

LEANDRO RIBEIRO

Inativação térmica (75°C) de *Mycobacterium bovis* (isolados de origem bovina) em leite integral experimentalmente inoculado

São Paulo
2009

LEANDRO RIBEIRO

Inativação térmica (75°C) de *Mycobacterium bovis* (isolados de origem bovina) em leite integral experimentalmente inoculado.

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

Área de Concentração

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles

São Paulo
2009

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.2195
FMVZ

Ribeiro, Leandro
Inativação térmica (75°C) de *Mycobacterium bovis* (isolados de origem bovina) em leite integral experimentalmente inoculado / Leandro Ribeiro. – 2009.
61 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2009.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles.

1. Leite. 2. Inativação térmica. 3. Pasteurização rápida. 4. *Mycobacterium bovis*. 5. Contaminação. I. Título.

ERRATA

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Folha de Avaliação	3	5	Medicina Ciências	Ciências

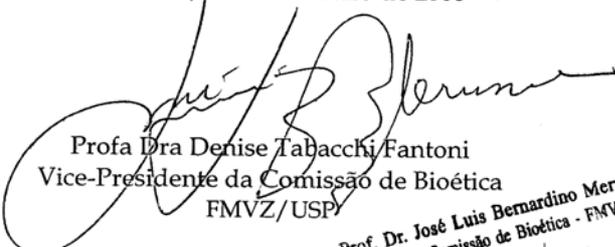


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Resistência de diferentes espoligotipos de *Mycobacterium bovis* à pasteurização rápida em leite experimentalmente inoculado", protocolado sob o nº1282/2007, 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 "Resistance as of different espoligotipos as of *mycobacterium bovine* at the pasteurization quick milk experimentally inoculate", protocol number 1282/2007, 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 Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética - FMVZ/USP
SP. _____

FICHA DE AVALIAÇÃO

Nome: RIBEIRO, Leandro

Título: Inativação térmica (75°C) de *Mycobacterium bovis* (isolados de origem bovina)
em leite integral experimentalmente inoculado

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 Medicina Ciências

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Julgamento _____

*Dedico
A minha esposa Gabriela e,
Meus filhos Maria Eduarda e Mateus.*

AGRADECIMENTOS

Á Professora Evelise Oliveira Telles por quem tenho uma profunda admiração, agradeço pela orientação, confiança e incentivo.

Á minha esposa que esteve ao meu lado nos momentos difíceis, sempre me apoiando e ajudando quando possível.

As minhas amigas de mestrados Tatiane Hoshida e Livia Rodrigues pela ajuda companheirismo, amizade e por compartilhar comigo as dificuldades e as alegrias da pós-graduação.

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

A FAPESP pela concessão e apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

RIBEIRO, L. **Inativação térmica (75°C) de *Mycobacterium bovis* (isolados de origem bovina) em leite integral experimentalmente inoculado.** [Thermal inactivation (75°C) of *Mycobacterium bovis* (isolated from bovine) in whole milk experimentally contaminated] 2009. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A pasteurização do leite destinado ao consumo é obrigatória no Brasil e o sistema rápido (75°C/15 a 20 segundos) é o mais empregado no país. O processo visa eliminar. Os parâmetros de tempo e temperatura empregados no mundo foram definidos após estudos sobre a resistência térmica do *Mycobacterium tuberculosis* e da *Coxiella burnetti*, reconhecidos como os microrganismos patogênicos, não formadores de esporos e que eventualmente podem estar presentes no leite cru, que apresentam a maior resistência térmica. Entretanto, não há estudos sobre a resistência térmica do *M. bovis* que circula nos bovinos no Brasil. Este estudo propôs-se a avaliar a resistência térmica (75°C) de cinco espólotipos de *M. bovis*, isolados de bovinos abatidos no estado de São Paulo, em leite integral experimentalmente contaminado. Leite UHT foi contaminado com *M. bovis* e, então, submetido a tratamento térmico em banho-maria a 75°C por 20 segundos. Cada espólotipo foi testado 3 vezes. As amostras foram retiradas do banho nos tempos 0 (o momento em que o leite atingiu 75°C), 5, 10, 15 e 20, correspondendo ao tempo, em segundos, de tratamento térmico. O leite contaminado também foi analisado, para quantificação da carga inicial. O controle do processo envolveu o acompanhamento da temperatura do leite (um tubo com termômetro) e análise das enzimas fosfatase alcalina e peroxidase ao final do tratamento; para tal, amostras de leite cru foram tratadas juntamente com as amostras-

teste. Para quantificação, foi realizada a diluição decimal seriada seguida da semeadura em duplicata em meio Stonebrink-Leslie (37°C/45dias). Os resultados mostraram que foi na fase de aquecimento que ocorreu a maior taxa de morte de todos os espoligotipos. Houve diferença de resistência entre os espoligotipos ao processo que simulou a pasteurização rápida e o espoligotipo BR024 foi o mais resistente. Conclui-se que houve diferença da eficácia da pasteurização, de acordo com o espoligotipo testado, mas que os resultados precisam ser investigados mais detalhadamente.

