliformes é possivelmente cinco vezes mais sensível do que o da fosfatase, na evidência da presença do leite cru, e, porque não dizer, na evidência das subpasteurizações. Na prova por nós levada a efeito, havíamos procurado contaminar o leite pasteurizado por quantidades crescentes de leite cru da boa procedência e, portanto, de teor coliforme e bacteriano global, relativamente pequeno. No intuito de saber o que aconteceria no caso da passagem através das perfurações das placas recuperadoras, de leite cru altamente microbiano, contaminando decisivamente o produto beneficiado, resolvemos repetir o mesmo artifício de técnica, utilizando porém, como "inoculum", leite cru conhecidamente poluído.

Os resultados, coerentemente, foram os seguintes:

LEITE DO RETARDAMENTO + LEITE CRU

Leite cru 70 milhões col./ml	Retard. 5.000 col./ml	+0,01 11.000	+0,05 13.000	+0,1 18.000	+0,3 20.000	+0,5 25.000	+0,7 32.000	+1 70.000	+2 120.000
Colif. + 1 × 100.000	10 + --	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Colif. + 1 × 1 milhão	8 ---	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Colif. - 1 × 10 milhões	6 ---	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Colif. - 1 × 100 milhões	4 ---	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	2 ---	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	1 ---	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	0,1 ---	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

{ M.P.N. =  
 3,6 coli%.  
 por 100 ml } M.P.N. = mais de 1.100 coliformes por 100 ml

Peroxidase ++ { Fosfatase: ausência de coloração azul } { menos de 1 U.S. } { mais de 1 U.S. } { mais de 2 U.S. }

A contaminação foi dez ou mais vezes intensa, apontada pela presença de coliformes mesmo em 0,1 ml do leite inoculado, com a parcela mínima de 0,01 ml do produto em estado de cru. A contagem global, entretanto, pouco se modificou, ficando absolutamente dentro do padrão legal exigido, sendo o resultado fosfatasimétrico naturalmente o mesmo, afastando-se ainda mais, pelo critério da sensibilidade, o teste para coliforme daquelas duas provas. A melhor explicação que podemos oferecer para a disparidade de resultados entre os testes para coliformes e a prova da contagem global é a de que a verificação colimétrica é processo tão seletivo que permite a detecção destes microrganismos mesmo quando se constituem uma pequena percentagem da flora total. De fato, é comum na prática corrente, encontrarmos resultados semelhantes ao verificado, isto é, um produto beneficiado, apresentando coliformes presentes até em 0,1 ml mas com baixa contagem global e prova de fosfatase negativa. E aqui abrimos um parêntese para dizer o que entendemos por negatividade fosfatasimétrica.

Para o leite fervido (contrôle negativo), não se evidencia, na coluna líquida do álcool butílico utilizado como extrator do indofenol azul, coloração alguma (prova negativa). Para o leite cru, obteríamos uma intensa coloração azul (contrôle positivo). Para o leite ou creme corretamente pasteurizados, comercialmente ou para maior segurança da afirmativa, pasteurizados em laboratório, não se evidencia coloração alguma ou no máximo ligeira nuance, e as amostras serão classificadas como própria ou imprópriamente pasteurizadas se a coloração presente fôr menor, igual ou maior do que 1 unidade do teste padrão (1 U.S.) (Applied Res. Inst., 1958). Um resultado negativo, nessas condições, poderá, entretanto, também indicar que



