

LÍVIA DE ANDRADE RODRIGUES

**Inativação do *Mycobacterium bovis* (espótipo BR024) em creme de leite
submetido à alguns parâmetros comerciais de pasteurização**

São Paulo
2010

LÍVIA DE ANDRADE RODRIGUES

**Inativação do *Mycobacterium bovis* (espótipo BR024) em creme de leite
submetido à alguns parâmetros comerciais de pasteurização**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada 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

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles

São Paulo

2010

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.2283
FMVZ

Rodrigues, Livia De Andrade

Inativação do *Mycobacterium bovis* (espoligotipo BR024) em creme de leite submetido à alguns parâmetros comerciais de pasteurização / Livia De Andrade Rodrigues. -- 2010.
57 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles.

1. Creme de leite. 2. *Mycobacterium bovis*. 3. Pasteurização. 4. Inativação.
I. Título.

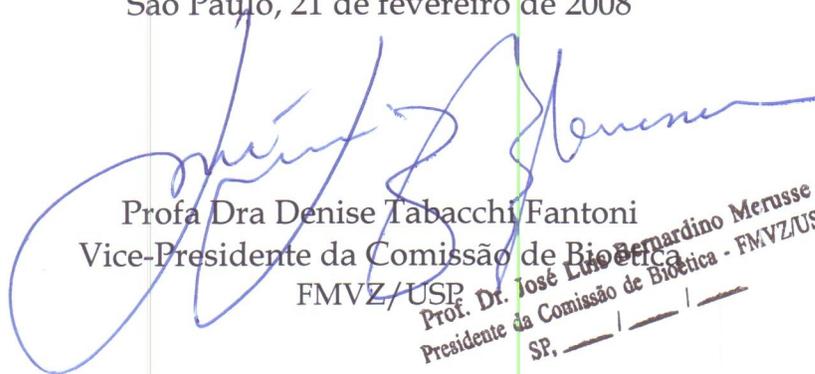


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Eficiência da pasteurização na destruição do *Mycobacterium bovis* experimentalmente inoculado em creme de leite”, protocolado sob o nº1274/2007, não utilizando animais, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado na reunião do dia 20 de fevereiro de 2008.

We certify that the Research “Pasteurization efficiency on destruction of *Mycobacterium bovis* experimentally inoculated into cream”, protocol number 1274/2007, under the responsibility Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 02/20/08.

São Paulo, 21 de fevereiro de 2008



Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Prof. Dr. José Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética - FMVZ/USP
SP, ____ / ____ / ____

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº 87 - 05508-270 - Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”. Fax: (11) 3032-2224 - fones: (11) 309107676/7671 - e-mail: fmvz@edu.usp.br

FICHA DE AVALIAÇÃO

Nome: RODRIGUES, Livia de Andrade

Título: Inativação do *Mycobacterium bovis* (espoligotipo BR024) em creme de leite submetido à alguns parâmetros comerciais de pasteurização.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada 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. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Dedico
Aos meus pais, Diógenes e Zélia, meus avós Zelão e Terezinha e ao Fernando.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, saúde e oportunidade de realização do meu trabalho.

A minha orientadora Evelise Oliveira Telles pelo incentivo e dedicação favorecidos e pela compreensão.

Aos meus familiares pelo apoio emocional nos momentos mais difíceis.

Ao meu namorado Fernando pela compreensão e amor.

Aos técnicos de laboratório Bispo, Sandra, Zenaide e Gisele pela ajuda fundamental na realização de todo o experimento, pelo aprendizado, dedicação, sugestões e ainda pela paciência.

Á Karina, Dani, Maurício, Tati e Leandro pela ajuda prática no desenvolvimento do meu trabalho.

A Elza pela prontidão em corrigir minha dissertação.

RESUMO

RODRIGUES, L. A. **Inativação do *Mycobacterium bovis* (espólio tipo BR024) em creme de leite submetido à alguns parâmetros comerciais de pasteurização.** [*Mycobacterium bovis* (spoligotype BR024) inactivation in whipping cream submitted to commercial pasteurization parameters]. 2010. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A resistência térmica dos microrganismos sofre influência, entre outros fatores, das características do agente e das características do substrato, como o teor de gordura. Um dos objetivos da pasteurização do creme é a eliminação dos patógenos eventualmente presentes no leite. Entretanto, não há padrão de tempo e temperatura de pasteurização para este produto na legislação. O *Mycobacterium bovis* é considerado o patógeno não formador de esporo de maior resistência térmica que pode normalmente ser transmitido pelo leite. Assim, este trabalho se propõe a avaliar a inativação de *Mycobacterium bovis* (espólio tipo BR024) em creme de leite fresco submetido a alguns parâmetros comerciais de pasteurização. Creme de leite foi contaminado e pasteurizado em Banho-Maria a 75°C, 80°C, 85°C e 90°C, por 5 e 15 segundos. O agente foi quantificado por semeadura em duplicata das diversas diluições em meio Stonebrink, após incubação a 36°C/45 dias. A redução na população variou de 3,9 log UFC/mL até a 6,8 log UFC/mL o que mostra que, nas condições do estudo, todos os binômios estudados mostraram-se capazes de reduzir a carga contaminante para níveis tão baixos ou menores que 0,1 log UFC/mL, considerando a máxima contaminação inicial natural do leite por *M. bovis* (4 log UFC/mL), segundo Ball (1943).

Palavras-chave: Creme de leite. *Mycobacterium bovis*. Pasteurização. Inativação.

ABSTRACT

RODRIGUES, L. A. ***Mycobacterium bovis* (spoligotype BR024) inactivation in whipping cream submitted to commercial pasteurization parameters.** [Inativação do *Mycobacterium bovis* (espoligotipo BR024) em creme de leite submetido à alguns parâmetros comerciais de pasteurização]. 2010. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The thermal resistance of microorganisms is influenced by the agent in question, the initial microbial load and the characteristics of the substrate that can exert a protective effect on the cell, for example, the fat content. The pasteurization of whipping cream aims to eliminate pathogen microorganisms that may occasionally be present in milk. However, there is no standard in the law of time and temperature for this product, making it necessary more detailed study to consider the specific feature of thermal resistance of microorganisms at different temperatures for pasteurization, especially considering the high fat product. *Mycobacterium* spp is considered the pathogen spore-non-forming of higher heat resistance that can be transmitted by milk, among species, *M.bovis* is the most pathogenic. Therefore, this study aims to evaluate the inactivation of *Mycobacterium bovis* (spoligotype BR024) in fresh whipping cream subjected to some parameters of commercial pasteurization. Whipping cream was contaminated and pasteurized in a water bath at 75°C, 80°C, 85°C and 90°C for 5 and 15 seconds. The agent was measured in duplicate in the middle *Stonebrink* after incubation at 36°C/45 days. The reduction in the population ranged from 3.9 log CFU / mL up to 6.8 log CFU/ mL which shows that under the conditions of the study, all binomials studied were able to reduce the contaminant load to such low levels or lower than 0.1 log CFU / ml, the maximum initial natural contamination of milk by *M. bovis* (4 log CFU / mL), according to Ball (1943).

Keywords: Whipping cream. *Mycobacterium bovis*. Pasteurization. Inactivation.

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 – Requisitos microbiológicos para creme de leite pasteurizado de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Creme de Leite (BRASIL, 1996)	26
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Obtenção do inóculo de <i>Mycobacterium bovis</i> empregado na contaminação do creme de leite	34
Figura 2 - Esquema de contaminação do creme de leite e distribuição nos tubos para análise	35
Figura 3 - Esquema dos tubos submetidos ao tratamento térmico em Banho-Maria	36
Figura 4 - Esquema da diluição e semeadura das amostras	37

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Perfil de da inativação média do *Mycobacterium bovis* espoligotipo BR024 em creme de leite submetido à 75°C, 80°C, 85°C e 90°C por até 15 segundos em Banho-Maria a 95°C - São Paulo, out-2009 a dez - 2009.....41
- Gráfico 2 – Perfil da média de inativação do *Mycobacterium bovis* espoligotipo BR024 em creme de leite durante processamento térmico de 75°C a 90°C (Banho-Maria a 95°C) - São Paulo out-2009 a dez - 200944

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Redução do *Mycobacterium bovis* espoligotipo BR024 (LOG UFC/mL) durante a pasteurização de creme de leite em Banho-Maria: quantificação no início e nos tempos 0 (quando atinge a temperatura-alvo), 5 e 15 segundos de exposição térmica (75, 80, 90 e 95°C) - São Paulo, out-2009 a dez - 2009. 40
- Tabela 2 - Redução de *Mycobacterium bovis* espoligotipo BR024 (LOG UFC/mL) em creme de leite submetido à tratamento térmico - São Paulo, out-2009 a dez - 2009 42

