MAURÍCIO ROBERTO TOSTI NARCISO	
Inativação de Mycobacterium bovis (espoligotipos SB0120 e SB1033) em leite integra	al
submetido à pasteurização lenta e rápida em banho Maria	
São Doulo	
São Paulo 2012	

MAURÍCIO ROBERTO TOSTI NARCISO

Inativação de *Mycobacterium bovis* (espoligotipos SB0120 e SB1033) em leite integral submetido à pasteurização lenta e rápida em banho Maria

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicado às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS)

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles

De acordo:

Orientador(a)

São Paulo

2012

Obs: Aversão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2524 FMVZ Narciso, Maurício Roberto Tosti

Inativação de *Mycobacterium bovis* (espoligotipos SB0120 e SB1033) em leite integral submetido à pasteurização lenta e rápida em banho Maria / Maurício Roberto Tosti Narciso.-- 2012.

49 p. ; il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa, Dra. Evelise Oliveira Telles.

1. Mycobacterium bovis. 2. Espoligotipos. 3. Resistência térmica. 4. Pasteurização lenta. 5. Pasteurização rápida. 6. Banho-Maria. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO





FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

PARECER

Interessado: Maurício Roberto Tosti Narciso

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal

A Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo analisou o projeto protocolado sob o número 2493/2011, intitulado: "Inativação de *Mycobacterium bovis* (espoligotipos BR024 e SB0121) em leite integral submetido à pasteurização lenta e rápida em banho Maria", não utilizando animais, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de ética adotados por esta Comissão.

São Paulo, 25 de novembro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni

Presidente

http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: NARCISO, Maurício Roberto Tosti

Titulo: Inativação de Mycobacterium bovis (espoligotipos SB0120 e SB1033) em leite

integral submetido à pasteurização lenta e rápida em banho Maria

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicado às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Data: / /

Banca Examinadora

Prof. Dr. Evelise Oliveira Telles

Instituição: FMVZ-USP

Prof.Dr. Marcos Amaku Instituição: FMVZ-USP

Prof.Dr. Monica Fagundes de Carvalho Klein Gunnewiek

Instituição: Secretaria da Agricultura do Estado

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Evelise Oliveira Telles pela orientação, paciência e compreensão.

À minha família que sempre esteve presente nos momentos fáceis e difíceis.

Aos técnicos dos Laboratórios de Higiene e Segurança Alimentar e de Zoonoses Bacterianas Sandra, Bispo, Gisele e Zenaide por toda a ajuda prestada durante a realização deste projeto.

Aos amigos doutorandos e mestrandos Daniele, José Henrique Hildebrand Grisi Filho, Karina Starikoff, Camila Diniz Fontanesi, Camila Nóia e Patricia Rossi e Marcela A. Leite pela ajuda durante os experimentos e a amizade construída.

À CNPQ pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

NARCISO, M. R. T. Inativação de *Mycobacterium bovis* (espoligotipos SB0120 e SB1033) em leite integral submetido à pasteurização lenta e rápida em banho Maria. [Inactivation of Mycobacterium bovis (SB0120 and SB1033 spoligotypes) in whole milk subjected to pasteurization and HTST pasteurization in water baths]. 2012. 49 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O Mycobacterium bovis causa a tuberculose zoonótica, doença que afeta os animais e o homem podendo causar a morte, sendo o leite uma importante via de transmissão da doença para o homem. A pasteurização do leite é a principal medida para quebrar essa cadeia de transmissão, cujos parâmetros de tempo e temperatura foram definidos através de experimentos que datam desde o fim do século XIX, com base na resistência térmica do M. bovis e da Coxiella burnetti, então considerados os mais resistentes patógenos não formadores de esporos que contaminam o leite. No Brasil são aprovados os binômios 62°C a 65°C por 30 minutos e 72°C a 75°C por 15 a 20 segundos. Entretanto, com o passar dos anos e surgimento de novas tecnologias (PCR, Spoligotyping e outras técnicas biomoleculares) foi possível observar diferenças genéticas intra-espécie. Assim, este projeto tem por objetivo avaliar e comparar o comportamento de dois espoligotipos de M. bovis (SB0120 e SB1033) frente aos dois protocolos de pasteurização utilizados no país. Para tanto, leite integral UHT foi contaminado com esses espoligotipos e submetido aos dois processos térmicos, em Banho-Maria. O leite foi semeado em meio sólido Stonebrink-Leslie e a contagem de colônias foi feita após 45 dias de incubação a 37°C. Não houve neste experimento diferença entre as resistências térmicas dos dois espoligotipos, no entanto detectou-se uma maior importância da fase de aquecimento na redução do agente do que da fase de manutenção da temperatura, para os dois espoligotipos, nos dois processos.

Palavras-chave: *Mycobacterium bovis*. Espoligotipos. Resistência térmica. Pasteurização lenta. Pasteurização rápida. Banho-Maria.

ABSTRACT

NARCISO, M. R. T. Inactivation of Mycobacterium bovis (SB0120 and SB1033 spoligotypes) in whole milk subjected to Holder pasteurization and HTST pasteurization in water baths. [Inativação de *Mycobacterium bovis* (espoligotipos SB0120 e SB1033) em leite integral submetido à pasteurização lenta e rápida em banho Maria]. 2012. 49 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Mycobacterium bovis causes zoonotic tuberculosis disease that affects animals and humans and can cause death, the milk is an important route of disease transmission to humans. The pasteurization of milk is the main measure to break the transmission chain, whose time and temperature parameters were defined by experiments dating from the late nineteenth century, based on thermal resistance of M. bovis and Coxiella burnetti, considered then the most resistant non-spore-forming pathogens that contaminate the milk. In Brazil, there are two approved binomials 62 ° C to 65 ° C for 30 minutes and 72 ° C to 75 ° C for 15 to 20 seconds. However, over the years and the emergence of new technologies (PCR, spoligotyping and other biomolecular techniques) was observed genetic differences intra-species. Thus, this project aims to evaluate and compare the behavior of two spoligotypes of M. bovis (SB0120) and SB1033) compared to the two pasteurization protocols used in the country. To this end, UHT milk was contaminated with these spoligotypes and subjected to two thermal processes in a water bath. The milk was streaked on solid medium Stonebrink-Leslie and colony counting was done after 45 days of incubation at 37 ° C. This experiment showed that there was no difference between the thermal resistances of the two spoligotypes, however it was detected a greater importance of the heating phase in reducing the agent that the maintenance phase of temperature for the two spoligotypes, in both cases.

Keywords: Mycobacterium bovis. Spoligotypes. Thermal resistance. Holder Pasteurization. High temperature short time. Water Bath.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de tubos com as amostras de leite para tratamento térmico	34
Figura 2 - Esquema de diluição decimal seriada em água peptonada 0,1% e semeadur	ra nas
garrafas contendo o meio Stonebrink-Leslie	35

LISTA DE TABELAS

Tabela	1	- Resultados das contagens (log UFC/ml) do Mycobacterium bovis
		(espoligotipos SB0120 e SB1033) experimentalmente inoculado em leite
		UHT integral e submetido aos binômios de tempo e temperatura de
		pasteurização lenta e rápida, em banho-maria. São Paulo - SP. Ago. 2010 a
		Maio 2011
Tabela 2	2 -	Taxa de redução do Mycobacterium bovis (espoligotipos SB0120 e SB1033)
		inoculado em leite UHT integral, devido à pasteurização lenta e rápida
		reproduzida em banho-maria: fase de aquecimento, fase de manutenção da
		temperatura e a somatória de ambas. São Paulo - SP. Ago. 2010 a Maio 201138

GRÁFICO

Gráfico	1 - Cu	ırva d	e redução	de dois	espoligo	tipos (SB	0120	e SB1033)	de	
	Мусс	bacter	rium bovis	submetid	os aos pa	râmetros d	le paste	eurização lo	enta	
	(65°C	C/30mi	n.) e rápida	a (75°C/2	0 seg.) en	n banho-m	aria, no	os tempos z	zero	
	(ante	s do	aquecime	nto), te	npo inic	ial (iníci	o do	processo	de	
	paste	urizacâ	ăo), e tempo	o final (ac	final do r	rocesso de	pasteu	rização)		38