Palavras chave: Leite. Inativação térmica. Pasteurização rápida. *Mycobacterium bovis*. Contaminação.

ABSTRACT

RIBEIRO, L. **Thermal inactivation (75°C) of *Mycobacterium bovis* (isolated from bovine) in whole milk experimentally contaminated.** [Inativação térmica (75°C) de *Mycobacterium bovis* (isolados de origem bovina) em leite integral experimentalmente inoculado] 2009. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The pasteurization of milk for consumption is mandatory in Brazil and fast system (75 ° C/15 to 20 seconds) is the most used around the country. The process aims to eliminate. The parameters of time and temperature were set in the world after studies on the thermal resistance of *Mycobacterium tuberculosis* and *Coxiella burnetii*, recognized as the pathogenic microorganisms, not spore-forming and eventually may be present in raw milk, with the strongest resistance heat. However, no studies on the thermal resistance of *M. bovis* circulating in cattle in Brazil. This study aimed to evaluate the thermal resistance (75° C) of five espoligotipos *M. bovis* isolated from cattle slaughtered in the state of Sao Paulo in experimentally infected whole milk. UHT milk was contaminated with *M. bovis* and then subjected to heat treatment in a water bath at 75 ° C for 20 seconds. Each espoligotipo was tested 3 times. Samples were taken from the bath at 0 (the time when the milk reached 75 ° C), 5, 10, 15 and 20, corresponding to time, in seconds, the heat treatment. The contaminated milk was also analyzed to quantify the initial charge. The control process involves monitoring the temperature of the milk (a tube with a thermometer) and analysis of the enzymes alkaline phosphates and peroxidase the end of treatment, for such raw milk samples were treated with the test samples. For quantification, we performed a ten-fold dilution serial followed by seeding in duplicate in the middle Stonebrink-Leslie (37 C/45dias). The results showed

that it was warming up that had the highest death rate of all espoligotipos. There were differences in resistance between espoligotipos the process that simulated pasteurization and rapid espoligotipo br024 was the toughest. It was concluded that there was no difference of the effectiveness of pasteurization, according to the espoligotipo tested, but the results need to be investigated further.

Key words: Milk. Thermal inactivation. Fast pasteurization. *Mycobacterium bovis*. Contaminated

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Preparação do inóculo.....	42
Figura 2 - Ilustra este procedimento de contaminação de leite.....	44
Figura 3 - Pasteurização, diluição e semeaduras das sub-amostras.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultado da média das 3 repetições em Log das contagens de UFC/ml dos espoligotipos de <i>Micobacterium bovis</i> no controle de contaminação de leite nos tempos 0, 5, 10, 15, 20 e 25 segundos de tratamento térmico a 5°C.....	48
Tabela 2	Redução da população (Log UFC/mL) de <i>Mycobacterium bovis</i> (cinco cepas isoladas do campo) inoculado em leite integral durante o processo de pasteurização lenta mimetizado em banho-maria – São Paulo - agosto de 2008 - ago-2009.....	49

Lista de abreviaturas

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVO	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Tuberculose	19
3.2 <i>Mycobacterium bovis</i>	23
3.3 <i>Mycobacterium</i> no leite	29
3.4 Pasteurização	31
3.5 LEGISLAÇÃO	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Estirpes testadas	39
4.2 Obtenção do inóculo	40
4.3 Contaminação do leite	42
4.4 Tratamento térmico	44
4.5 Controle do processo de pasteurização	44
4.6 Diluição e semeadura das amostras	45
4.7 Contagem e registro das colônias	47
5 RESULTADOS	48
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

Todo leite destinado ao consumo, bem como para a produção de derivados comestíveis, deve ser propriamente pasteurizado segundo o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal - RII-SPOA (BRASIL, 1952). Exceção é feita aos queijos com maturação acima de 60 dias (BRASIL, 1996).