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Log	Logaritmo
%	Por cento
C°	Graus Celsius
µl	Microlitro
AIDS:	Acquired Immunodeficiency Syndrome
cm:	Centímetro
FMVZ:	Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia
g:	Gramma
HIV:	Human Immunodeficiency virus
<i>M. bovis:</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. tuberculosis:</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>M.abcessus:</i>	<i>Mycobacterium abcessus</i>
<i>M.avium:</i>	<i>Mycobacterium avium</i>
<i>M.chelonae:</i>	<i>Mycobacterium chelonae</i>
<i>M.fortuitum:</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
<i>M. gordonae:</i>	<i>Mycobacterium gordonae</i>
<i>M.intracell</i>	<i>Mycobacterium intracellulare</i>
<i>M. kansaii:</i>	<i>Mycobacterium kansaii</i>
<i>M. paratuberculosis:</i>	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>
<i>M. phlei:</i>	<i>Mycobacterium phlei</i>
<i>M. smegmatis:</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
mL:	Mililitro
P.C.R.:	Polymerase Chain Reaction
p.s.:	Pós semeadura

pH:	Potencial hidrogeniônico
PNCBET:	Programa Nacional de Combate e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
Ta:	Temperatura ambiente
TB:	Tuberculose
U.F.C.:	Unidades Formadoras de Colônias
USP:	Universidade de São Paulo
NaCl:	Cloreto de Sódio
N.:	Número
Min.:	Minuto
HOVET:	Hospital Veterinário
ml:	Mililitro
mm:	Milímetro
<:	Menor
>:	Maior

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVO	21
3 REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1 Creme de leite	25
3.2 Tuberculose	27
3.2.1 História da descoberta da Tuberculose	27
3.3 Micobactérias	28
3.4 Epidemiologia da Tuberculose causada pelo <i>M. bovis</i>	28
3.5 Formas de Infecção	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Obtenção do Inóculo	33
4.2 Contaminação do creme de leite	34
4.3 Tratamento térmico	35
4.4 Diluição e semeadura das amostras	36
4.5 Contagem de colônias e registro de resultados	38
4.6 Determinação do tempo de aquecimento dos processos térmicos	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	49
ANEXO	57

1 INTRODUÇÃO

O binômio tempo e temperatura de pasteurização do leite foi ajustado, já há muitos anos, de acordo com os parâmetros térmicos das bactérias patogênicas não-esporuladas mais termorresistentes e que podem estar presentes no leite: *Mycobacterium tuberculosis* e *Coxiella burnetti* (NORTH; PARK, 1927; HUEBNER et al., 1949).

Os parâmetros nacionais de pasteurização do leite foram definidos pelo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal – RIISPOA - na década de 50 (BRASIL, 1952). No entanto, não há parâmetros oficiais para a pasteurização do creme de leite e as indústrias definem seus próprios binômios¹: 65°C/30minutos, 75°C/15 segundos, 85°C/3a 5 segundos, 80°C/15 segundos.

A eficácia de um tratamento térmico, todavia, não depende somente do binômio tempo e temperatura, mas também de outros fatores que influenciam na termorresistência dos microrganismos, como o número inicial dos mesmos e o teor de gordura do substrato (MOLIN; SNYGG, 1967; DONNELLY, 1986; FRANCO, LANDGRAF; 1986; MACDONALD; SUTHERLAND, 1993; CHHABRA, 1999; BUSSATA, 2005).

Outro fator que talvez possa interferir na resistência térmica de patógenos é a variação individual, conforme sugerem resultados recentes de pasteurização experimental de leite contaminado com cinco espoligotipos de *Mycobacterium bovis*, isolados no Brasil. Os dados revelaram diferenças entre eles sendo que o espoligotipo BR024 apresentou-se mais resistente que os demais (FELIPE, 2009; RIBEIRO, 2009).

Além disso, não foram encontrados na literatura nacional ou estrangeira estudos que tenham avaliado a resistência térmica do *Mycobacterium* spp em creme de leite, sendo que, segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Creme de Leite (BRASIL, 1996), o teor de gordura desse produto pode variar de 10 a 50%.

Esses fatos justificam uma pesquisa para avaliar a segurança conferida por diferentes binômios de tempo e temperatura de pasteurização do creme de leite, na

inativação do *Mycobacterium bovis* espoligotipo BR024, em condições experimentais.

2 OBJETIVO

Avaliar a inativação do *Mycobacterium bovis* espólio tipo BR024 em creme de leite submetido a diferentes binômios de temperatura (75, 80, 85 e 90°C) e tempo (5 e 15 segundos), em Banho-Maria.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Pouco foi estudado nas décadas seguintes sobre a resistência térmica do *Mycobacterium* spp; exceção feita ao *M. paratuberculosis*, a partir da década de 90, devido à sua potencial relação com a doença de Crohn e ao fato de poder estar presente no leite cru. Assim, várias pesquisas foram realizadas até que se assegurasse que a pasteurização conferia inativação aceitável desse agente, com adequada margem de segurança (GRANT, 1996; SUNG; COLLINS, 1998; STABEL, 2001).

Segundo Franco (1996), a presença de gordura aumenta a resistência térmica de alguns microrganismos. Presume-se que seja devido ao fato de a gordura afetar o conteúdo de água da célula. Nesse contexto vale salientar que a composição média de gordura do creme de leite varia de 10 a 50% m/m.

A carga inicial de microrganismos também influencia sua termorresistência, pois quanto maior o número, maior a quantidade de calor necessária para destruí-los; o mecanismo que tenta explicar essa proteção está relacionado à produção de substâncias excretadas pelas células, que as protegeriam. Em adição, quanto mais numerosa a população, maior é a possibilidade de se ter células com resistência térmica mais elevada (FRANCO, 1996).

Os efeitos da gordura do leite, pH e temperatura na resistência térmica bacteriana foram estudadas por Chhabra et al. (1999), concluindo que o efeito protetor da gordura do leite foi importante na região de morte máxima da curva de sobreviventes de *Listeria monocytogenes*.

As taxas de morbidade e mortalidade da tuberculose aumentaram nos últimos tempos segundo a emergência de cepas de diversas espécies de *Mycobacterium* resistentes a múltiplas drogas, acompanhando, em particular, o surto da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida – AIDS – epidêmica (KONEMAN et al., 2001).

Segundo Pivetta (2004), o Brasil é o único país das Américas a figurar na lista das 22 nações que concentram 80% das ocorrências de tuberculose no mundo. Kleeberg (1984), diz que o homem é tão sensível ao bacilo bovino (*Mycobacterium bovis*) quanto ao bacilo humano. Assim, evidenciou-se a importância de projetos integrados em saúde animal, industrialização dos produtos e saúde pública para redução da incidência da doença.

Nesse sentido, em janeiro de 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento lançou o “Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose” (BRASIL, 2001).

Um dos objetivos desse programa é identificar as prevalências das duas doenças em todos os estados do país, mas ainda não há dados consolidados sobre a situação da tuberculose no rebanho nacional.

Um animal infectado é capaz de eliminar o agente pelo leite mesmo antes do desenvolvimento de lesões teciduais (ROXO, 1997). Entretanto, de acordo com Lerche (1969), mesmo contaminado o leite não apresenta alterações visíveis, o que dificulta a detecção e segregação do produto.

Há poucos trabalhos disponíveis na literatura sobre o isolamento de micobactérias de leite. Entre eles, Leite et al. (2003) analisaram o *Mycobacterium* em 78 amostras de leite cru e 40 de pasteurizado. Estas amostras foram coletadas de 5 Estados brasileiros (São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Pará e Goiás). Como resultado foi obtido: 14 amostras positivas em leite cru (16,7%), sendo 1 *M. bovis*, 4 *M. fortuitum*, 1 *M. marinum*, 5 *M. gordonae*, e 3 não identificadas de crescimento rápido; 9 positivas em leite pasteurizado (22,5%), sendo 2 *M. fortuitum*, 2 *M. marinum*, 1 *M. kansasii*, 1 *M. gordonae*, e 3 não identificadas de crescimento rápido. Dentre essas, apenas a *M. bovis* é patogênica, embora, segundo Konemam et al. (2001), *M. fortuitum*, *M. marinum* e *M. kansasii* sejam potencialmente patogênicas para o homem. Afirmam ainda que aproximadamente 50% de todo leite consumido no Brasil não é beneficiado e, desta forma, os consumidores podem estar sob risco de infecção pelo bacilo.

Quanto à resistência térmica das micobactérias, um dos mais recentes estudos, feito por Nishimoto (2006), avaliou o efeito da gordura do leite sobre o valor $D_{65^{\circ}\text{C}}$ do *Mycobacterium fortuitum* experimentalmente inoculado. O valor D obtido foi de 18,02 minutos em leite integral e 7,82 minutos em leite desnatado; dado bastante superior ao da literatura para outras espécies consideradas mais resistentes que o *M. fortuitum*.

Sung e Collins (1998) após calcularem o valor D (a 62, 65, 68 e 71°C) de cepas de origem humana e bovina de *Mycobacterium paratuberculosis* em solução de lactato e em leite, concluíram que o agente é mais termotolerante do que o *M. bovis* e que poderia sobreviver à pasteurização rápida (HTST) quando a concentração inicial de microrganismos é maior que 10^1 células por mililitro de leite.

Pereda (2005) relata valores $D_{72}=1$ segundo e $Z=4,8^{\circ}\text{C}$ para o *Mycobacterium tuberculosis* e que, nas condições da pasteurização, há redução de aproximadamente 15D do agente.

Todos esses dados foram obtidos por experimentação em leite; não foram encontrados dados sobre a sensibilidade térmica do *Mycobacterium* spp em creme de leite.

Ressalta-se que ainda não há na legislação brasileira um padrão para tempo e temperatura de pasteurização desse produto demonstrando a necessidade de se investigar a sensibilidade térmica do *Mycobacterium* spp no creme de leite.