a amostra tem menos atividade fosfatásica que a sensibilidade para a qual o teste foi idealizado. Entretanto, muitos estudiosos do assunto admitem um critério diferente, como índice de pasteurização correta a presença de coloração até um limite igual ou inferior a 2 unidades do padrão (BURGWALD, 1939; LOPES, 1944; CECILIA, 1956). Na figura n.º 4 estão representadas, numa série de tubos, as diversas gradações colorimétricas encontradas na pesquisa fosfatásimétrica pelo método rápido de SCHARER (1938). Da esquerda para a direita, os três primeiros tubos contendo respectivamente, leite fervido, pasteurizado comercialmente. (A.P.V.), e pasteurizado em laboratório, não evidenciaram coloração alguma. O tubo seguinte, contendo leite devidamente pasteurizado associado a 0,7 por mil de leite cru, já acusa uma muito sutil nuança azulada, menor do que 1 unidade do padrão. Os tubos subseqüentes, contendo, respectivamente, leite cru adicionado ao leite pasteurizado na proporção de 1 e 2 ml por mil, já evidenciam, respectivamente, coloração maior do que 1 e 2 unidades. A seguir o padrão colorido n.º 5: um dos índices de leite mal pasteurizado e o tubo de cor azul intensa, cor-

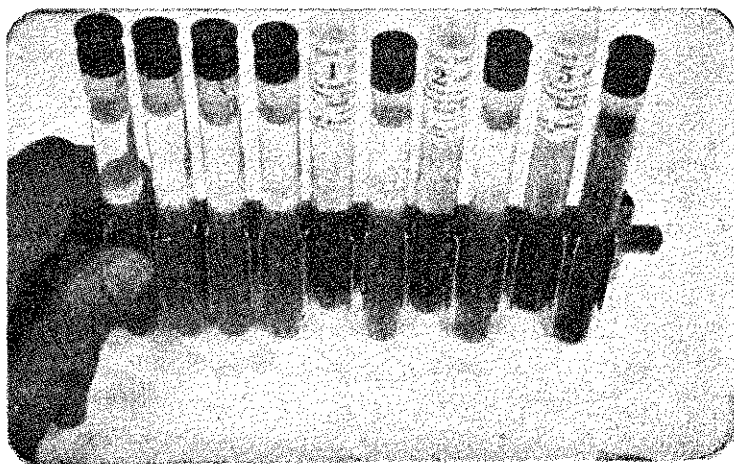


Fig. 4 — Bateria de tubos utilizados no processo da determinação colorimétrica da fosfatase, pelo método rápido de Scharer.

respondente ao leite cru. A orientação que adotamos é a mesma do “Applied Research Institute”, de Nova York, produtor dos reativos para a determinação rápida fosfatásimétrica. Quanto à precisão desse método, trabalhos diversos, e entre eles os de BURGWALD (1939) e o de LOPES (1944), indicam correr parêlhas com o processo lento ou com a prova de Kay e Graham.

Como recomendação fundamental para a boa realização da prova rápida de Scharer, devemos lembrar, entre outras medidas, o aquecimento prévio, em banho-maria (37-38° C), dos tubos contendo a mistura da solução PHOS-PHAX (5 ml) e do leite a ser testado (0,5 ml), posteriormente incubados a 37° C, numa estufa cultora, durante período de 20 a 30 minutos. Removidos da estufa, adicionamos, a cada unidade, 6 gotas da solução INDO-PHAX (C.Q.C.), homogeneizamos e aguardamos 5 a 10 minutos antes de realizar a leitura, diretamente ou pela extração do indofenol azul. Providência também fundamental é a repassagem em água destilada, dos tubos e das pipetas utilizadas no processo, evitando assim a interferência falseadora dos alcalinos utilizados na higienização do material.

As soluções reativas, INDO-PHAX e principalmente a PHOS-PHAS, devem ser de preparação recente e se estocadas, aconselha-se conservá-las no congelador. Pelo que ficou descrito, utilizando como padrão-teste o tubo de 1 U.S., quer nos parecer que, se pelo critério colorimétrico, quantidade igual a 1 ml  $\frac{0}{100}$  de leite cru é capaz de produzir visível coloração azul, parcelas menores podem, entretanto, se evidenciar pela elaboração de delicada nuance azulada, mais atenuada do que aquêlê valor limite estabelecido.