Os binômios de tempo e temperatura aprovados para pasteurização do leite são: 62 a 65°C por 30 minutos (pasteurização lenta) ou 72 a 75°C por 15 a 20 segundos (rápida); o leite pasteurizado deve apresentar a enzima fosfatase alcalina negativa e a peroxidase positiva (BRASIL, 1952). Isso se deve ao fato de que a fosfatase alcalina, que está sempre presente no leite cru, é inativada na pasteurização e é mais termo-resistente que o *Mycobacterium* spp (BEHMER, 1991). A peroxidase, também sempre presente no leite cru, só é destruída quando há excesso de tempo e/ou temperatura.

O binômio tempo e temperatura de pasteurização do leite foram determinados com base na resistência térmica do *Mycobacterium* spp e da *Coxiella burnetti* (NORTH; PARK, 1927; HUEBNER et al., 1949) por serem as bactérias não formadoras de esporos mais termo-resistentes que podem normalmente contaminar o leite.

Os estudos que descrevem a cinética de morte térmica do *Mycobacterium bovis* são datados principalmente entre as décadas de 20 e 60. Nos anos 90 alguns estudos foram realizados, comparativamente à resistência do *M. paratuberculosis*, devido ao seu potencial envolvimento na doença de Chron.

Não foi encontrado nenhum dado na literatura sobre eventuais diferenças individuais na sensibilidade térmica do *M. bovis*, embora haja técnicas muito avançadas que discriminam geneticamente os isolados. Da mesma forma, nada foi encontrado

sobre o comportamento do *Mycobacterium bovis* isolado no Brasil, frente aos processos de pasteurização vigentes. Percebe-se, pelo exposto, que um estudo para avaliação da resistência térmica de diferentes espoligotipos de *Mycobacterium bovis* isolados de bovinos no Brasil é uma contribuição importante para a análise da segurança obtida com a pasteurização rápida do leite.

2 OBJETIVO

Avaliação da inativação térmica (75°C) de esporigotipos de *Mycobacterium bovis* (isolados de bovinos abatidos no estado de São Paulo) em leite integral experimentalmente inoculado.

Avaliar o padrão de inativação dos isolados de *M. bovis* durante tratamento térmico que simula a pasteurização rápida.

Avaliar a resistência térmica dos isolados de *M. bovis* ao tratamento que simula a pasteurização rápida.

Comparar o padrão de inativação e a resistência térmica entre os esporigotipos de *M. bovis*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta revisão, tem como objetivo esclarecer e discutir a importância da eficiência da pasteurização utilizada pelas indústrias de laticínios, bem como as possíveis doenças transmitidas por leite.

3.1 Tuberculose

A tuberculose bovina, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium bovis*, que pertence ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*, é uma zoonose de caráter crônico e de importância para a pecuária mundial, responsável por perdas econômicas na casa dos bilhões de dólares (STEELE, 1995), representando uma das principais enfermidades em rebanhos bovinos na América Latina (ZUMÁRRAGA et al., 1999).

Afeta tanto os animais domésticos quanto silvestres, incluindo os pássaros. Os animais domésticos atuam como reservatório ou disseminadores da infecção, podendo ser potencialmente perigosos aos seres humanos, e assim representam um problema para saúde pública (LESSLIE et al., 1960; BERNABÉ et al., 1990, 1991).

Em 2004, foi publicado o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal, que padroniza as ações profiláticas, diagnóstico e de vigilância sanitária, visando baixar a prevalência e a incidência de novos casos da doença, e criando propriedades certificadas que oferecem ao consumidor produtos de baixo risco sanitário (BRASIL, 2004).

Apesar de existirem medidas sistemáticas aplicadas à pecuária, como os testes de rotina para o diagnóstico de diversas doenças nos rebanhos e a pasteurização do

leite, reduzindo o risco de tuberculose humana por *M. bovis*, e medidas de prevenção e quimioterapia anti-tuberculosa eficaz, a transmissão da tuberculose animal para o humano é crescente, principalmente em países e regiões mais submetidos à privação social, onde as medidas não foram adotadas de modo mais efetivo (ANTUNES, 2002).

O diagnóstico direto pelo uso de PPD (Derivado Protéico Purificado) em bovinos possui algumas limitações: (1) reações inespecíficas pelo contato prévio com outras micobactérias ambientais, resultando em falsos positivos, (2) não reatividade levando a falsos negativos decorrente de infecção recente, imunossupressão pós-parto, alergia etc. (MONOGHAN et al., 1994) e (3) reações cruzadas também com outros patógenos não relacionados como *Corynebacterium* e *Nocardia spp.*

No Brasil estima-se que 200.000 vacas estejam infectadas entre uma população total de aproximadamente 170 milhões e suspeita-se que o *Mycobacterium bovis* seja responsável por 4.000, de aproximadamente 80.000 casos de tuberculose humana relatado a cada ano (LEITE, 2003).