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

Log Logaritmo

% Por cento

C°. Grau Celsius

μl Microlitro

AIDS Acquired Imunodeficiency Syndrome

cm Centímetro

FMVZ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

g Grama

HIV Human Deficiency Virus

M. bovis Mycobacterium bovis

M. tuberculosis Mycobacterium tuberculosis

M. avium Mycobacterium avium

M. fortuitum Mycobacterium fortuitum

M. gordonae Mycobacterium gordonae

M. intracellulare Mycobacterium intracellulare

M. kansai Mycobacterium kansaii

M. paratuberculosis Mycobacterium paratuberculosis

M. phlei Mycobacterium phlei

M. smegmatis Mycobacterium smegmatis

M. africanum Mycobacterium africanum

M. Canettii Mycobacterium canettii

M. microttii Mycobacterium microttii

ml Mililitro

PCR Polymerase Chain Reaction

pH Potencial de Hidrogênio

PNCBET Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose

UFC Unidade Formadora de Colônia

USP Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVO	23
3 REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1 HISTÓRICO	25
3.2 RESISTÊNCIA TÉRMICA	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 PREPARAÇÃO DO INÓCULO E CONTAMINAÇÃO DO LEITE	33
4.2 TRATAMENTO TÉRMICO	33
4.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	34
4.4 CONTAGEM DAS COLÔNIAS E REGISTRO DE RESULTADOS	35
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

O *Mycobacterium bovis* é o principal agente causador da tuberculose bovina, que é uma doença infecciosa, de caráter crônico e zoonótico, que pode ser transmitida aos seres humanos por meio do consumo do leite cru contaminado, bem como dos derivados lácteos produzidos com leite cru.

Uma das principais ferramentas de prevenção da transmissão da doença via leite é a pasteurização. No Brasil, os parâmetros legais de pasteurização do leite são: 62°C a 65°C por 30 minutos (pasteurização lenta) e 72°C a 75°C por 15 a 20 segundos (pasteurização rápida), de acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal – RIISPOA (BRASIL, 1952).

Esses critérios foram estabelecidos com base nos parâmetros de destruição do *M. bovis* e da *Coxiella burnetti*, considerados na época como as bactérias não formadoras de esporos mais resistentes ao calor. Estes parâmetros foram estabelecidos há muitos anos e, desde então, houve poucos estudos sobre o comportamento do *M. bovis* frente ao calor. No entanto, o advento da biologia molecular mostrou que há variabilidade genética na espécie e não há registros de estudos que tenham testado uma eventual variação na resistência térmica entre essas cepas.

Como uma grande coleção de cepas autóctones isoladas de bovinos abatidos no país vem sendo formada, devido ao desenvolvimento do Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001), o momento é propício para se fazer estudos mais detalhados sobre a resistência térmica destes diferentes isolados de *Mycobacterium bovis*.

2 OBJETIVO

Avaliar e comparar a inativação térmica de dois espoligotipos de *Mycobacterium bovis* (isolados de bovinos abatidos do estado de São Paulo) aos parâmetros de pasteurização lenta e rápida em banho-maria.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A tuberculose é uma doença causada por agente pertencente à família Mycobacteriaceae, gênero *Mycobacterium*, que são bastonetes curtos aeróbios, não capsulados, não flagelados, apresentam aspecto granular quando corados, são imóveis, com resistência a álcool e ácido, ou seja, a diversos tipos de desinfetantes e moderadamente resistentes ao calor (CPZ, 1988; CORNER, 1994; LAGE et al., 1998). Sobrevive no ambiente (pastos, estábulos, e esterco) por até dois anos, e em água por até um ano. As mycobactérias pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microttii*) são as causadoras da tuberculose em mamíferos (GRANGE; YATES, 1994; BIET et al., 2005). O *M. bovis* afeta várias espécies de animais silvestres e domésticos bem como o homem, neste caso é denominada de tuberculose zoonótica, onde o bacilo se propaga por meio da ingestão de leite contaminado de animais portadores do bacilo.

3.1 HISTÓRICO

Indícios encontrados em múmias na região da Alemanha indicam que as primeiras infecções causadas pelo *M. bovis* em humanos datam de 8000 – 4000 a.C. quando surgiram as primeiras criações de bovinos, no entanto se acredita que o agente já estava presente nestes animais causando a tuberculose antes do contato com humanos (DORMANDY, 2002; REICHMAN, TANNE, 2003).

A contaminação humana foi resultado da manipulação dos animais e também do consumo de leite contaminado (DORMANDY, 2002; REICHMAN, TANNE, 2003). No ano de 1810, Carmichael notou uma conexão entre a presença de tuberculose e o consumo de leite bovino nas crianças, concluindo, equivocadamente, que a doença resultava de um problema nutricional. Klencke, em 1846, relatou uma maior incidência de linfadenite tuberculosa em crianças alimentadas com leite de vaca do que nas alimentadas com leite materno, e em 1865, Villemin, utilizando coelhos inoculados com tecido contaminado proveniente de bovinos,

relatou que este seria mais infeccioso para os animais teste do que o mesmo tecido proveniente de humanos. Koch¹ (1882 apud FERREIRA; BERNARDI, 1997, p. 09) conseguiu cultivar o agente causador da doença nos homens e nos bovinos chamando-o de bacilo da tuberculose (Tuberkelbacillen).

Em 1917 foi nomeado o Comitê em Produção de Leite (Comitee on Milk Supply), este órgão foi criado com o intento de estudar vários aspectos referentes ao processamento do leite, em 1919 emitiu um relatório contendo várias pesquisas sobre os seguintes tópicos: a situação da pasteurização do leite na época; o efeito da pasteurização sobre as propriedades organolépticas do leite; o processo de pasteurização em si; os aparatos mecânicos e atividade dos estabelecimentos que realizam o processo; o controle feito nestes estabelecimentos e a vigilância realizada pelos estados e municípios para este processo. Após 1919 o Comitê decidiu focar suas pesquisas nos dois tópicos que acreditava ser os de maior ajuda às autoridades sanitárias, esses tópicos eram o tempo e temperatura necessários para eliminar ou inativar os patógenos, e o efeito da pasteurização sobre a capacidade de produzir creme do leite. A maioria dos autores pesquisados chegou à conclusão de que a alteração da capacidade de creme é mínima quando o leite é aquecido a 63°C por 30 minutos (WHITTAKER et al., 1925).

No Brasil, casos relatados associando a tuberculose de animais a dos humanos datam da década de 40, no entanto não existiam, na época, programas de controle da doença, existiam apenas os esforços de alguns estados (FERREIRA NETO; BERNARDI, 1997). Em 1941 é fundado o Serviço Nacional de Tuberculose, focada no controle do *M. tuberculosis*, que em 1942 lança a primeira Campanha Nacional Contra a Tuberculose (CONDE; SOUZA; KRITSKI, 2002).

A prevalência da tuberculose é marcante nos países em desenvolvimento devido à deficiência de programas de controle da doença, os quais envolvem a inspeção de carnes e pasteurização do leite (COSIVI et al., 1995; ABRAHÃO, 1998). No Brasil, segundo dados divulgados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2011), nem todo leite produzido no país é controlado pelos serviços oficiais de inspeção; aproximadamente 31,2% do leite produzido são consumidos pelo mercado informal, sem qualquer fiscalização higiênico-sanitária e, provavelmente, sem pasteurização.

¹ KOCH, R. Die Aetiologie der Tuberculose. Berlin, 1882

Dentro do rebanho bovino brasileiro, dados de 1989 a 1998, que levaram em conta notificações oficiais, mostraram que havia uma prevalência média nacional de 1,3% nos casos de tuberculose bovina. E de acordo com levantamento realizado em várias regiões produtoras do centro e sul de Minas Gerais, havia uma prevalência aparente de 0,8% de animais infectados (BRASIL, 2010).