3.1 Creme de Leite

As palavras nata e creme significam o mesmo produto e podem ser usadas sem distinção conforme a legislação vigente e os costumes de cada país (PEREDA et al., 2005).

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Creme de Leite (BRASIL, 1996), creme de leite é o produto lácteo rico em gordura retirada do leite por procedimentos tecnologicamente adequados, que apresenta a forma de uma emulsão de gordura em água. O produto submetido à comercialização deve ser pasteurizado, esterilizado ou tratado por Ultra Alta Temperatura.

Esse processo térmico é obrigatório uma vez que se trata de um subproduto do leite o qual possui características nutritivas, se tornando extremamente susceptível à contaminação por microrganismos podendo causar sérios danos à saúde do consumidor, como a tuberculose (ALVES, 2003).

O processo de pasteurização do creme de leite é feito dentro de indústria com estrutura semelhante à pasteurização do leite. O binômio tempo e temperatura utilizados são um pouco superiores aos usados no leite, uma vez que a gordura do creme exerce um efeito protetor aos microrganismos presentes e podendo causar um aumento da termorresistência dos mesmos. Encontram-se relatados na literatura, binômios de 72°C por 15 segundos para cremes denominados como “leves” ou “de baixo teor de gordura” e de 85 a 100°C por 10 a 15 segundos para “cremes” e “cremes de alto teor de gordura” (PEREDA et al., 2005).

Segundo informações obtidas em algumas das indústrias nacionais que pasteurizam creme de leite, os binômios de tempo e temperatura praticados variam bastante. Alguns binômios praticados são: 65°C/30 minutos, 75°C/15 segundos, 80°C/15 segundos e 85°C/3 a 5 segundos (comunicação pessoal)¹.

Independente do binômio empregado pelas indústrias, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Creme de Leite (BRASIL, 1996) estabelece alguns critérios microbiológicos de aceitação do produto pronto para o consumo, que estão sumarizados no quadro 1.

REQUISITOS	CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO I.C.M.S.F.	CATEGORIA	MÉTODO DE ANÁLISE
Aeróbios mesófilo s/g	n=5 c=2 m= 10.000 M= 100.000	5	FIL 100B: 1991
Coliformes totais /g	n= 5 c= 2 m=10 M=100	5	FIL 73A: 1985
Coliformes a 45° C/g	n=5 c= 2 m< 3 M=10	5	APHA (*) 1992 Cap. 24
Estafilococos coagulase positivo /g	n= 5 c= 1 m= 10 M=100	8	FIL 145: 1990

Quadro 1 – Requisitos microbiológicos para creme de leite pasteurizado de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Creme de Leite (BRASIL, 1996)

Sabe-se que a gordura possui um efeito termo-protetor sobre os microrganismos, mas não se conhece a extensão desse efeito sobre a termo resistência do *Mycobacterium* spp no creme de leite, que pode ter mais que 40% de gordura, segundo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Creme de Leite (BRASIL, 1996).

¹ Email enviado a sac@bertin.com.br; piva@balkis.com.br; lfazenda@leitfazenda.com.br.

3.2 Tuberculose

3.2.1 História da descoberta da Tuberculose

Existem diversos relatos antigos que descrevem o risco de contaminação para o homem ao consumo de carne de animais caquéticos podendo inclusive incluir nesse risco a transmissão do agente causador da tuberculose bovina.

Há manuscritos hindus que relatam lesões sugestivas de tuberculose. Mesmo os judeus já possuíam a conduta de sacrificar animais doentes (CORRÊA; CORRÊA, 1992; DUNLOP; WILIANS, 1996; MORETTI et al., 2004).

A história natural da doença começou a ser mais bem esclarecida em 1810 com a observação de uma ligação entre a inflamação de gânglio linfático ao consumo de leite de vaca em crianças, concluindo de forma errônea que a doença era provocada por fatores nutricionais (GRANGE; YATES, 1994; FERREIRA NETO; BERNARDI, 1997).

Em 1846, Klencke observou uma freqüência maior de linfadenite tuberculosa entre crianças alimentadas com leite de vaca comparado àquelas amamentadas com leite materno, concluiu ser o leite o veículo transmissor dessa doença. Porém, em 24 de março de 1882, Koch anunciou publicamente que havia observado e cultivado o bacilo representando assim um grande marco na história da tuberculose. Koch denominou-o “*Tuberkelbacillen*” – bacilo da tuberculose. Em 1883, Zoff, propôs a denominação “*Bacterium tuberculosis*”.

Em 1898, Theobald Smith, isolou o *Mycobacterium bovis* provando que não havia somente um único tipo de bacilo que causava a tuberculose em humanos e animais. Em 1902, Ravenal obteve a primeira evidência da tuberculose bovina como uma zoonose decorrente da ingestão de alimentos. Isolou em uma cultura pura os bacilos presentes em gânglios mesentéricos de uma criança falecida de meningite tuberculosa, na Filadélfia. Esses bacilos foram inoculados em três bovinos, que em menos de 30 dias vieram a óbito. Os resultados da necropsia destes animais comprovaram que a causa morte foi tuberculose bovina.

Até 1970 o bacilo tuberculoso bovino foi considerado uma variante do *Mycobacterium tuberculosis* e denominado *M. tuberculosis* variante *bovis* ou *M. tuberculosis* subespécie *bovis*. Karlson e Lessel (1970) propuseram sua classificação como espécie individual denominada *Mycobacterium bovis*.

3.3 Micobactérias

M. bovis é um microrganismo pertence à ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae* e ao gênero *Mycobacterium*. Esses microrganismos podem ser encurvados ou pequenos bastonetes gram-positivos, podendo se apresentar de forma filamentosa, curtos (medindo de 0,5 µm a 0,7 µm de comprimento por 0,3 µm de largura), imóveis, não ramificados, aeróbicos, álcool-ácido resistentes, e não apresentam hifas aéreas. Apresentam aspecto granular quando corados. São bactéria finas, não apresentam cápsula nem esporo. Diferem das demais em uma série de propriedades, muitas das quais estão relacionadas com a quantidade e tipos de lipídios complexos que estes microrganismos contêm na parede celular (KANTOR, 1979; CORRÊA; CORRÊA, 1992).

Segundo McFadden (1992), um fator que pode influenciar na resistência térmica das micobactérias é a tendência em formar grumos em meios líquidos, devido à natureza hidrofóbica da sua parede celular. Além disso, há diferenças nos padrões de formação desses grumos, o que pode influenciar na cinética de inativação térmica quando se compara o padrão de agrupamento do *M. bovis* com outras espécies, exceto quando se compara com o *M. fortuitum* (GRANT et al., 1996).

3.4 Epidemiologia da tuberculose causada pelo *M. bovis*

A tuberculose é uma das doenças infecciosas mais difundidas sendo uma das principais causas de morte em adultos no mundo devido a um agente infeccioso isolado. O *Mycobacterium tuberculosis* é o principal causador da tuberculose humana, porém não existem dados definidos quanto ao número de doentes que

foram infectados por *M. bovis* (ACHA,1987). Segundo Radostis (2002), a zoonose causada pelo *M. bovis*, assume na atualidade um caráter de doença profissional, observada em pessoas que lidam diretamente com animais infectados ou seus produtos, como tratadores, magarefes, médicos veterinários e laboratoristas.

Em países industrializados, o controle da tuberculose animal associado com a pasteurização de produtos lácteos e os programas de erradicação da doença tiveram como consequência à drástica redução da doença em animais e em humanos. No entanto, nos países em desenvolvimento, a tuberculose animal é amplamente distribuída e os programas de controle são ineficazes além do raro emprego da pasteurização. Além disso, os relatos da doença são mais freqüentes em países industrializados comparado aos em desenvolvimento (COLLINS; GRANGE, 1983; COSIVI et al., 1995).

Aproximadamente 9,27 milhões de casos novos (139 casos por 100.000 habitantes) ocorreram em 2007 no mundo. Desses, 14,8% (1,37 milhão) são co-infectados pelo HIV (OMS, 2007).

É uma doença que apresenta incidência reduzida em alguns países, como Estados Unidos, Canadá, Reino Unido e outros países da Europa. Além de constituir um grave problema de saúde pública, os prejuízos causados por esta enfermidade representam significativas barreiras econômicas (BRASIL, 2006).

Na UE, em 2005, 17 membros e um não membro reportaram 119 casos humanos por *Mycobacterium bovis*. Número mais elevado do que os reportados em 2004 (95 casos). Em Portugal foram notificados 2770 casos humanos em 2007 desconhecendo-se, contudo, qual a porcentagem de casos devidos a *Mycobacterium bovis* (SÁ; FERREIRA, 2007).

Do grupo de 22 países, responsável por 80% da carga de TB no mundo, Índia, China, Indonésia, Nigéria e África do Sul ocupam as 5 primeiras posições. O Brasil representa o 18º país em número de casos novos de TB e o 108º quando se avalia a incidência ao invés da carga da doença (OMS, 2007).

Os números são extremamente preocupantes. Estima-se que cerca de 50 milhões de pessoas estejam infectadas pelo microrganismo e que 6.000 pessoas morrem anualmente (WHO, 2007).