### OBSERVAÇÕES DE ORDEM GERAL

a) — Na utilização do processo das concentrações crescentes é oportuno lembrar que, em relação às sementeiras, seguimos a orientação dos "Standard Methods" (Stand. meth. exam. dairy prod., 1953; Stand. meth. exam. water. . . , 1955), isto é, utilizamo-nos de 10 ml do meio bile-lactose-verde brilhante para as parcelas de 0,1 a 4 ml do leite e 20 ml daquele meio de cultura para volumes maiores de 6 a 10 ou mais ml.

b) — No caso visto, da presença de perfurações nas placas da segunda secção de recuperação, para normalização da situação, efetuamos a exclusão seletiva das placas danificadas pela utilização dos seguintes processos. Pela simples colocação, em câmara escura, da placa suspeita contra um foco luminoso. Pela pincelagem de uma das faces da placa, com líquido adesivo associado à fenolftaleína, e da outra face, com solução de hidróxido de sódio. O aparecimento de pontilhado róseo seria indicação colorimétrica da presença da solução de continuidade. Entretanto, essa prova não é de grande sensibilidade, uma vez que o leite, no interior do aparelho, circula entre

as placas, sob pressão, e não nos foi possível, evidentemente, reproduzir tal fato com a solução alcalina utilizada. Após a exclusão das placas perfuradas, continuamos, entretanto, a observar índices insatisfatórios para as amostras de leite colhidas naquela secção de recuperação, como possível evidência da presença de microperfurações em outras placas.

Como prova e contraprova da nossa hipótese, lançamos mão de um artifício de técnica, efetuamos monobloco, uma operação de dupla troca, entre as placas da segunda recuperação dos nossos dois aparelhos pasteurizadores, e, de fato, o mau resultado acompanhou o grupo de placas suspeitas, entrando o aparelho que, anteriormente, apresentava a incorreção, em absoluta regularidade funcional.

Na verdade, existem atualmente, rigorosos processos electrônicos capazes de acusar diferenças mínimas na espessura das placas ou presença de microcavidades e efrações na sua estrutura metálica.

c) — E como consideração final, seria interessante o emprêgo do método das concentrações crescentes para um estudo comparativo da eficiência dos diversos aparelhos pasteurizadores existentes nos principais estabelecimentos de laticínios do Estado de São Paulo.

## RESUMO

Após ligeiras considerações iniciais, sôbre o emprêgo da pasteurização do leite, faz o autor um estudo comparativo entre os métodos colimétricos empregados na rotina dos laboratórios de controle sanitário do leite e o processo colimétrico da concentração crescente. Tendo em vista que a pesquisa da presença presuntiva dos coliformes apenas registra a situação atual da flora do leite, portanto quando o leite pasteurizado já se encontra contaminado, as providências decorrentes seriam sempre efetuadas visando o leite do dia seguinte. Procurou elaborar então um processo que permitisse a previsão dos resultados de maneira a entreter o produto dentro dos padrões legais ou mesmo com uma apreciável margem de segurança. Para tanto, sabendo que para o leite tipo C, o regulamento federal exige negatividade coliforme em 0,1 ml, semeou o produto em concentrações crescentes — 0,1 - 1, - 2, - 4, - 6, - 8, - 10 ml — numa série de 21 tubos de fermentação (bile-lactose-verde brilhante), com 3 tubos para cada parcela do leite. Obtida a positividade, por exemplo, no tubo de 10 ml, o teto de segurança estaria na altura do tubo de 8 ml, sendo as sementeiras 0,1 - 1, - 2, - 4, - 6, - 8, chamadas de margem de segurança. A proporção que o teto vai