O MAPA determina que todo o leite destinado ao consumo humano na forma fluida ou para fabricação de derivados, seja pasteurizado. O processo de pasteurização do leite consiste na exposição ao calor necessário para que se elimine completamente a presença de patógenos sem que se comprometam os seus atributos bioquímicos, ou suas propriedades organolépticas naturais. Os dois processos permitidos de pasteurização são o lento (62°C a 65°C por 30 minutos sob agitação lenta em maquinário apropriado) e o rápido (72°C a 75°C por 15 a 20 segundos, utilizando-se para isso um fluxo laminar), ambos os processos são seguidos por refrigeração do leite a temperaturas entre 2°C e 5°C de acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (BRASIL, 1952).

3.2 RESISTÊNCIA TÉRMICA

O primeiro relato de estudo de resistência térmica do *Mycobacterium bovis*, com finalidade de avaliar a segurança do consumidor, parece ser de Smith (1898). O autor relata que 60°C/20 minutos destroem o bacilo da tuberculose no leite, avaliado por inoculação em animais de laboratório. Smith alerta que a pasteurização do leite, em tubos, com a superfície exposta ao ar, pode acarretar resultados irregulares de morte térmica. Isso porque, uma ligeira evaporação levaria à formação de uma película de proteína e gordura, na qual alguns bacilos ficariam alojados e expostos a uma menor temperatura. Assim, sobreviveriam mais tempo ao tratamento, quando comparados com os que estão submersos no leite.

Os binômios de tempo temperatura da pasteurização do leite foram estabelecidos com base na sensibilidade térmica do *Mycobacterium bovis* e da *Coxiella burnetti*. Primeiramente, em 1924 revelou-se que o aquecimento a 61,1°C por 30 minutos eliminava o *M. tuberculosis* (NORTH; PARK, 1927) e após alguns anos, verificou-se que a *Coxiella burnetti* sobrevivia a 61,7°C por 30 minutos (HUEBNER et al., 1949), o que acarretou na alteração no padrão

oficial de pasteurização dos Estados Unidos, que passou a ser de 62,8°C por 30 minutos (STABEL, 2003).

O estudo de North e Park (1927) envolveu a realização de 15 experimentos, três utilizando recipientes abertos e doze utilizando um aparato com bobina de chumbo e tubos fechados, fazendo combinações de doze temperaturas (100°C, 93°C, 82°C, 77°C, 71°C, 68°C, 66°C, 63°C, 61°C, 60°C, 59°C, 58°C, 57°C e 55°C) com diferentes períodos de tempo (10, 20, 30 e 40 segundos; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 15, 17, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 75 e 90 minutos). As amostras de leite foram inoculadas em cobaias e mostraram que o tratamento a 61,1°C por 30 minutos ofereceria uma margem de segurança adequada contra o *M. tuberculosis* uma vez que de acordo com seus resultados a esta temperatura o bacilo era destruído depois de 10 minutos.

Em 1930, Oldenbusch; Frobisher; Shrader estudaram o ponto de morte térmica de *B. thyphosus*, *Streptococcus* beta hemolítico e *B. tuberculosis* em creme de leite e sorvete. Submeteram os substratos contaminados a várias combinações de tempo e temperatura (57 a 63°C por 30 segundo a 20 minutos) e inocularam 1 ml em cobaias, via subcutânea. O diagnóstico foi realizado pela pesquisa do bacilo álcool-ácido resistente em esfregaço das lesões observadas à necropsia. Houve inativação dos bacilos da tuberculose dentro de 6 minutos a 63°C e em 3 minutos 66°C.

Kells e Lear (1960) observaram que as curvas de inativação de três cepas de *M. tuberculosis* var. *bovis* foram lineares entre as temperaturas de 64°C e 69°C. O tratamento térmico foi realizado em equipamento que promovia o aquecimento instantâneo e homogeneização da amostra. Concluíram que num cenário de contaminação inicial de 4 log UFC/ml, que segundo Ball (1943) é a máxima contaminação natural do leite por esse agente, os padrões de pasteurização testados resultariam numa margem de segurança mínima de 28,5 minutos no processo lento (62°C) e 14 segundos no rápido (72°C).

Posteriormente Harrington e Karlson (1965) pegaram várias cepas de *Mycobacterium* (*M. tuberculosis, M. bovis, M.avium, M. fortuitum, e bacilo Calmette-Guerin-BCG*) e expuseramnas aos binômios de tempo e temperatura (62,8°C/30 minutos e 71,7°C/15 segundos), utilizando técnica em que o leite é aquecido até a temperatura alvo e então inoculado com o agente. Relatam que nenhuma cepa apresentou sobreviventes viáveis, pelo método de contagem de colônias, após exposição a qualquer dos dois processos.

Pavlas (1990) testou a resistência de 105 cepas de sete espécies de *Mycobacterium* (*M. bovis*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. avium-intracellulare*, *M. smegmatis*, *M. phei*) a diversos binômios de tempo e temperatura (60°C, 65°C, 70°C, e 75°C nos períodos de tempo de 10, 20, e 40 segundos; 2, 4, 8, 16, 30 minutos; 1, 2, 4, 6 e 8 horas). Ressuspendeu a cultura em água destilada estéril e colocou em tubos capilares de vidro para o tratamento térmico. Utilizou meio sólido e meio sérico líquido para a recuperação das micobactérias. Concluiu que as cepas de *M. bovis* são as menos resistentes e apresentaram desvitalização total após apenas 16 minutos a 60°C, 2 minutos a 65°C e 10 segundos a 70°C e 75°C. O autor afirma que os resultados do teste se aplicam à higiene dos alimentos e recomenda que sejam realizados testes de termo resistência com espécies patogênicas de *Mycobacterium*, para uma melhor compreensão de suas características.

A partir dos anos 90 foram necessários testes para avaliar se os parâmetros oficiais de tempo e temperatura de pasteurização do leite asseguravam a inativação do *Mycobacterium* paratuberculosis (TAYLOR et al.,1998), que causa a doença de Johne (paratuberculose) nos animais, uma enterite crônica que ataca os ruminantes causando perda de peso, queda na produção de leite e morte do animal infectado. Esse agente pode ser transmitido pelo leite e, embora não haja consenso entre os pesquisadores, há indícios de que esse agente seja causador da doença de Crohn no homem (RUDOLER, 1998).

Chiodini e Taylor (1993) testaram a resistência térmica de duas cepas de *M. paratuberculosis* (3737, ATCC 19698) isoladas de bovinos, para tanto, testaram o leite à temperatura de 63°C por 30 minutos e a 72°C por 15 segundos, em Banho-Maria com agitação contínua. partindo de uma carga infectante de 10³ – 10⁵ organismos/ml de leite. Após o tratamento térmico fez a quantificação utilizado o método de contagem de colônias. Reportaram uma desvitalização de agente em 90% das amostras, no entanto, também relatam que 5-9% de organismos por mililitro permaneceu ativa em amostras que foram resfriadas muito rapidamente, levantando a hipótese de que a rápida queda de temperatura leva a uma diminuição do tempo de exposição ao calor, preservando o agente.

Grant, Ball e Rowe (1998) testaram a resistência do *M. paratuberculosis* à pasteurização rápida (72°C por 15 segundos), para as seguintes cargas iniciais infectantes (10³ UFC/ml, 10² UFC/ml, 10 UFC/ml, 10 UFC/50 ml), encontrando após o tratamento térmico e a contagem das colônias, pequenas concentrações de sobreviventes nas amostras com carga inicial infectante de 10³ UFC/ml e 10² UFC/ml, e total inativação do agente nas demais, concluem

que este método de tratamento térmico seria eficiente para o controle de *M. paratuberculosis* no leite, mas revelam variações na desvitalização do agente no que se refere à carga infectante.

Alguns trabalhos revelam a dificuldade de se comparar resultados de inativação térmica entre cepas de *Mycobacterium* spp.