No Brasil, a distribuição de casos novos, demonstra que os estados do Rio de Janeiro, Amazonas, Pernambuco, Pará, Rio Grande do Sul, Bahia, Ceará, Acre, Alagoas e Maranhão possuem taxas de incidência superiores a 38,2 casos por

100.000 habitantes. Os estados do Rio de Janeiro e Amazonas têm as maiores incidências com 71,7 e 66,9, respectivamente. Porém, Goiás (8,6), Distrito Federal (12,0) e Tocantins (15,5) são estados, com menores números de incidência no país. A região Sudeste, principalmente os estados do Rio de Janeiro e São Paulo, possui a maior carga da doença no país, enquanto que a região Norte possui a maior incidência quando comparado às demais regiões do país (WHO, 2009).

O problema se agrava no estado do Rio de Janeiro onde prevalece a maior taxa de mortalidade (HIJJAR, 2001).

O quadro de incidência se agrava ainda mais quando se trata de um grupo de risco. A tuberculose é a principal doença oportunista em pacientes infectados com o HIV (RAVIGLIONE et al., 1995). Ainda, a grande maioria desses HIV positivos reside em países em desenvolvimento. Porém, a dupla infecção do *M. bovis* e do HIV tem sido relatadas em países desenvolvidos (HOUDE; DERY, 1988; VIGILÂNCIA, 1995).

Parte dos casos novos de tuberculose apresenta positividade para o teste HIV. No Estado de São Paulo, houve aumento da realização do teste HIV entre os anos de 1998 e 2005, para os pacientes notificados. A positividade observada foi de 16% em 1998 e de 13% em 2005 (SÃO PAULO, 2006).

3.5 Formas de Infecção

Segundo Souza et al. (1999), a ingestão de leite cru contaminado constitui-se em uma das principais formas de infecção humana pelo bacilo bovino. O animal infectado, como dito anteriormente, é capaz de eliminar o agente no leite mesmo antes de apresentar qualquer tipo de lesão em seus tecidos. A contaminação natural máxima do leite por *M. bovis* pode chegar a 10^4 UFC/ml, mas como não apresenta alterações visíveis, fica difícil detectar o problema (BALL, 1943; LERCHE, 1969; ROXO, 1997).

No entanto, o risco é bem menor quando se trata de contaminação através da ingestão de carne bovina. Isso porque há uma baixa incidência do microrganismo nos tecidos musculares, mas também se deve pelo hábito de não ingerir carne crua no Brasil. Porém, apesar do risco ser baixo, é existente, quando se leva em consideração que ainda há abates clandestinos, abate de animais que deveriam ser

descartados de rebanhos positivos em matadouros com inspeção sanitária ineficaz ou inexistente (SOUZA et al., 1999).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se creme de leite pasteurizado comercial, que foi contaminado e submetido à diferentes tratamentos térmicos (75, 80, 85 e 90°C por até 15 segundos) em Banho-Maria, mimetizando o processo de pasteurização do creme de leite realizado nas indústrias.

Foram realizadas 5 repetições de cada processo de pasteurização. Nas duas primeiras, empregou-se diretamente o creme comercial, mas depois, foi necessária uma alteração nesse protocolo, porque houve perda dos dados devido ao crescimento de contaminantes identificados como *Klebsiella ozaenae* e *Enterobacter gergoviae* que destruíram o meio de cultura. Assim, nas três últimas repetições, o creme de leite foi tratado a 90°C por 15 minutos em Banho-Maria previamente à contaminação pelo *Mycobacterium bovis*.

Empregou-se o espoligotipo BR024 de uma coleção de *Mycobacterium bovis* isolados de bovinos abatidos no Estado de São Paulo e que foram discriminados pela técnica de *Spoligotyping* (conforme técnica descrita por HERMANS et al., 1991; ROSALES et al., 2003).

Foi também realizada análise do teor de gordura do creme pelo método de *Gerber* (BRASIL, 2006).

4.1 Obtenção do inóculo

Foram utilizadas culturas com até 30 dias de multiplicação (36°C) em meio *Stonebrink* (preparado conforme CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1985. Anexo A) em garrafas de cultivo celular TPP (garrafas moldadas em poliestireno de alta transparência e especialmente desenvolvidas para técnicas de cultura de tecidos).

Cinco garrafas contendo cultura de BR024 foram numeradas e pesadas em balança de precisão. Com uma haste de plástico estéril retirou-se 0,300g de massa, que foram transferidos para cadinho estéril. Adicionou-se então 0,5mL solução salina 0,85% com 0,05% de Tween 80 e homogeneizou-se vigorosamente. O Tween

80 é um detergente indicado para evitar a formação de grumos (MERCK 13.7664). Em seguida, foram adicionados 11,5mL de solução salina 0,85% até completar 12 mL de inóculo, que foi transferido para um frasco Schott de 250 mL esterilizado, contendo pérolas de vidro para ajudar a evitar a formação de grumos (Figura 1).

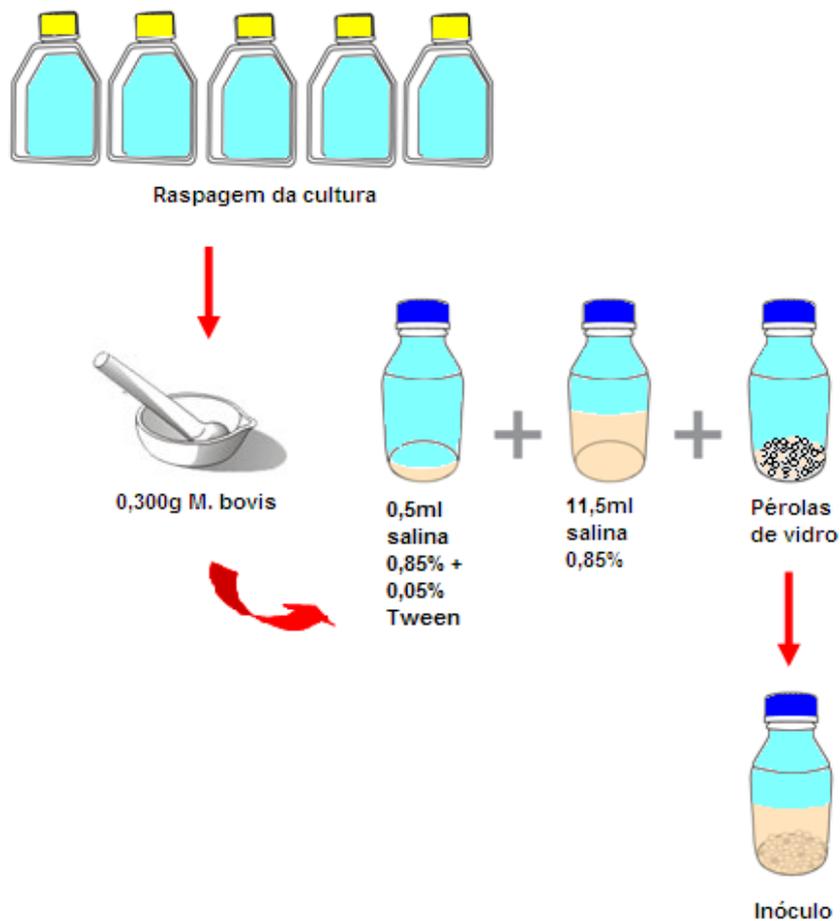


Figura 1 - Obtenção do inóculo de *Mycobacterium bovis* empregado na contaminação do creme de leite

4.2 Contaminação do creme de leite

Utilizou-se 6 mL do inóculo para contaminar 100 mL de creme de leite pasteurizado, em frasco Schott de 250 mL. O creme de leite contaminado foi distribuído em 13 tubos (16x160mm), previamente identificados, sendo 5 mL em cada tubo. Os tubos foram identificados como: 75°C/0", 75°C/5", 75°C/15", 80°C/0",

80°C/5", 80°C/15", 85°C/0", 85°C/5", 85°C/15", 90°C/0", 90°C/5", 90°C/15" (que correspondem á temperatura e tempo do tratamento térmico), contaminação inicial e controle positivo (para quantificação do agente antes do processo térmico).

Todo procedimento de manipulação do inóculo e do creme de leite foi realizado em fluxo laminar VECO® com desinfecção prévia através de hipoclorito de sódio, seguido de luz ultravioleta por aproximadamente 30 minutos (Figura 2).