baixando, diminuindo portanto a margem de segurança, serão intensificados os trabalhos de regulação e desinfecção da aparelhagem. Pelo método das concentrações crescentes, as surpresas desaparecem e o trabalho do beneficiamento do leite corre em segurança, na previsão estudada dos resultados futuros. Pela utilização do processo da verificação dos mais prováveis números (M.P.N.), utilizando 3 tubos e três volumes diferentes — 0,1 - 1, - 10 ml — contidos na série dos 21 tubos de fermentação da prova da concentração crescente, verificou-se que, quando havia positividade do volume 10 ml, só poderíamos ter nova indicação da evolução da anomalia quando a positividade alcançasse 1 ml, o que representa intervalo silencioso muito grande nessa prova. Tal fato vem mostrar a superioridade do processo da sementeira em concentrações crescentes na previsão das irregularidades na linha de beneficiamento do leite. Em relação ao aparecimento de perfurações nas placas, no setor de recuperação, de aparelhos A.P.V., verificou o autor que, enquanto o leite do retardamento acusava um elevado teto de segurança (8 ml), já no setor de recuperação os coliformes se faziam presentes em 0,1 ml. Baseado na negatividade da prova de fosfatase, sabendo que a mesma não detecta quantidades de leite cru menores do que  $10^{-6}$ , supondo que a contaminação era menor do que  $10^{-6}$  ou 0,1%, realizou o autor um ensaio experimental, capaz de determinar o volume do leite cru que se misturava ao leite pasteurizado. Para isso colheu oito litros do leite pasteurizado, no retardamento, e associou, ao mesmo, quantidades crescentes do leite cru — 0,01 - 0,03 - 0,05 - 0,1 - 0,5 - 0,7 - 1 e 2 ml — isto é, quantidades infra e suprafosfatásimétricas. E pelo emprêgo do processo das concentrações crescentes verificou que o leite pasteurizado do retardamento, com teto de segurança igual a 8 ml, passou a apresentar índices cada vez mais baixos até positividade em 0,1 ml quando a parcela do leite cru inoculada foi de 0,1 ml. Portanto, concluiu que a quantidade do leite cru que passou, no caso das perfurações das placas e retirou o leite beneficiado do padrão sanitário exigido, era da ordem de 0,1 ml por mil. Tendo o leite cru, no caso visto, funcionado como “inoculum” colifórmico mas não como “inoculum” fosfatásico detectável, chegou o autor à conclusão de que a prova para a verificação da presença presuntiva de coliformes é mais sensível do que a prova da fosfatase na verificação da recontaminação por leite cru. Desde que a fosfatase é completamente inativada pela pasteurização bem dirigida, fazendo um raciocínio paralelo, concluiu que, nos desvios ligeiros da pasteurização, o leite,

imperfeitamente beneficiado, poderia funcionar como leite cru passado em parcelas mínimas, não detectado pela fosfatasimetria mas evidenciado pelo teste para coliformes. Portanto, o teste para coliformes já que se mostra tão sensível, deverá, ao lado da prova para pesquisa de fosfatase, e talvez melhor do que ela, ser utilizado na verificação da eficiência da pasteurização, como, também, na determinação das recontaminações verificadas.

### SUMMARY

After introductory remarks about the use of milk pasteurization, the author performs a comparative study among the coli counting methods employed as a routine in the laboratories of milk sanitary control and the coli counting process of the increasing concentration. Considering that the study of the presumptive presence of the coliform organisms registers only the bacterial densities of flora at the moment, when the pasteurized milk is already recontaminated, the author states that the sanitization procedures would always affect next day milk. Then the author experimented a process that allowed a forecast of the results in order that the product could be maintained within the standard level and offering even a certain safety margin. So, as the Federal Regulation demands absence of coliform organisms in 0.1 ml, for milk classified as C type, the author performed inoculations in increasing concentrations — 0.1, 1, 2, 4, 6, 8, 10 ml or more. He built a series of 21 fermentation tubes, brilliant green-lactose-bile broth, with 3 tubes for each portion of milk. When a positive result is obtained, for instance in the three last tubes (10 ml), the upper level of safety would be at 8 ml. Inoculations of 0.1, 1, 2, 4, 6, 8 ml would be called safety margin. Whenever the upper level decreases, dragging with it the safety margin, the whole procedure of sanitization and regulation of the equipment must be intensified. By the usage of the increasing concentrations the factor surprise does not count, and the operation is safely executed, giving through the study of the present data the picture of the future results. Through the application of the method of the computation of the most probable numbers (M.P.N.), using 3 tubes and 3 different volumes — 0.1, 1, 10 ml — pertaining to the series of 21 fermentation tubes the author reached to some conclusions. He observed that when there is a positive result in 10 ml, a new indication could only be obtained