Acredita-se que a tuberculose bovina esteja amplamente disseminada na maioria dos países em desenvolvimento, embora a real situação não seja conhecida, pois faltam estudos. Na América Latina, entre 1987 a 1989, dados de condenação por tuberculose em abatedouros bovinos mostraram uma situação bastante heterogênea, com variações entre 0,008 – Uruguai – e 4,1 – Argentina – (KANTOR; RITTACO, 1994). No Brasil, os dados de notificações oficiais de tuberculose bovina indicam uma prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados no período de 1989 a 1998 (BRASIL, 2003). Estudo bem conduzido, realizado em 1999, em sete regiões de Estado de Minas Gerais, envolvendo aproximadamente 1.600 propriedades e 23.000 animais, estimou a prevalência de animais infectados em 0,8%. No mesmo estudo foram

detectadas 5% de propriedades com animais reagentes, sendo importante destacar que este valor subiu a 15% no inverno de propriedades produtoras de leite com algum grau de mecanização da ordenha e de tecnificação da produção (BELCHIOR, 2000).

Uma das principais formas de infecção humana pelo bacilo bovino é a ingestão de leite cru contaminado (SOUZA,1999). Um animal infectado é capaz de eliminar o agente pelo leite mesmo antes do desenvolvimento de lesões teciduais (ROXO, 1997).

A respeito disso, Ball (1943) relata que a contaminação natural máxima do leite por *M. bovis* pode chegar a 104 UFC/mL, mas, como o leite não apresenta alterações visíveis segundo Lerche (1969), fica difícil a detecção para segregação e adequado tratamento do produto.

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, as taxas de morbidade e mortalidade da tuberculose aumentaram nos últimos tempos (KONEMAN et al., 2001).

O mais preocupante é a elevada incidência da tuberculose em alguns estados brasileiros, com um incremento observado de 370 novos casos por ano, concentrados na região Sudeste em uma proporção de 63,4% do total nacional. Já no estado do Rio de Janeiro esta situação é dramática, pois é onde se concentra a pior taxa de mortalidade (HIJJAR, 2006).

Kleeberg (1984) citou que a tuberculose humana, provocada geralmente pelo *Mycobacterium tuberculosis*, acarretou, anualmente na Europa, a morte de pelo menos três milhões de pessoas e enumeravam-se dez milhões de novos casos a cada ano. Sob condições favoráveis, o *Mycobacterium bovis* pode causar, em seres humanos, as mesmas formas clínicas e lesões patológicas que o *M. tuberculosis* (ACHA; SZYFRES,

1986), e a infecção de seres humanos pelo *M.bovis* ocorre, principalmente pela via aerógena, ou pela ingestão de alimentos contaminados.

A pandemia da síndrome da imunodeficiência adquirida, AIDS, está associada a infecções oportunistas, principalmente tuberculose e doenças causadas pelo complexo *M. avium* (FREITAS et al., 2001). A tuberculose é a principal infecção oportunista em pessoas HIV - positivas, e a maioria das pessoas duplamente infectadas pelo *M.bovis* e pelo vírus HIV vive em países em desenvolvimento. A epidemia de infecção pelo HIV nestes países, particularmente naqueles em que a infecção por *M.bovis* está presente nos animais e há condições favoráveis à transmissão desta zoonose, pode fazer da tuberculose zoonótica uma séria ameaça de saúde pública para populações de risco (COSIVI et al., 1998).

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

O diagnóstico *in vivo* da tuberculose bovina é feito principalmente pela prova tuberculínica e pela avaliação dos sinais clínicos. A confirmação post mortem baseia-se na bacteriologia (ROXO, 1996) a partir de lesões granulomatosas.

3.2 *Mycobacterium bovis*

O *Mycobacterium bovis* já provocava, antes da ocupação humana, a tuberculose em animais das regiões que atualmente corresponde à Europa. No entanto, somente com a domesticação dos bovídeos, ocorrido entre 8000 – 4000 a.C. é que surgem evidências arqueológicas de infecção humana por M bovis através da observação de lesões tuberculosas em múmias que viveram durante o período neolítico, encontradas na Alemanha. A origem de tais lesões foi atribuída, provavelmente, à interação ambiental dos humanos com animais infectados e ao consumo de alimentos contaminados (DORMANDY, 2002; REICHMAN; TAME, 2003).