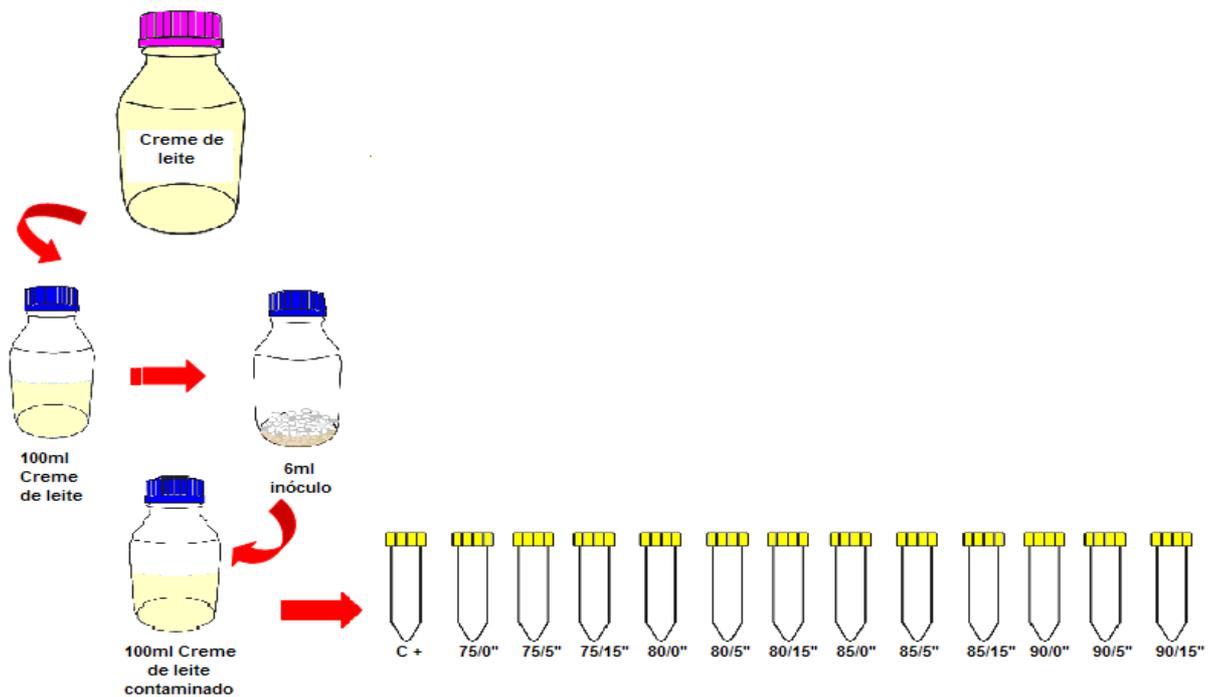


Figura 2 - Esquema de contaminação do creme de leite e distribuição nos tubos para análise

4.3 Tratamento térmico

Os 12 tubos contendo as sub-amostras contaminadas foram colocados em Banho-Maria à 95°C (Figura 3), acompanhados por outro tubo, contendo 5 mL de creme de leite não contaminado, ao qual estava acoplado um termômetro de mercúrio. Assim que a temperatura do creme atingiu 75°C, o primeiro tubo foi retirado, constituindo-se no tempo 0 do tratamento a 75 (tubo 75°C/0"). Após 5 e 15

segundos, foram retirados os tubos 75°C/5", 75°C/15". Os outros tubos permaneceram no banho até que o creme atingisse os 80°C. Nesse momento, o tubo 80°C/0" foi retirado, e os outros dois tubos desse processo foram retirados após 5 e 15 segundos. O mesmo se repetiu quando foram atingidas as temperaturas de 85 e 90°C.

Ao serem retirados do Banho-Maria, os tubos foram colocados em banho de gelo para cessar o efeito térmico sobre as células bacterianas.

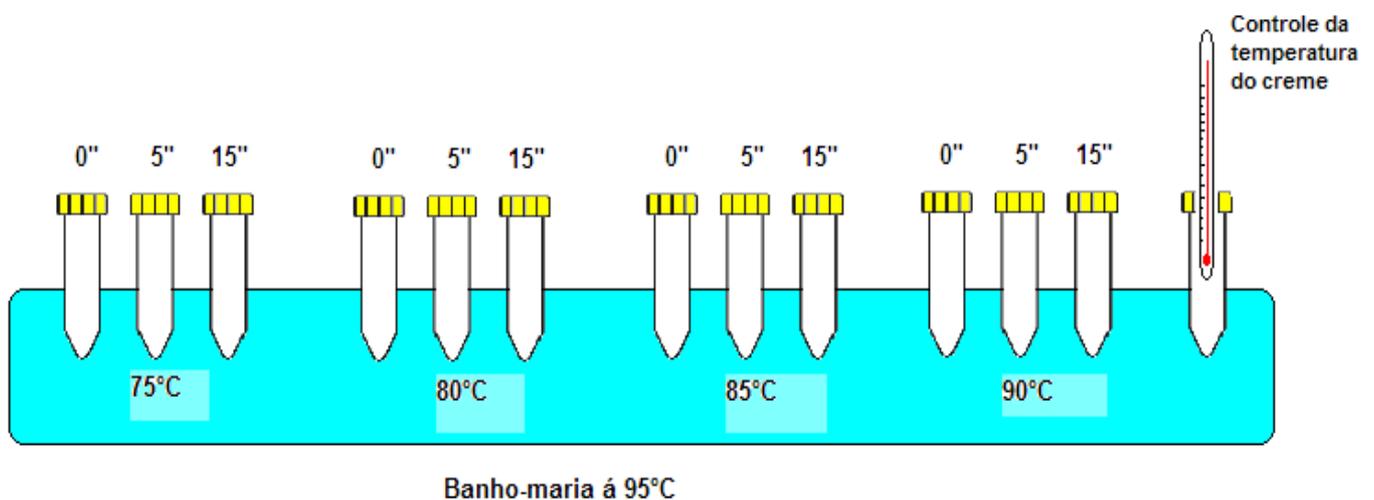


Figura 3 – Esquema dos tubos submetidos ao tratamento térmico em Banho-Maria

4.4 Diluição e semeadura da amostras

As amostras foram submetidas à diluição decimal seriada em água peptonada 0,1%, acrescida de 0,05% de Tween 80, até diluição 10^{-7} , com exceção do controle positivo que foi semeado até 10^{-8} .

Após homogeneização em vórtex por 10 segundos, 0,1mL de cada diluição foi semeado, em duplicata, na superfície do meio *Stonebrink* distribuído em garrafas TPP (Figura 4).

Além disso, uma amostra do creme de leite não contaminado foi semeada diretamente na superfície do meio *Stonebrink* (0,1mL), sem diluição, em duplicata, como controle negativo.

O meio foi preparado segundo a técnica do Centro Panamericano de Zoonoses (CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS, 1985). As garrafas semeadas foram fechadas com o primeiro clique da rosca (a fim de obter um meio com microaerofilia) e incubadas a 36°C/24 horas, e então fechadas completamente, para evitar que o meio ressecasse e reincubadas 36°C para completar 45 dias.

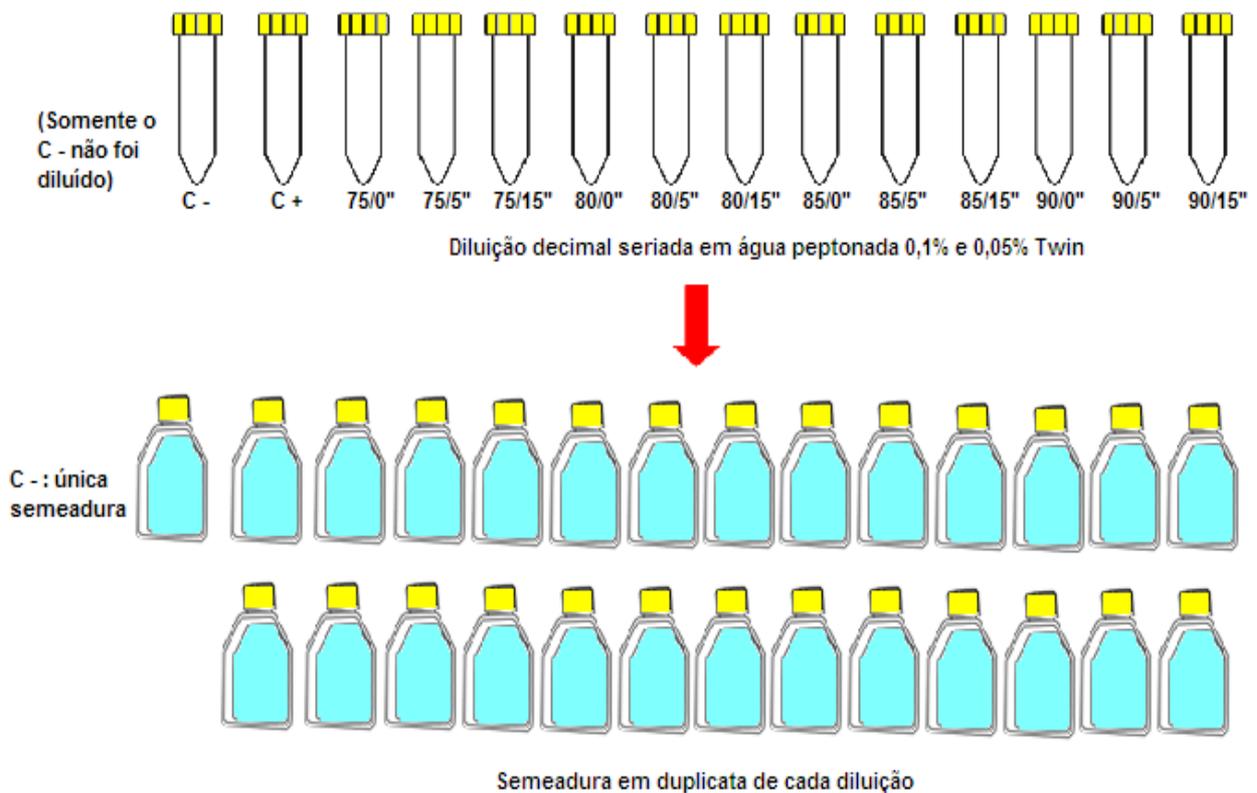


Figura 4 – Esquema da diluição e semeadura das amostras

4.5 Contagem de colônias e registros de resultados

A diluição de eleição foi aquela que apresentou entre 10 e 150 colônias após os 45 dias de incubação.