when the positive result reached 1 ml. This silent period in a test is too large. This disadvantage of the M.P.N. test shows the superiority of the process of inoculations in increasing concentrations in forecasting the defects in pasteurization. In relation to the presence of perforations in the plates, at the level of the Regenerative Section, in a A.P.V. equipment, the author observed that while the milk of the Tubular Holding System, showed a high upper level (8 ml), coliform organisms were present in 0.1 ml, even in the Regenerative Section. The author knowing that the phosphatase test does not indicate the presence of raw milk in quantities smaller than 1‰, he essayed an experimental work in order to detect the volume of raw milk that was being mixed with pasteurized milk in the regenerative section. In this complementary test the author is able to calculate the volume of raw milk mixed to the pasteurized one. For this purpose he selected 8 litres of pasteurized milk obtained from the tubular holding system, and added to them increasing quantities of raw milk — 0.01, 0.03, 0.05, 0.01, 0.5, 0.7, 1 and 2 ml — that is quantities that are below and above the detection power of the phosphatase test. Through the usage of the increasing concentrations process the author observed that the pasteurized milk of the tubular holding system, with an upper level of 8 ml, showed figures gradually lower until a positive result in 0.1 ml — pasteurized milk plus 0.1 ml of raw milk. This all happened when the inoculated volume of raw milk was 0.1 ml. Hence, he concluded that the volume of raw milk that passed through the perforations of the plates presented a percentage of 0.1 ml ‰. The author explains that in this case, the raw milk acted as a coliform “inoculum”, and not as a phosphatase inoculation that could be detected. After these comments he concludes that this test used for the detection of coliform organisms is more accurate than the phosphatase test in observing the recontamination with raw milk. Phosphatase is completely inactivated through a correct pasteurization. Hence the author reaches to the conclusion that when the pasteurization presents light defects, the imperfectly treated milk could act as raw milk passing in very small portions, undetected by phosphatase test but indicated by the test for coliform organisms. Consequently, this last test being so exact should be used as a routine procedure employed in checking the efficiency of pasteurization, as well as the rate of detected recontamination.

## BIBLIOGRAFIA

BURGWALD, L. H. — The phosphatase test. A review of the literature on its application for detecting irregularities in the pasteurization of milk and dairy products. *J. dairy Scien.*, 22: 853-879, 1939.

CECILIA, C. A. — Enciclopedia de la leche. Edit. Espasa-Calpe, S. A., Madrid, 1956.

FOSTER, E. M., F. E. NELSON, M. L. SPECK, R. N. DOETSH & J. C. OLSON — Dairy Microbiology. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, 1957.

HAHN, A. J. & P. H. TRACY — Controlling milk pasteurization efficiency through the use of the phosphatase test. *J. dairy Scien.*, 22: 191-200, 1939.

HAMMER, B. W. & F. J. BABEL — Dairy Bacteriology. 4th ed. John Wiley & Sons, Inc. Publishers, New York — Chapman & Hall. Limited, London, 1957.

HOSKINS, J. K. — In Standard Methods, pág. 153. The most probable numbers of *B. coli* in water analysis. *J. Am. Water Works*, 25: 867-877, 1933.

HOSKINS, J. K. — In Standard Methods, pág. 153. Most probable numbers for evaluation of *Coli-aerogenes* tests by fermentation tube method. *Publ. Health Rep.*, 49: 393, 1934.