Sung e Collins (1998) construíram curvas de morte térmica para cepas humanas e bovinas de *Mycobacterium paratuberculosis*, em leite e em solução de lactato. A inoculação era feita no substrato pré-aquecido por 30 minutos à temperatura alvo (62°C, 65°C, 68°C ou 71°C) e a quantificação foi feita em vários tempos (de 0 a 960 segundos) pelo Método de cultura radiométrica (BACTEC). Observaram que os valores D de células simples não foram significativamente diferentes daqueles obtidos para células agrupadas (*clumping*), o valor D das cepas clinicas de baixa passagem foi significativamente mais baixo que das cepas de alta passagem; as cepas de baixa passagem mostram a mesma tolerância térmica nos dois substratos, mas as cepas de alta passagem foram significantemente influenciadas pelo substrato.

Valor D indica o tempo, em minutos, necessário para reduzir 1 ciclo logarítmico de um agente, a uma dada temperatura (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Pearce et al. (2001) realizaram uma simulação das condições comerciais de pasteurização, e seu efeito sobre o *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* utilizando para tanto um pasteurizador comercial, em fluxo com turbilhonamento. Três cepas do agente isoladas de bovinos e duas de humanos foram inoculadas em leite cru integral, e expostas aos seguintes tratamentos térmicos (15 segundos nas temperaturas 63, 66, 69 e 72°C) todos os testes foram realizados em duplicata. Relatam que todas as cepas provenientes de isolados de bovinos foram efetivamente destruídas, mas ressalta os diferentes níveis de resistência térmica existentes no que concerne a origem das amostras particularmente o fato de que agentes isolados de humanos tendem a ser mais resistentes ao calor do que os isolados de bovinos, e agentes provenientes de culturas in vitro são mais resistentes do que os retirados frescos de lesões.

Klinjn, Herrewegh e De Jong (2001), com base em dados publicados fizeram uma avaliação crítica das dificuldades de interpretação de resultados sobre os efeitos da temperatura na morte do *Mycobacterium avium paratuberculosis*. Concluem que a variação da redução do

número de colônias no processo de tratamento térmico se dá devido a muitos fatores, que não podem não estar relacionados a uma maior resistência térmica do agente, entre eles: cepas com grande quantidade de subculturas em laboratório tendem a ser mais resistentes ao calor do que as amostras frescas no caso do agente estudado; formação de aglomerados de células na amostra protegendo as células da ação do calor; a forma como o calor é aplicado à amostra de leite interferindo na eficácia do processo uma vez que o modo comercial propõe um préaquecimento do leite antes do tratamento propriamente dito, e a aplicação de calor na amostra juntamente com turbilhonamento e fluxo, já na pasteurização realizada em laboratório o processo é feito a temperaturas mais baixas e períodos mais longos e a amostra é resfriada em gelo ao final do processo. Também relatam que quanto à leitura de resultados uma grande dificuldade se apresenta quando se tenta determinar as unidades formadoras de colônia, isso se dá devido não só a presença de agentes viáveis mas não cultiváveis como também devido a tendência do *Mycobacterium avium* de formar grumos, o que resulta em um valor de contagem menor do que o valor real.

Mcdonald et al. (2005) utilizaram um pasteurizador industrial modificado para pesquisa, com o propósito de submeter leite integral artificialmente inoculado com *M. avium* subespécie *paratuberculosis* a combinações de três temperaturas (72°C, 75°C, e 78°C) e três tempos (15, 20, e 25 segundos), para testar a eficácia do processo sobre este agente. Também foi testada a influência da concentração inicial do agente e para tanto se utilizou uma carga infectante muito maior do que a normalmente encontrada (7,5 X10⁵ CFU/ml). Relatam que o processo se mostrou eficaz em destruir mais de 6 ciclos logarítmicos do agente em 85% dos testes e mais de 4 ciclos logarítmicos nos demais.

Grant et al. (2004) testaram a resistência térmica do *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* à pasteurização rápida com e sem homogeneização, utilizando um pasteurizador comercial e amostras artificialmente contaminadas com 10¹ a 10⁵ células/ml em leite cru. Registra a desvitalização completa do agente em 96,7% das amostras no processo de pasteurização rápido com ou sem homogenização, realizada antes do processo em alguns testes e durante em outros. Afirma que houve maior redução logarítmica (4,0 a 5,2 log) nas repetições em que a amostra foi homogeneizada e atribui este aumento na eficiência do processo ao fato do movimento desfazer os aglomerados de células, permitindo assim que o calor incida mais diretamente no *Mycobacterium* resultando numa maior desvitalização.

Há relatos do efeito protetor da gordura sobre *Mycobacterium fortuitum* quanto exposto à pasteurização. Nishimoto (2006) contaminou leite integral e desnatado com *M. fortuitum* (NCTN 8573) a temperatura de 65°C por 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos e posteriormente cultivou-o em meio Lowenstein-Jensen, onde foi realizada contagem das colônias. O valor D para o leite integral foi de 18,02 minutos e para o desnatado, de 7,82 minutos. Esse efeito foi menos evidente em leite caprino, testado por Starikoff (2006) em experimento semelhante ao de Nishimoto (2006). Encontrou valor D para o leite caprino integral de 10,2 minutos e para o leite caprino desnatado, de 8,61 minutos.

Ao fim dos anos 90, com o auxilio das técnicas de PCR e *spoligotyping*, foi possível a diferenciação de isolados em categorias dentro da espécie de *Mycobacterium bovis*. Rodriguez et al. (2005) identificou, usando a técnica de *spoligotyping*, grande variabilidade genética entre os isolados de *M. bovis* provenientes de bovinos abatidos no estado de São Paulo, no período de 2002 a 2003. Costa et al. (2010) em estudo semelhante realizado no estado da Bahia, isolaram três espoligotipos de *M. bovis* (SB1055, SB0120 e SB0268).

A partir da coleção de isolados de Rodriguez et al. (2004), dois trabalhos foram realizados para avaliar a sensibilidade térmica de 5 espoligotipos de *M. bovis* (SB0121, SB0295, SB0120, SB0881 e SB1141) em leite bovino integral UHT submetido aos binômios de pasteurização lenta (FELIPE, 2009) e de pasteurização rápida (RIBEIRO, 2009), em Banho-Maria. Cada cepa foi testada 3 vezes as amostras foram analisadas antes e durante a pasteurização (em vários tempos). Nos dois trabalhos, os resultados foram obtidos através da contagem de colônias em meio Stonebrink-Leslie incubado a 37°C/45 dias. Os espoligotipos SB0120 e SB1141 foram, respectivamente, o menos e o mais resistente aos dois tratamentos térmicos (65°C/30 minutos e 75°C/20 segundos). O SB0120 reduziu, em média, 5,7 e 5,6 log UFC/ml, respectivamente na pasteurização lenta e rápida. Já o SB1141 reduziu em média 0,4 e 3,4 log UFC/ml, respectivamente, na lenta e na rápida.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Leite UHT integral foi contaminado com dois espoligotipos (SB0120 e SB1033) de *Mycobacterium bovis* (isolados de bovinos abatidos no estado de São Paulo) e então submetido a tratamento térmico em banho-maria a 65°C/30 minutos e 75°C/20 segundos reproduzindo, respectivamente, os parâmetros de pasteurização lenta e rápida.

4.1 PREPARAÇÃO DO INÓCULO E CONTAMINAÇÃO DO LEITE

Utilizaram-se culturas com 15 dias de crescimento a 36°C, em meio Stonebrink-leslie. Uma massa equivalente a 0,300g das colônias foi misturada com 0,5ml de solução salina 0,85% com 0,05% de detergente Tween 80 e homogeneizada vigorosamente. Foram então adicionados mais 11,5 ml de solução salina 0,85%, e após homogeneização a solução do inóculo foi transferida para um frasco shott de 250 ml contendo pequenas esferas de vidro para evitar a formação de grumos.

Dois mililitros deste inóculo foram utilizados para contaminar 25 ml do leite UHT integral (temperatura ambiente), em frasco Shott de 250 ml. Após homogeneização, o leite contaminado foi distribuído em cinco tubos de ensaio (16mmx160mm), 5 ml de leite em cada. Um tubo foi empregado para a quantificação do agente (controle positivo), dois foram utilizados na pasteurização lenta e dois na rápida, um para a quantificação no início e outro fim de cada processo (Figura 1).