Foi feita a média aritmética das UFC contidas nas duas garrafas da diluição eleita e o resultado foi multiplicado por 10 (correção da alíquota semeada = 0,1mL) e pelo inverso da diluição. Os resultados foram expressos em log₁₀ das UFC/mL de leite. Como existiam valores 0 (representando a ausência de crescimento) somou-se 1 a todos os resultados antes de serem transformados em log₁₀.

4.6 Determinação do tempo de aquecimento dos processos térmicos

Com o objetivo de auxiliar a compreensão do efeito letal da etapa de aquecimento do creme, foram realizados testes para calcular o tempo de aquecimento dos processos de pasteurização, bem como o tempo de exposição à temperatura potencialmente letal ao *Mycobacterium* durante a fase de aquecimento. Como não foi encontrada na literatura uma referência térmica sobre a temperatura em que se começa a morte do *Mycobacterium bovis* usou-se o limite térmico inferior da pasteurização lenta (62°C) como marco inicial da fase do aquecimento que pode contribuir com a letalidade do processo.

Um tubo contendo 5 mL de creme de leite comercial, com teor de gordura similar ao empregado nos testes de pasteurização, foi acoplado a um termômetro e colocado no Banho-Maria a 95°C. Cronometrou-se o tempo que o creme de leite demorou a atingir as temperaturas de estudo (75°C, 80°C, 85°C e 90°C), em 7 repetições, e o tempo que demorou para subir de 62°C para 75°C, em 6 repetições.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de gordura das amostras de creme de leite empregadas nos testes variou entre 34 e 37%. Assim, o produto é classificado como “creme”, que são os produtos com 20 a 49,9% de gordura, segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Creme de Leite (BRASIL, 1996).

Os resultados de sobrevivência do *Mycobacterium bovis* espoligotipo BR024, segundo o binômio de tempo e temperatura estudado, estão apresentados na tabela 1. Observando-se as médias dos sobreviventes, nota-se ainda que há um decréscimo da população tanto em função do tempo de tratamento, a uma dada temperatura, quanto em função da temperatura, num dado tempo de tratamento térmico.

No entanto, há uma tendência das contagens médias serem mais baixas aos 5 segundos que aos 15 segundos de tratamento térmico, sugerindo que 15 segundos de tratamento numa dada temperatura tende a ser menos eficaz do que 5 segundos. O fenômeno pode estar associado à redução do tamanho dos glóbulos de gordura. O maior tempo exposição ao calor determinaria uma “quebra” da gordura em glóbulos menores e com isso a separação de Unidades Formadoras de Colônias, gerando um aumento aparente ou artificial nas contagens.

À temperatura de 90°C houve desvitalização completa do inóculo em algumas repetições, tendo sido a temperatura mais eficaz contra o agente testado, conforme esperado, já que os tempos pesquisados foram os mesmos para as 4 temperaturas. O gráfico 1 ilustra o perfil da média de inativação do agente em nas temperaturas 75, 80, 85 e 90°C.

Tabela 1 – Redução do *Mycobacterium bovis* espoligotipo BR024 (LOG UFC/mL) durante a pasteurização de creme de leite em Banho-Maria: quantificação no início e nos tempos 0 (quando atinge a temperatura-alvo), 5 e 15 segundos de exposição térmica (75, 80, 90 e 95°C) - São Paulo, out-2009 a dez - 2009

repetição	temperatura de processo	contaminação inicial (log UFC/mL)	sobreviventes (log UFC/mL)		
			t0	t5	t15
1	75	7,8	5,1	2,4	5,3
2	75	7,8	4,4	3,0	4,3
3	75	7,9	5,0	5,3	5,4
4	75	7,9	2,8	2,2	0,0
5	75	8,3	5,7	5,0	5,1
média	75	8,0	4,6	3,6	4,0
1	80	7,8	4,2	2,7	4,4
2	80	7,8	4,1	1,0	4,3
3	80	7,9	4,7	4,8	5,1
4	80	7,9	3,5	0,0	2,0
5	80	8,3	5,3	4,9	2,7
média	80	8,0	4,3	2,7	3,7
1	85	7,8	4,2	2,8	3,5
2	85	7,8	1,8	1,7	2,9
3	85	7,9	2,0	4,7	4,1
4	85	7,9	3,4	2,8	0,0
5	85	8,3	4,6	3,6	5,0
média	85	8,0	3,2	3,1	3,1
1	90	7,8	0,8	0,0	1,7
2	90	7,8	3,5	0,0	0,0
3	90	7,9	0,0	2,0	0,0
4	90	7,9	0,0	1,7	0,0
5	90	8,3	4,2	1,9	4,9
média	90	8,0	1,7	1,1	1,3

* o valor 0,0 indica que a contaminação apresentou-se abaixo do limite de detecção da técnica, ou seja, <10 UFC/mL.

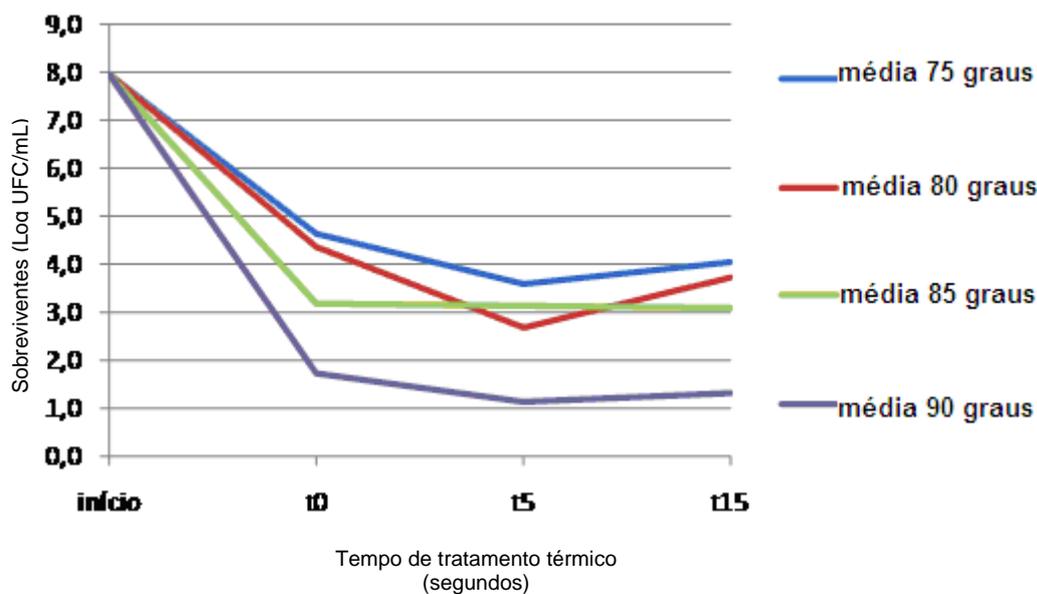


Gráfico 1 – Perfil de da inativação média do *Mycobacterium bovis* espoligotipo BR024 em creme de leite submetido à 75°C, 80°C, 85°C e 90°C por até 15 segundos em Banho-Maria a 95°C - São Paulo, out-2009 a dez - 2009

A tabela 2 apresenta a eficácia de cada combinação tempo/temperatura em reduzir as contagens de *Mycobacterium bovis* espoligotipo BR024. A fase de aquecimento foi mais importante para eficácia do processo. A razão poderia estar relacionada ao fato dessa etapa ser, provavelmente, mais longa que o tratamento térmico propriamente dito. Em média, foi necessário 1'41" (1 minuto e 41 segundos) para que o creme atingisse 75°C e mais 32" para que chegasse aos 80°C (portanto, 2'13" no total), outros 33" para que atingisse os 85°C (2'46" no total) e mais 64" para que atingisse os 90°C (3'51" no total).

Vale ressaltar que em parte do tempo de aquecimento a temperatura é baixa, sem potencial letal sobre o agente. Em média, a fase de aquecimento (do tratamento a 75°C) com potencial letal (estabelecido nesse trabalho como > 62°C) foi de 39".

Tabela 2 – Redução de *Mycobacterium bovis* espoligotipo BR024 (LOG UFC/mL) em creme de leite submetido à tratamento térmico - São Paulo, out-2009 a dez - 2009

repetição	temperatura de processo	redução durante o aquecimento (log UFC/mL)	somatória da redução durante aquecimento e tempo de exposição à temperatura-alvo	
			5 segundos (log UFC/mL)	15 segundos (log UFC/mL)
1	75	2,7	5,4	2,6
2	75	3,5	4,9	3,5
3	75	2,9	2,6	2,5
4	75	5,1	5,8	7,9
5	75	2,6	3,3	3,1
média	75	3,3	4,4	3,9
1	80	3,7	5,2	3,4
2	80	3,7	6,8	3,6
3	80	3,2	3,2	2,8
4	80	4,5	7,9	5,9
5	80	3,0	3,4	5,6
média	80	3,6	5,3	4,2
1	85	3,7	5,0	4,4
2	85	6,1	6,1	5,0
3	85	5,9	3,3	3,8
4	85	4,6	5,1	7,9
5	85	3,7	4,7	3,2
média	85	4,8	4,8	4,9
1	90	7,1	7,8	6,1
2	90	4,4	7,8	7,8
3	90	7,9	5,9	7,9
4	90	7,9	6,2	7,9
5	90	4,1	6,3	3,4
média	90	6,3	6,8	6,6

Pelos dados expostos, observa-se que o pior resultado foi obtido com o tratamento à 75°C/15 segundos (redução de 3,9 log UFC/mL) e o melhor foi à 90°C/5 segundos (redução de 6,8 log UFC/mL).