LOPES, C. F. — Contrôlo da eficiência da pasteurização do leite pela prova da fosfatase. *Rev. Ind. Animal*, 7: 47-59, 1944.

LOPES, C. F. — Observações sobre os fatores de insucesso e de recontaminação do leite pasteurizado. *Bol. Ind. Animal*, 11: 145-163, 1950.

LOPES, C. F. & F. S. SILVA FILHO. Tipos de leite em São Paulo. *Bol. Ind. Animal*, 14: 153-163, 1954.

MC CRADY, H. M. — In Standard Methods, pág. 153. The numerical interpretation of fermentation-tube results. *J. infect. Dis.*, 17: 183-212, 1915.

MC CRADY, H. M. — In Standard Methods, pág. 153. Tables for rapid interpretation of fermentation-tube results. *Canad. publ. Health J.*, 9: 201, 1918.

MELLO, A. & N. MASTROFRANCISCO — Verificações sobre a presença do bacilo tuberculoso no leite da Capital. *Rev. Ind. Animal*, 1: 25-42, 1938.

MELLO, A. — O leite. Alguns aspectos relacionados aos fenômenos da nutrição, da industrialização e da produção. *Bol. Ind. Animal*, 6: 3-8, 1943.

MELLO FILHO, A. — Contribuição ao estudo da verificação presuntiva dos coliformes no leite pasteurizado. *Arq. med. munic.*, 3: 147-158, 1951.

MELLO FILHO, A. — Aspectos gerais da nutrição. Album comemorativo do jubileu de prata da Coop. Central de Laticínios de São Paulo, São Paulo, 1958.

PESTANA, B. R. — Da meningite tuberculosa. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 1: 40-54, 1941.

Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Serv. Inf. Agr., Min. Agric., Rio de Janeiro, 1953.

ROGICK, F. A. — Estudo comparativo entre os tipos de leite A, B e C consumidos em São Paulo. *Bol. Ind. Animal*, 17: 83-87, 1959.

ROGICK, F. A. — Pesquisas sobre manteigas fabricadas em São Paulo e sua conservação em frigorífico. Fosfatasimetria. *Bol. Ind. Animal*, 17: 155-165, 1959.

SCHARER, H. — A rapid phosphomonosterase test for control of dairy pasteurization. *J. Dairy Scien.*, 21: 21-34, 1938.

Scharer modified phosphatase test. Instructions. Applied Research Institut, New York, 1953.

SILVA, F. S. — Provas de laboratório no controle de leite pasteurizado tipo "A", V Cong. bras. Med. vet. Anais, págs. 383-388, 1951.

Standard methods for the examination of dairy products. 10th ed. Amer. Pub. Health Ass. Inc., New York, 1953.

Standard Methods for the examination of water, sewage and industrial wastes. 5th ed. APHA — AWWA — FSIA — Amer. Pub., Health Ass. Inc., New York, 1955.

VILLARES, J. B. — Qualidade do leite tipo C em São Paulo. Fundamento de uma campanha de aumento do consumo do leite. *Bol. Ind. Animal*, 17: 55-81, 1959.



## ERRATAS

PAG. 136

Onde se lê  
"quantidades maiores de 0,1 e 10 ml."  
Leia-se  
"quantidades maiores de 1 e 10 ml."

PAG. 142

Onde se lê  
Using 3 Tubes  
With 10, and 0,1 ml volumes  
Leia-se  
Using 3 Tubes  
With 10, 1,0 and 0,1 volumes

PAG. 152

Onde se lê	Leia-se
Leite cru	Leite cru
70 milhões col./ml	70 milhões col./ml
Colif. + 1 × 100.000	Colif. + 1 × 100.000
Colif. + 1 × 1 milhão	Colif. + 1 × 1 milhão
Colif. - 1 × 10 milhões	Colif. + 1 × 10 milhões
Colif. - 1 × 100 milhões	Colif. - 1 × 100 milhões