4.2 TRATAMENTO TÉRMICO

Inicialmente os tubos foram colocados em banho-maria a 85°C, para agilizar a etapa de aquecimento da amostra. Ao atingir a temperatura desejada, 65°C ou 75°C, os tubos foram retirados e aquele destinado à análise no início do processo térmico, foi resfriado em gelo picado, enquanto o tubo destinado à análise no final do processo foi transferido para outro banho-maria ajustado à temperatura alvo (65°C ou 75°C) para a realização do tratamento

térmico propriamente dito, permanecendo neste banho, respectivamente por 30 minutos e 20 segundos, e posteriormente resfriados em gelo picado.

O controle da temperatura do tratamento térmico foi realizado pelo uso de termômetro de mercúrio nos banhos, e em uma amostra de leite.

Foi realizado um teste, com 5 repetições, para avaliar o tempo necessário para atingir as temperaturas-alvo (fase de aquecimento).

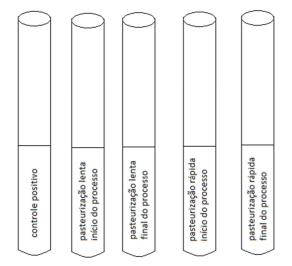


Figura 1 - esquema dos tubos contendo as amostras de leite contaminadas com *Mycobacterium bovis* para o estudo de sobrevivência à pasteurização em banho-maria

4.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

As amostras de leite (controle positivo e as amostras submetidas ao processo de pasteurização) foram homogeneizadas em vortéx por 10 segundos e submetidas à diluição decimal seriada em água peptonada a 0,1%. Cem microlitros de cada diluição foram semeados em duplicata em garrafas (garrafas para cultivo celular com 25 cm² de superfície) com meio Stonebrink-Leslie e incubadas a 36° por 45 dias (Figura 2). Salienta-se que durante as primeiras 24 horas, as garrafas foram mantidas com o fechamento "incompleto" (girando a tampa até o primeiro "clique"), para evitar a condensação de umidade na parede da garrafa

que dificulta a visualização das colônias. Após esse período as garrafas foram fechadas completamente.

4.4 CONTAGEM DAS COLÔNIAS E REGISTRO DE RESULTADOS

A diluição de eleição para a contagem foi a que apresentou entre 10 e 150 colônias. Foi feita a média aritmética das UFC (unidade formadora de colônia) das duas garrafas e o resultado foi multiplicado por 10 (correção da alíquota semeada = 0,1mL) e pelo inverso da diluição. O resultado foi convertido em logaritmo decimal e expresso como Log UFC/ml de leite.

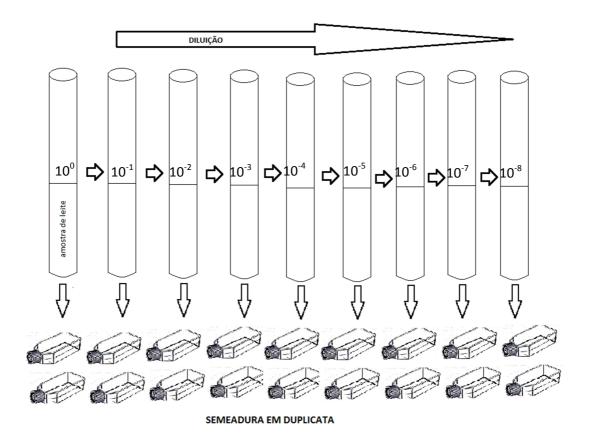


Figura 2 - esquema de diluição decimal seriada em água peptonada 0,1% e semeadura nas garrafas contendo o meio Stonebrink-Leslie

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação da taxa de redução das contagens (em Log UFC/ml) entre os dois espoligotipos foi realizada pelo método Mann-Whitney, para amostras independentes, usando o programa Minitab 16 (Minitab Inc., 2010).

Para a comparação dos processos de pasteurização lenta e rápida, utilizou-se o método Wilcoxon (amostras dependentes), utilizando o programa usando o programa Minitab 16 (Minitab Inc., 2010). Para usar esse método nesse programa, foi necessário primeiro calcular a diferença entre os dados da lenta e da rápida e esse valor é utilizado pelo método para calcular a significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 sumariza os resultados da quantificação de *Mycobacterium bovis* (espoligotipos SB0120 e SB1033) submetidos aos processos térmicos que mimetizam a pasteurização lenta e rápida e a tabela 2 sumariza a eficácia da pasteurização em reduzir as contagens dos dois espoligotipos, na fase de aquecimento (até atingir a temperatura alvo da pasteurização), na fase de manutenção da temperatura alvo (durante o tempo necessário) e a somatória das duas etapas. O gráfico 1 ilustra a redução das contagens de cada espoligotipo, quando submetidos a cada um dos processos térmicos.

Tabela 1- Resultados das contagens (log UFC/ml) do *Mycobacterium bovis* (espoligotipos SB0120 e SB1033) experimentalmente inoculado em leite UHT integral e submetido aos binômios de tempo e temperatura de pasteurização lenta e rápida, em banho-maria - São Paulo – SP. Ago. 2010 a Maio 2011

	_	log UFC/mL de leite							
			pasteurização lenta		pasteurização rápida				
		controle	(65 °C/30 min.)		(75 °C/20 seg.)				
	repetição	positivo	inicio	fim	inicio	fim			
SB0120	1	7,1	3,9	2,8	4,8	2,0			
	2	6,7	3,4	3,2	3,4	2,9			
	3	7,6	3,9	3,3	3,8	4,7			
	4	7,4	4,6	3,6	3,9	3,4			
	5	6,9	4,5	2,7	2,9	1,7			
	média	7,1	4,1	3,1	3,8	2,9			
SB1033	1	7,6	3,7	3,5	3,7	3,3			
	2	7,7	2,8	3,5	3,0	2,9			
	3	8,7	5,9	3,4	3,7	3,6			
	4	9,2	5,5	4,8	3,8	3,3			
	5	7,8	4,6	3,4	4,7	4,4			
	média	8,2	4,5	3,7	3,8	3,5			

Não houve diferença entre os espoligotipos estudados quando submetidos à pasteurização lenta ou rápida. Em valores médios, a pasteurização lenta causou uma redução total de 4,0 log UFC/ml do espoligotipo SB0120 e 4,5 log UFC/ml do SB1033 (p=0,1745), enquanto a pasteurização rápida reduziu 4,2 e 4,7 log UFC/ml (p=0,6015), respectivamente dos espoligotipos SB0120 e SB1033.

Quando se comparou a eficácia da pasteurização lenta com a da rápida, para cada espoligotipo, também não houve diferença (p variou entre 0,500 e 0,787), mostrando que os

processos são equivalentes. Foi comparada, para cada espoligotipo, a eficácia das etapas: aquecimento, manutenção da temperatura alvo e a somatória das duas etapas.