Existem poucos trabalhos sobre a sobrevivência térmica do *Mycobacterium bovis*, sendo que a maioria das publicações foi realizada até a década de 60. Não foi encontrado nenhum estudo sobre morte térmica desse agente em creme de leite para que se pudesse aprofundar uma discussão dos dados aqui encontrados.

Ribeiro (2009), que avaliou a sobrevivência desse mesmo espólio (BR024) à 72°C/20segundos em leite UHT integral e os resultados obtidos são similares aos desta pesquisa, considerando o binômio 75°C/15segundos. Ribeiro também observou que a fase de aquecimento foi mais importante na eficácia do processo, na qual a redução foi de 2,8 log UFC/mL (na presente pesquisa foi de 3,3

log UFC/mL), enquanto o processo completo, que inclui o aquecimento, reduziu 3,4 log UFC/mL (3,9 log UFC/mL na presente pesquisa).

Ressalta-se que embora o creme contenha teor de gordura muito superior ao do leite integral, o tempo de aquecimento à temperatura-alvo foi similar em ambos os trabalhos: Ribeiro (2003) registrou o aquecimento em cerca de 1min. e 45 seg., em Banho-Maria a 85°C enquanto na presente pesquisa esse tempo foi, em média, 1 minuto e 41 segundos, em banho a 95°C.

A similaridade dos resultados de sobrevivência em leite integral e no creme de leite, associado à similaridade dos tempos de aquecimento nesses dois produtos, parece sugerir que o teor de gordura não influenciou o efeito letal do binômio de tempo e temperatura estudado.

Com base nesse raciocínio, e extrapolando os dados obtidos por Felipe (2009) em leite UHT integral submetido à 65°C/30 minutos, seria concernente supor que a pasteurização lenta do creme de leite pode não oferecer a segurança necessária ao produto, já que a redução obtida no leite foi de 0,4 log UFC/mL do esporigotipo BR024 (já somada à redução durante o aquecimento). Ressalta-se, como dito na introdução, que um dos estabelecimentos consultados relatou que emprega binômio de 65°C/30 minutos para pasteurizar o creme.

O gráfico 2 ilustra o perfil de inativação médio durante o processamento térmico contínuo de 75°C a 90°C. Observa-se que com o aumento da temperatura há uma tendência da inativação pelo calor suplantar a suposta “dispersão” das UFC, que aumentariam as contagens. Observa-se que houve uma tendência de redução contínua da média das contagens com o aumento da temperatura, em tempos fixos, por exemplo, as contagens nos tempos 0 segundo diminuem com o aumento da temperatura. O mesmo acontece com as contagens nos tempos 15 segundos.

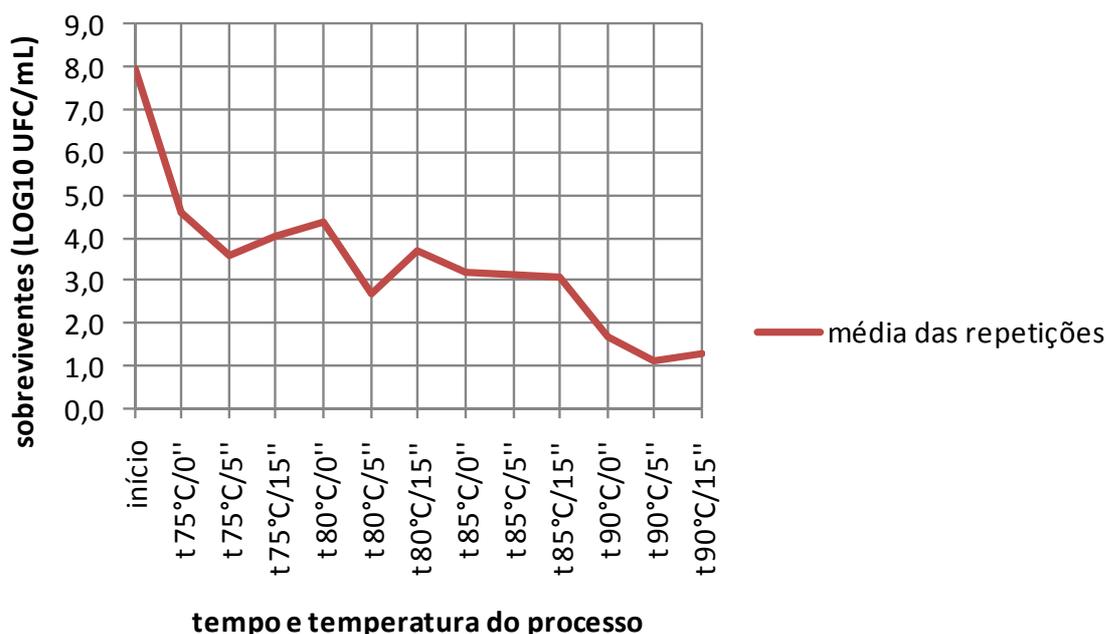


Gráfico 2 – Perfil da média de inativação do *Mycobacterium bovis* espoligotipo BR024 em creme de leite durante processamento térmico de 75°C a 90°C (Banho-Maria a 95°C) - São Paulo, out-2009 a dez - 2009

Para análise da eficácia detectada nesse experimento, consideremos o pior cenário em que o processamento térmico ocorreria.

Partindo do fato que concentração de gordura do creme empregado nesse experimento (34% a 37%) é uma concentração de cerca de 10 vezes o teor de gordura do leite (3,4%), e assumindo que toda a contaminação presente no leite permanecesse no creme, poderia se supor que, no caso de máxima contaminação natural do leite (10^4 UFC/mL, segundo Ball, 1943), o creme teria 10^5 UFC/mL. Considerando esse fato, pode-se dizer que, nas condições desse estudo, todos os tratamentos térmicos pesquisados seriam capazes de reduzir o agente para níveis tão ou mais baixos quanto 1,1 log UFC/mL (= 5,0 log UFC/mL - 3,9 log UFC/mL).

Duas questões permanecem em aberto: 1) saber se (e quanto) a forma de aquecimento do creme realizado nas indústrias (normalmente trocador de calor em placas) influencia a eficácia do processo, 2) saber se 1,1 log UFC/mL seria um critério aceitável para o *M. bovis* nesse produto.

Dado às incertezas explicitadas, seria pertinente estimular que as empresas usassem binômios de tempo e temperatura iguais ou superiores a 85°C/5 segundos,

buscando um aumento da eficácia do tratamento de cerca de 1 log UFC/mL (a redução média nesse binômio foi de 4,8 log UFC/mL).

Para finalizar, os resultados desta pesquisa demonstram a importância de dar continuidade à esse tipo de estudo, adaptando a metodologia de tratamento térmico de forma a reduzir o tempo de aquecimento, mimetizando a pasteurização rápida realizada na indústria.

6 CONCLUSÕES

Nas condições do estudo todas as combinações de tempo e temperatura de processo foram eficazes para reduzir o perigo a níveis tão baixos quanto 1,1 log UFC/mL ou menores, considerando a máxima contaminação natural no leite e considerando que toda a contaminação do leite permanecesse no creme.

Nas condições desse estudo, o tratamento a 90°C/5 segundos foi o mais eficaz, causando reduções médias de 6,8 log UFC/mL do *M. bovis* no creme.

Nas condições desse estudo, o binômio a 75°C/15 segundo, embora sendo o mais baixo desempenho, também teve bom resultado, com redução média de 3,9 log UFC/mL do *M. bovis* no creme.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonotic tuberculosis. In: **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals**. 2nd ed. Washington: Pan American health organization/World Health Organization, 1987. (Scientific Publication, n. 503).

ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. **A importância do leite de cabra na nutrição humana. Registro da Agropecuária Catarinense**, 2003. Revista Brasileira Agropecuária, ano 2, n. 15, p. 54-62, 2003.

BALL, C. O. Short Time pasteurization of Milk. **Industrial Engineering Chemistry**, v. 35, p. 71-84, 1943.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**. São Paulo: Nobel, 1991. p. 22, 72,109.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Divisão de Normas Técnicas. Decreto nº 30691, de 29 de março de 1952. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar &id=14974>>. Acesso em: 11 jan. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria 146, de 7 de março de 1996. **Regulamento técnico de Identidade e Qualidade de Creme de Leite**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>>. Acesso em: 11 jan. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.2, de 10 jan. 2001**. Institui o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2502>>. Acesso em: 16 maio 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.68, de 12 dez. 2006**. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar &id=17472>>. Acesso em: 11 jan. 2010.

BUSSATA, C.; VALDRUGA, E.; CANSIA, R. L. Occurance of *Bacillus sporothermodurans* in integral and skimmed UHT milk. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 408-411, 2005.

CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. **Manual de normas y procedimientos técnicos para a bacteriologia de la tuberculosis**. Buenos Aires: OPAS/OMS, 1985, 25 p. (Nota técnica, 27).

CHHABRA, A. T.; CARTER, W. H.; LINTON, R. T.; COUSIN, M. A. A predictive Model to Determine the Effects of pH, Milk fat, and Temperature on Thermal Inactivation of *Listeria monocytogenes*. **Journal of food Protection**, v. 62, n. 10, p. 1143-1149, 1999.

COLLINS, C. H.; GRANGE, J. M. The bovine tubercle *Bacillus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 55, p. 13-29, 1983.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. São Paulo: Varela, 1992. 843 p.

COSIVI, O.; MESLIN, F. X.; DABORN, C. J.; GRANGE, J. M. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans, with particular referente to Africa. **Scientific and Technical Review**, v. 14, p. 733-746, 1995.

DONNELLY, C. W.; BRIGGS, E. H. Psychotropic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition. **Journal of food Protection**, v. 49, n. 12, p. 994-998, 1986.

DUNLOP. R. H.; WILLIANS. D. J. **Veterinary medicine: au illustrated history**. Saint Louis, Missouri: Mosby, p. 155-168, 1996.

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) - 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**, 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, p. 111,1996.

GRANGE, J. M.; YATES, M. D. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 137-152, 1994.

GRANT, I. R.; BALL, H. J.; NEILL, S. D.; ROWE, M. T. Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows`milk at Pasteurization Temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 631-636, 1996.

GRANT, I. R.; BALL, H. J.; ROWE, M. T. Thermal inactivation of several *Mycobacterium* spp. In milk by pasteurization. **Applied Microbiology**, v. 22, p. 253-256, 1996.

HERMANS, P. W. M.; VAN SOOLINGEN, D.; BIK, E. M. de; HAAS, P. E. W.; DALE, J. W.; VAN EMBDEN, J. D. A. The insertion element IS 987 from *M. bovis* BCG is located in a hot spot integration region for insertion elements in *M. tuberculosis* Complex strains. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 2695-2705, 1991.

HIJJAR, A. M.; OLIVEIRA, M. J. P.; TEIXEIRA, G. M. **A tuberculose no Brasil e no Mundo. Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 9, n. 2. p. 9-16, 2001.

HOUDE, C.; DERY, P. *Mycobacterium bovis* sepsis in an infant with human immunodeficiency virus infection. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 7, p. 810-812, 1988.

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.

KANTOR, I. N. **Bacteriologia de la tuberculosis humana y animal**. São Paulo: OPAS/OMS, 1979. p. 63. (Nota Técnica, 11).

KARLSON, A. G.; LESSEL, E. F. *Mycobacterium bovis* nom nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 20, p. 273-282, 1970.

KLEEBERG, H. K. Tuberculosis humana de origen bovino y salud publica. **Revue Scientifique et Technique Office Internacional des Epizooties...**, v. 3, n.1, p. 55-76, 1984.

KLENCKE, F. H. **Über ansteckung und verbreitung der scrophelkrankheit bei menschein durch den genus der kuhmilch**. Leipzig, 1846.

KOCH, R. **Die Aetiologie der Tuberculose**. Berliner Klinische Wochenschrift, 1882.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; JUNIOR, W. C. W. Diagnóstico Microbiológico. In: **Micobactérias**. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. p. 903-946.

LEITE, C. Q. F.; ANNO, I. S.; LEITE, S. R. A.; ROXO, E.; MORLOCK, G. P.; COOKSEY, R. C. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p. 319-323, 2003.

LERCHE, M. Inspeccion Veterinária de la leche. In: **Obtención Higiênica da la leche**. Zaragoza: Acribia, 1969.

MCDONALD, F.; SUTHERLAND, A. D. Effect of heat treatment on *Listeria monocytogenes* and Gram negative bacteria in sheep, cow and goat milk. **Journal of Applied Bacteriology**, n. 75, p. 336-343, 1993.

MCFADDEN, J. J.; COLLINS, J.; BAEMAN, B.; ARTHUR, M.; GITNICK, G. Mycobacteria in Crohn's disease: DNA probes identify the Wood Pigeon strain of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis* from human tissue. **Journal Clinical Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 3070-3073, 1992.

MOLIN, N.; SNYGG, B. G. Effect of lipid materials on heat resistance of bacterial spores. **Journal of Applied Microbiology**, v. 15, p. 1422-1426, 1967.

MORETTI, L. A.; PINHEIRO, S. R.; PAE, A. C. Uma revisão sobre a tuberculose em cães e gatos. **Clínica Veterinária**, v. 48, p. 54-62, 2004.

NISHIMOTO, E. J. **Efeito da gordura do leite de vaca sobre o valor de D_{65°C} do *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573)**. 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

NORTH, C. E.; PARK, W. H. Standards for milk pasteurization. **American Journal of Hygiene**, v. 7, p. 147-173, 1927.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. STOP/TB e HIV/SIDA. **Quadro geral estratégico para reduzir o peso da TB/HIV**. Geneva: OMS, 2007.

PEREDA, J. A. O.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVARES, L. F.; SANZ, M. L.G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S., **Tecnologia de Alimentos 2**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.105-107.

PIVETTA, M. Ferro na tuberculose. Ciência e Tecnologia no Brasil. **Pesquisa FAPESP**, n. 97, p. 32-37, 2004.

RADOSTITS, O. M.; GA Y, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos e eqüinos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 817-827, 2002.

RAVENAL, M. P. The intercommunicability of human and bovine tuberculosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 15, p. 112-143, 1902.

RAVIGLIONE, M. C.; SNIDER, D. E.; KOCHI, A. **Global epidemiology of tuberculosis**. **Journal of the American Medical Association**, v. 273, p. 220-226, 1995.

RIBEIRO, L. **Inativação térmica (75°C) de *Mycobacterium bovis* (isolados de origem bovina) em leite integral experimentalmente inoculado**. 2009. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ROSALES, C. A. R.; ZUMARRAGA, M. J.; OLIVEIRA, E. M. D.; CATALDI, A. A.; ROMANO, M. I.; FERREIRA NETO, J. S. Caracterización molecular de aislamientos de *Mycobacterium bovis* del estado de São Paulo-Brasil utilizando la técnica de spoligotyping y MIRU-VNTR. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2003, Florianópolis. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2003. CD-ROM.

ROXO, E. *M. bovis* como causa de zoonose. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.18, n.1, p.101-108, 1997.

SÁ, M. I.; FERREIRA, C. Importância das zoonoses na segurança alimentar. **Segurança e Qualidade Alimentar**. n. 2, 2007. Disponível em: <<http://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-SEQUALI-02/n02-14-17.pdf>>. Acesso em: 21 jan. 2010.

SÃO PAULO (estado) Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Tuberculose no Estado de São Paulo: indicadores de morbimortalidade e indicadores de desempenho. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 3. p. 1-37, 2006. Suplemento, 4.

SMITH, T. A comparative study of bovine tubercle bacilli and human bacilli from sputum. **Journal of Experimental Medicine**, v. 3, p. 451-511, 1898.

SOUZA, A. V.; SOUZA, C. F. A.; SOUZA, R. M.; RIBEIRO, R. M. P.; OLIVEIRA, A. L. A importância da tuberculose bovina como zoonose. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 59, p. 22-27, 1999.

STABEL, J. R. On-farm batch pasteurization destroys *Mycobacterium paratuberculosis* in waste milk. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 524-527, 2001.

SUNG, N.; COLLINS, M. T. Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 999-1005, 1998.

VIGILÂNCIA de La tuberculosis zoonótica por M. bovis: sistema de enfermedades de declaración obligatoria, 1982-1995. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica de España, Centro Nacional de Epidemiología, Boletín Epidemiológico Semanal, v. 3, p. 183-184, 1995.

ZOPF, W. Die Spaltpilze. Breslau: Edward Trewendt, p. 1-100, 1883.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO/HTM/TB/2006. **Global Tuberculosis Control:** surveillance, planning, financing. Geneva: WHO Report, 2007. Disponível em: <www.who.int/tb/publications/global_report/2007/pdf/full.pdf>. Acesso em: 12 maio 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO/HTM/TB/2009. **Global Tuberculosis Control:** epidemiology, strategy, financing. Geneva: WHO Report, 2009. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/index.html. Acesso em: 30 maio 2010.

ANEXO A

Meio *Stonebrink*

Preparo de uma receita (rendimento 500 ml):

Base

- ✓ Fosfato monopotássico (KH_2PO_4): 3,5g
- ✓ Fosfato dissódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): 2g
- ✓ Piruvato de Sódio: 6,25g
- ✓ Água destilada: 500 ml
- ✓ Autoclavar a base

Complemento da base

- ✓ Verde Malaquita: 20 ml
- ✓ 20 ovos (17 inteiros e 3 gemas): 1 L
- ✓

Homogeneização

- ✓ Homogeneizar primeiramente com um mixer esterilizado
- ✓ Colocar o meio no agitador até obter um meio verde claro

Distribuição do meio

- ✓ Distribuir 9 ml do meio em cada garrafinha
- ✓ Fechar a tampinha com apenas um “click”

Coagulação do meio

- ✓ Colocar as garrafinhas deitadas na coaguladora
- ✓ Esperar atingir a temperatura de 80°C
- ✓ Manter por 30 minutos a 80°C
- ✓ Desligar a coaguladora e deixar o meio esfriar
- ✓ Armazenar sob refrigeração