Tabela 2 - Taxa de redução do *Mycobacterium bovis* (espoligotipos SB0120 e SB1033) inoculado em leite UHT integral, devido à pasteurização lenta e rápida reproduzida em banho-maria: fase de aquecimento, fase de manutenção da temperatura e a somatória de ambas - São Paulo - SP. Ago. 2010 a Maio 2011

		redução log UFC/mL de leite								
		pasteurização lenta			pasteurização rápida					
espoligotipo	repetição	aquecimento	(65 °C/30 min.)	total	aquecimento	(75 °C/20 seg.)	total			
SB0120	1	3,2	1,1	4,3	2,3	2,8	5,1			
	2	3,3	0,2	3,5	3,3	0,5	3,8			
	3	3,7	0,6	4,3	3,8	-0,9	2,9			
	4	2,8	1,0	3,8	3,5	0,5	4,0			
	5	2,4	1,8	4,2	4,0	1,2	5,2			
	média	3,1	0,9	4,0	3,4	0,8	4,2			
SB1033	1	3,9	0,2	4,1	3,9	0,4	4,3			
	2	4,9	-0,7	4,2	4,7	0,1	4,8			
	3	2,8	2,5	5,3	5,0	0,1	5,1			
	4	3,7	0,7	4,4	5,4	0,5	5,9			
	5	3,2	1,2	4,4	3,1	0,3	3,4			
	média	3,7	0,8	4,5	4,4	0,3	4,7			

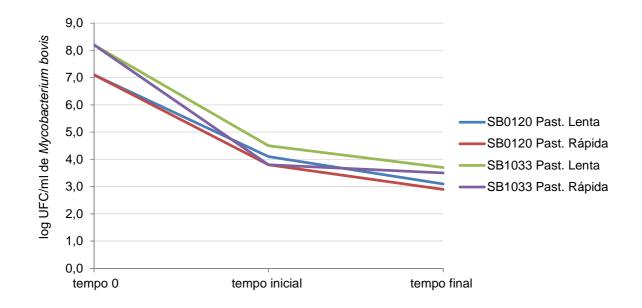


Gráfico 1 – Curva de redução de dois espoligotipos (SB0120 e SB1033) de *Mycobacterium bovis* submetidos aos parâmetros de pasteurização lenta (65°C/30min.) e rápida (75°C/20 seg.) em banho-maria, nos tempos zero (antes do aquecimento), tempo inicial (início do processo de pasteurização), e tempo final (ao final do processo de pasteurização)

Avaliando a eficácia de cada etapa do processamento térmico, a fase de aquecimento foi mais importante na redução das contagens dos dois espoligotipos, tanto na pasteurização lenta quanto na rápida, o que pode ser facilmente observado no gráfico 1. Vale a pena salientar, para evitar distorções de interpretação, que temperaturas letais ao agente são atingidas apenas no final da curva de aquecimento.

Isso é particularmente interessante quando se analisa a pasteurização lenta, já que foi necessário 1 minuto e 40 segundos, em média, para o leite chegar a 65°C. Observa-se na tabela 2 que essa fase reduziu 3,1 e 3,7 log UFC/ml, respectivamente para os espoligotipos SB0120 e SB1033, enquanto que o período de manutenção (30 min.) causou redução, respectivamente, de 0,9 e 0,8 log UFC/ml.

O aquecimento também foi mais importante na eficácia da pasteurização rápida. Foram necessários cerca de 2 minutos para atingir a temperatura desejada (75°C), o que causou uma redução média de 3,4 e 4,4 log UFC/ml dos espoligotipos SB0120 e SB1033, respectivamente. Os 20 segundos a 75°C reduziram em média 0,8 e 0,3 log UFC/ml, respectivamente, dos espoligotipos SB0120 e SB1033.

Há poucos dados disponíveis na literatura sobre a resistência térmica do *Mycobacterium*, para serem comparados aos desta pesquisa e os que estão publicados diferem em vários aspectos, que podem dificultar a interpretação das diferenças observadas, especialmente no que se refere às características da cepa estudada, substrato em que o teste foi realizado, préaquecimento ou não do substrato, condições de reprodução da pasteurização, método para a quantificação/recuperação do agente, meio de cultura empregado, entre outros.

No entanto, alguns estudos, que foram realizados com a mesma metodologia empregada nesse trabalho, também observaram que a fase de aquecimento foi mais importante na redução do *M. bovis* submetido à pasteurização lenta e rápida em leite integral (FELIPE, 2009; RIBEIRO, 2009).

Em estudo com *M. fortuitum* em leite integral e desnatado submetido à pasteurização lenta em banho-maria, Nishimoto (2006) também observou importante redução do agente durante a fase de aquecimento em leite integral, mas não no leite desnatado. Por outro lado, os resultados de Starikoff (2006), que fez um teste semelhante em leite caprino, essa fase teve pouco efeito sobre a curva de morte térmica. Esses dados reforçam que outros fatores, como o

teor de gordura do leite e a espécie animal da qual o leite é oriundo, podem influenciar a curva de morte de um patógeno.

Felipe (2009) e Ribeiro (2009) que estudaram 5 espoligotipos de *M. bovis* em leite integral submetidos à pasteurização lenta e rápida, respectivamente, também utilizaram o espoligotipo SB0120, proveniente da mesma coleção ora utilizada. Esse isolado apresentou-se mais sensível naqueles estudos do que no presente. A redução média obtida pelos autores foi de 5,7 e 5,6 log UFC/ml, respectivamente na pasteurização lenta e rápida, enquanto no presente trabalho a redução média foi de 4,0 e 4,2 log UFC/ml, respectivamente na lenta e na rápida. Esse aparente aumento na resistência pode estar associado às sucessivas passagens em meio de cultura desde os testes realizados por Felipe e Ribeiro; esse fenômeno foi salientado por Sung e Collins (1998) e Pearce et al. (2001).

Kells e Lear (1960) construíram uma curva de sobrevivência do *M. tuberculosis* var. *bovis*, encontrando uma redução de 4 ciclos logarítmicos do agente em 1,5 minutos a 61,6°C. Concluíram que num cenário de contaminação inicial de 4 log UFC/ml, que segundo Ball (1943) é a máxima contaminação natural do leite por esse agente, os padrões de pasteurização testados resultariam numa margem de segurança mínima de 28,5 minutos no processo lento (62°C) e 14 segundos no rápido (72°C). O valor D das três cepas variou de 1 a 3 segundos para as temperaturas 64°C e 69°C; isso significa que seriam necessários de 1 a 3 segundos para reduzir um ciclo logarítmico dessas cepas, nas temperaturas testadas; salienta-se que para o cálculo do valor D, se usa o tempo de manutenção à temperatura alvo, desconsiderando as reduções que possam ocorrer durante a fase de aquecimento e ou resfriamento. Esses resultados estariam de acordo com os valores encontrados anteriormente por North e Park (1927).

No presente estudo, essa grandeza de redução (4 log UFC/ml) só foi observada no final do processo (redução total), tanto para a pasteurização lenta quanto para a rápida; nenhum dos 5 processos de pasteurização lenta ou rápida acarretou esse grau de redução no período de manutenção da temperatura (30 min. a 65°C e 20 seg. a 75°C).

Harrington e Karlson (1965) testaram cepas de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M.avium*, *M. fortuitum*, e bacilo Calmette-Guerin-BCG, e nenhuma apresentou sobreviventes viáveis (contagem de colônias) após exposição a 62,8°C/30 minutos ou 71,7°C/15 segundos. No entanto, dois fatos podem ter contribuído para a maior eficácia, em comparação com o presente estudo: 1) a matriz-teste foi o leite desnatado; Nishimoto (2006) observou efeito

protetor da gordura do leite sobre o *Mycobacterium fortuitum* quando submetido aos binômios de pasteurização lenta; a autora registrou reduções de 5,1 log UFC/ml em leite desnatado e 1,9 log UFC/ml em leite integral tratados a 65°C/30 minutos em banho-maria; 2) a contaminação foi realizada no leite já aquecido.

Pavlas (1990) também relata a desvitalização total de *M. bovis* (38 cepas foram testadas) usando a técnica de tubos capilares e como matriz, a água destilada. Esse resultado foi obtido após 16 minutos a 60°C e 10 segundos a 70°C e 75°C. O autor testou a resistência de 105 cepas de sete espécies de *Mycobacterium* a diversos binômios de tempo e temperatura, e observou que o *M. bovis* foi a espécie menos resistente. No entanto, é bastante razoável imaginar que a termo resistência do *M. bovis* seja maior em leite integral, como realizado na presente pesquisa, do que em água destilada.

A partir dos anos 90, o foco dos trabalhos para avaliar a eficácia da pasteurização foi a resistência térmica do *Mycobacterium paratuberculosis*.

Grant, Ball e Rowe (1998), testando a resistência do *M. paratuberculosis* à pasteurização rápida (72°C por 15 segundos) concluíram que este método é eficiente para o controle de *M. paratuberculosis* no leite, mas alertam para as variações na desvitalização do agente, no que se refere à carga infectante. Obtiveram total inativação do agente quando as cargas iniciais eram de 10 UFC/ml, 10 UFC/50 ml, mas com cargas iniciais de 10³ UFC/ml e 10² UFC/ml houve pequenas concentrações de sobreviventes nas amostras.

Sung e Collins (1998), que construíram curvas de morte térmica para cepas humanas e bovinas de *Mycobacterium paratuberculosis*, em leite e em solução de lactato pré-aquecidos por 30 minutos para as respectivas temperaturas alvo (62°C, 65°C, 68°C e 71°C) antes da inoculação. A quantificação foi realizada por cultura radiométrica. Relatam que o pré-aquecimento do substrato teve grande influência na eficácia do processo térmico.

As conclusões de Pearce et al. (2001), que realizou uma simulação das condições comerciais de pasteurização, utilizando para tanto um pasteurizador comercial, em fluxo com turbilhonamento, dizem que todas as cepas provenientes de isolados de bovinos foram efetivamente destruídas, no entanto os diferentes níveis de resistência térmica encontrados podem ser atribuídos a origem das amostras, mais particularmente, os autores explicam que agentes isolados de humanos tendem a ser mais resistentes ao calor do que os isolados de bovinos, e agentes provenientes de culturas em laboratório tendem a ser mais resistentes do

que os retirados frescos de lesões, assim a comparação com a presente pesquisa gera algumas dúvidas uma vez que foram utilizadas cepas cultivadas em vitro.

Mcdonald et al. (2005) utilizaram um pasteurizador industrial modificado para o propósito de pesquisa e relatam que o processo se mostra eficaz em destruir o agente completamente, no entanto, deve-se levar em consideração que as condições simuladas neste experimento são as de um pasteurizador comercial, e não de laboratório, assim sendo temos juntamente com o calor a homogeneização e fluxo do leite durante a pasteurização. Como revelado por Grant et al. (2004) que testaram a pasteurização com e sem homogeneização, e registraram uma redução logarítmica maior no processo em que a amostra foi homogeneizada, pois o movimento desfaz os aglomerados de células, e quando o calor age o *Mycobacterium* está mais exposto, resultando numa maior eficácia do processo.

Esses fatos podem explicar porque alguns autores observaram desvitalização completa do inóculo, após testes de pasteurização lenta ou rápida (NORTH; PARK, 1927; PARK, 1927; OLDENBUSCH; FROBISHER; SHRADER, 1930; KELLS; LEAR, 1960; HARRINGTON; KARLSON, 1965; PAVLAS, 1990; GRANT; BALL; ROWE, 1996; GRANT et al., 2004) enquanto esse fato não ocorreu nesta pesquisa e nem nas pesquisas realizadas por Felipe (2009) e Ribeiro (2009), que testaram cinco espoligotipos de *M. bovis*, respectivamente à pasteurização lenta e rápida em leite integral UHT, em banho-maria, e por Starikoff (2006) e Nishimoto (2006), que testaram *M. fortuitum* à pasteurização lenta em banho-maria, respectivamente em leite de cabra integral e desnatado e em leite de vaca integral e desnatado. Vale ressaltar que esses 4 últimos autores utilizaram a mesma metodologia empregada na presente pesquisa.

Outros espoligotipos devem ser testados para avaliar a segurança que pasteurização oferece ao consumidor, considerando as estirpes circulantes no país. Sugere-se que se use isolados recentes para futuros testes, pois como se observou, com base na comparação com os resultados obtidos por Felipe (2009) e Ribeiro (2009) para o espoligotipo SB0120, pode haver um aumento na resistência térmica em cepas mantidas em laboratório. A obtenção desse tipo de informação é de grande relevância em estudos de "Avaliação do Risco" como forma de municiar o governo com dados valiosos para o adequado "Gerenciamento do Risco", etapas importantes da metodologia de "Análise de Risco".

Se considerarmos a máxima contaminação natural do leite relatada por Ball (1943), de 4 log UFC/ml, os processos térmicos estudados causariam uma redução da população para níveis

abaixo do detectável pela técnica usada neste estudo. Salienta-se, no entanto, que não se conhece a dose infectante para esse agente, no leite.

6 CONCLUSÕES

Os dois espoligotipos estudados de *Mycobacterium bovis* (SB10120 e SB1033) apresentaram sensibilidade térmica similar, independentemente do processo de pasteurização empregado (lento ou rápido), nas condições do estudo.

A fase de aquecimento foi mais importante na eficácia do processo de pasteurização (tanto na lenta quanto na rápida) para os dois espoligotipos estudados.

Nas condições desse estudo, tanto a pasteurização lenta quanto a rápida determinaram reduções, em média, iguais ou superiores a 4 log UFC/ml, valor citado por Ball (1943) como a máxima contaminação natural do leite por *M. bovis*.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, R. M. C. **Tuberculose humana causada pelo Mycobacterium bovis:** considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

ABRAHÃO, R. M. C. M.; NOGUEIRA, P. A.; MALUCELLI, M. I. C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco de transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n. 2, p. 1-17, 2005.

BALL, C. O. Short-time pasteurization of milk. **Industrial Engeneering Chemistry**, v. 35, p. 71-84, 1943.

BEHR, M. A.; COLLINS, D. M. Paratuberculosis Organism, Disease, Control. United Kingdom: CAB International, 2010. 375 p.

BIET, F.; BOSCHIROLI, M. L.; THOREL, M. F.; GUILLOTEAU, L. A. **Zoonotic aspects** of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). A **Review**. Veterinary Research. v. 36, p. 411-436, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Divisão de Normas Técnicas. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Brasília – DF, 1952.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretária de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa DAS n. 6, de 08 de janeiro de 2004. Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 de janeiro 2004 Sec. 1, n. 07, p. 06-10.

BRASIL. Conselho Regional de Medicina Veterinária do Paraná; Conselho Regional de Medicina Veterinária de Santa Catarina; Conselho Regional de Medicina Veterinária **Programa de zoonoses Região sul Manual de Zoonoses**. 2ª ed. Santa Catarina: CRMV, 2010. v. 1.

CARMICHAEL, R. Essay on the nature of scrofula, with evidence of its origin from disorders of the digestive organs. London: Callow, 1810.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS – CPZ. Manual de normas y procedimientos técnicos para La bacteriologia de La tuberculosis III. Sensibilidad Del Mycobacterium tuberculosis a las drogas. La indentificación de micobactérias. Buenos Aires, 1988. 63p.

CHIODINI, R. J.; TAYLOR, J. H. The thermal resistance of mycobacterium paratuberculosis in raw milk under conditions simulating pasteurization. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, p. 629-631, 1993.

CONDE, M. B.; SOUZA, G. M.; KRITSKI, A. L. **Tuberculose sem medo**. São Paulo: Atheneu, 2002.

CORNER, L. A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 53-63, 1994.

COSIVI, O.; MESLIN, F. X.; DABORN, C. J.; GRANGE, J.M. Epidemiology of Mycobacterium bovis infection in animals and humans, with particular reference to Africa. **Revue Scientifique et Techinique**. v. 14, n. 3, p. 733–746, 1995.

COSIVI, O.; GRANGE, J. M.; DABORN, C. J.; RAVIGLIONE, M. C.; FUJIKURA, T.; COUSINS, D.; ROBINSON, R. A.; HUCHZERMEYER, H. F. A. K.; DE KANTOR, I.; MESLIN, F. X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium* bovis in developing countries. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, p. 59-70, 1998.

COSTA, A. C. F.; ROCHA, V. C. M.; RODRIGUEZ, C. A. R.; LIMA, A. E.; MOREIRA, E. L. T.; MADRUGA, C.; ARRUDA, S. M.; FERREIRA NETO, J. S.; SILVA, M. C. A.; OLIVEIRA, e M Deus. Tipificação genética, através da técnica de spoligotyping, de isolados de Mycobacterium bovis em animais abatidos na região metropolitana de Salvador Bahia, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 233-237, 2010.

DORMANDY, T. **The White death: a history of tuberculosis**. 3 ed. London: Hambledon & London, 2002. 448 p.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Gado de Leite. Estatísticas do leite**: Produção: Tabela 02.31. Leite inspecionado no Brasil, 2000/2010. Disponível em: < http://www.cnpgl.embrapa.br/>. Acesso em: 27 out. 2011.

FELIPE, T. H. Resistência térmica de diferentes espoligotipos de *Mycobacterium bovis* à pasteurização lenta (65°C) em leite experimentalmente inoculado. 2009. 45 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

FERREIRA NETO, J. S.; BERNARDI, F. O controle da tuberculose bovina. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 47, p. 9-13, 1997.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. In: **Controle do desenvolvimento microbiano nos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 111.

GRANGE, J.M.; YATES, MD. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. **Veterinary Micobiology.** V. 40, p. 137-151, 1994.

- GRANT, I. R.; BALL, H. J.; ROWE, M. T. Thermal Inactivation of several Mycobacterium spp. In milk by pasteurization. **Letters in applied Microbiology**, v. 22, p. 253-256, 1996.
- GRANT, I. R.; BALL, H. J.; ROWE, M. T. Effect of high-temperature, short-time (HTST) pasteurization on milk containing low numbers of *Mycobacterium paratuberculosis*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 166-170, 1998.
- GRANT, I. R.; WILLIAMS, A. G.; ROWE, M. T.; MUIR, D. D. Efficacy of Various Pasteurization Time-Temperature Conditions in Combination with Homogenization on Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 6, p. 2853-2861, 2004.
- HARRINGTON, R.; KARLSON, A. G. A destruction of various kinds of mycobacteria in milk pasteurization. **Applied Microbiology**, v. 13, p.494-495, 1965.
- HIJJAR, M. A.; PROCOPIO, M. J.; OLIVEIRA, R. de; TEIXEIRA, G. M. A Tuberculose no Brasil e no Mundo. **Boletim de Pneumologia Sanitária** v. 9, n. 2, p. 9 -16, jul/dez 2001.
- HUEBNER, R. J.; JELLISON, W. L.; BECK, M. D.; WILCOX, F. P. Q fever studies in southern California: III. Effects of pasteurization on survival of *C. burnetti* in naturally infected milk. **Public Health Reports**, v. 64, p. 499-511, 1949.
- KELLS, H. R.; LEAR, S. A. Thermal death time curve of Mycobacterium tuberculosis var. Bovis in artificially infected milk. **Applied Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 234-236, 1960.
- KLENCKE, F.H. Uber ansteckung und verbreitung der scrophelkrankheit bei menschein durch den genus der kuhmilch. Leipzig, 1840.
- KLINJIN, N.; HERREWENGH, A. A. P. M.; DE JONG, P. Heat inactivation data for Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis; implications for interpretation. NIZO Food Research. **Netherlands Institute for Dairy Research**, v. 91, p. 697-704, 2001.
- LAGE, A. P.; LOBATO, F. C. F.; MOTA, P. M. P. C.; GONÇALVES, V. S. P. **Atualização em tuberculose bovina**. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 1998. 65 p.
- MERKHAL, R. S.; KOPECKY, K. K.; LARSEN, A. B.; THURSTON, T. R. Improvements in the techniques for primary cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 25, p. 1290-1293, 1964.
- MERKHAL, R. S.; WHIPPLE, D. L. heat inactivation of *Mycobacterium bovis* in meat products. **Applied Environmental Microbiology**, v. 40, p. 282-284, 1980.
- McDONALD, W. L.; O'RILEY, K. J.; SCHROEN, C. J.; CONDRON, R. J. Heat Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 1785-1789, 2005.
- NORTH, C. E.; PARK, W. H. Standards for milk pasteurization. **American Journal of Hygiene**, v. 7, p. 147-173, 1927.

- NISHIMOTO, E. J. Efeito da gordura do leite de vaca sobre o valor D65°C do *Mycobacterium fortuitum*. 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- OLDENBUSCH, C.; FROBISHER, M. Jr.; SHRADER, J. H. thermal Death Points of Pathogenic Bacteria in Cream and Ice Cream mix. **Americam Journal of Public Health**, n. 20, p. 615-618, 1930
- PARK, W. H. Thermal Death Points of Pathogenic Bacteria in Milk. **American Journal of Public Health**, v. 17, n. 1, p. 36-47, 1927.
- PAVLAS, M. Thermorresistance of mycobacteria. **Acta Veterinaria Brno**, v. 59, p. 65-71, 1990.
- PEARCE, L. E.; TRUONG, H. T.; CRAWFORD, R. A.; YATES, G. F.; CAVAIGNAC, S.; LISLE, G. W. Effect of Turbulent-Flow Pasteurization on Survival of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Added to Raw Milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 3964-3969, 2001.
- REICHMAN, L.; TANNE, J. H. Time bomb: the global epidemic of mult-drug-resistent tuberculosis. New York: McGraw-hill, 2003. 320 p.
- RIBEIRO, L. **Inativação térmica (75°C) de** *Mycobacterium Bovis* (**isolados de origem bovina**) **em leite integral experimentalmente inoculado**. 2009. 61f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- ROCHA, V. C. M.; RODRIGUEZ, C. A. R.; GRISI FILHO, J. H. H.; FIGUEIREDO, S. M.; MATRONE, M.; RUIBAL, M. P. V.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Discrimination power of Mycobacterium bovis isolates from Brazil by spoligotyping, MIRU and ETR. In: *MYCOBACTERIUM BOVIS*. CONFERENCE, 5., 2009, WELLINGTON. **Proceedings of the Mycobacterium bovis V Conference.** Wellington : Animal Health Board, 2009.
- RODRIGUEZ, C. A. R.; OLIVEIRA, e M. D.; BONAFÉ, V. M.; REIS, C. R. B.; RIBEIRO, D. C.; FERREIRA NETO, J. S. Caracterização de isolados de Mycobacterium bovis do Estado de São Paulo, Brasil, utilizando a técnica spoligotyping. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2005, Santos, 2005. p. 582. CD Room
- RUDOLER, N. Is mycobacterium avium subsp.paratuberculosis an etiological factor in crohn's disease? Visit of Infectious Diseases, Soroka Medical Center, Beer-Sheva, Israel. In: AIELO, S. E. **The Merck veterinary manual**. Edição 8th ed, Whitehouse Station: Merck, 1998.
- SMITH, T. A comparative study of bovine tubercle bacili and human bacili from sputum. **Journal of Experimental Medicine**, v. 3, p.451-511, 1898.

- STABEL, J. R. Effective methods for postharvest intervention in dairy processing. Journal of Dairy Science. v. 86, p. 10-15, 2003.
- STARIKOF, K. R. Efeito da gordura do leite de cabra sobre o valor D65°C do *Mycobacterium fortuitum*. 2006. 83 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- SUNG, N.; COLLINS, M. T. Thermal tolerance of Mycobacterium paratuberculosis. **Apllied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 999-1005, 1998.
- SUNG, N.; COLLINS, M. T. Effect of three factors in cheese production (pH, salt, and heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1334-1339, 2000.
- TAYLOR, J. H.; BARNES, N.; CLARKE, C.; FINLAYSON, C. Mycobacterium paratuberculosis cervical lymphadenitis followed five years by terminl ileitis similar to Crohn's disease. **British Medical Journal**, v. 316, p. 449-453, 1998.
- **TUBERCULOSE** guia de vigilância epidemiológica/ Comitê Técnico Científico de Assessoramento à Tuberculose e Comitê Assessor para Co-infecção HIV-Tuberculose. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2002.
- VILLEMIN, J. A. **Etudes experimentales et cliniques sur tuberculose**. Paris: Bailliere et Fils, 1868.

WHITTAKER, H. A.; PEASE, H. D.; IRWIN R. E.; HOLMQUIST, C. A.; FRANK, L. C. Report of the Committee on Milk Supply. Discussion of Milk Papers. **American Journal of Public Health**, v. 17, p. 367-371, 1925.