Na sociedade antiga, Hipócrates definiu a tuberculose como uma doença natural denominando-a de tísica, do grego *phthisis*, ou sela, que traz consumpção, devido ao esgotamento físico, frequentemente apresentado pelos indivíduos afetados. Posteriormente Aristóteles também mencionou a ocorrência da doença na população grega. Três séculos antes da era cristã. Na França e na Inglaterra, por volta do século XVI, pacientes com tuberculose ganglionar eram contemplados com o toque real pelos reis desses países, o que, muitas vezes era seguido de melhora dos sintomas, atribuindo-se tal efeito a assepsia ao ambiente onde os doentes permaneciam aguardando o referido ritual. Também são antigos os relatos dessa enfermidade em animais abatidos na comunidade judaica, ao ponto do *Talmud*, o livro sagrado dos judeus, proibi o consumo das carcaças de animais que apresentassem lesões pulmonares, quando abatidos em matadouros ou submetidos ao sacrifício ritualístico sugerindo que os hebreus nos primórdios da era cristã, no século II, já conhecia as

lesões presuntivas de tuberculose em ruminantes (CORRÊA; CORRÊA, 1992; MICHALANY, 1995; DORMANDY, 2002).

Nós séculos XVII e XVIII, com o início da exploração anatômica dos pulmões de humanos, François de la Boe, identificou em pacientes mortos pela tísica, estruturas anormais que lembravam tubérculos, do latim *tuberculum*, ou seja, nódulo, dando origem à terminologia *tuberculose*. No século XVIII, esta doença era conhecida por peste branca, citada brevemente por Giovanni Morgagni, pai da anatomia patológica, e descrita em detalhes por René Laennec (DUNLOP; WILLIANS, 1996; FERREIRA NETO; BERNARDI, 1997).

Em 1751 o Rei Fernando VI da Espanha criou uma lei que obrigava os médicos a notificarem todos os casos de tuberculose, afastando-se os doentes da comunidade, queimando-se todos os pertences dos pacientes que vinham a falecer. A partir de meados do século XVIII a Revolução Industrial na Inglaterra promoveu, além do desenvolvimento, uma grande expansão da pobreza que, associada às condições sanitárias ruins, favoreciam a disseminação de enfermidades, entre elas a tuberculose, que acometia quase metade da população inglesa. Apesar de toda essa história, a compreensão da doença só ocorreu a partir de 1810, quando Carmichael, um cientista inglês, observou que havia relação entre tuberculose nodular ou escrófula, em crianças, e consumo de leite de vaca pelas mesmas. Na época ele concluiu equivocadamente que a doença era desencadeada por fatores nutricionais (DUNLOP; WILLIANS, 1996; FERREIRA NETO; BERNARDI, 1997).

Entre 1865 e 1868, Jean Antoine Villemim demonstrou experimentalmente a transmissibilidade da tuberculose humana e de bovinos em coelhos e cobaias. Em 24

de março de 1882, Robert Koch, descobriu o agente infeccioso da tuberculose, corando-o pela fucsina-anilina e isolando-o em meio de cultura elaborado a partir de Tumor vítreo de bovinos de abatedouros, denominando-o em 1884, *tuberkelbacillen* ou bacilo da tuberculose. Em 1885, Roentgen descobre o Raio X, dando impulso aos estudos da enfermidade, método posteriormente desonerado no Brasil, quando Manoel de Abreu imprimiu as radiografias em filme de 35 milímetros, criando assim a abreugrafia (GRANGE; YATES, 1994; MICHALANY, 1995; ROXO, 1997).

Eufórico com sua descoberta, Koch tentou produzir uma vacina anti-tuberculose utilizando extrato glicérico de bacilos, ao qual denominou *old tuberculin*, ou tuberculina velha. Os resultados foram ineficazes, mas a tentativa não foi em vão, permitindo-lhe a descoberta do fenômeno alérgico em pessoas que haviam tido contato prévio com o bacilo. Esta reação foi melhorada por Charles Mantoux em 1908, tornando-se universal (GRANGE; YATES, 1994; MICHALANY, 1995).

A vacina anti-tuberculose utilizada hodiernamente em humanos, foi desenvolvida entre 1908 e 1919 por dois cientistas franceses, Calmette e Guérin (BCG). Naquela época, o tratamento preconizado para a tuberculose em humanos limitava-se ao isolamento do paciente associado ao repouso, ar livre e boa alimentação. Algumas vezes estas medidas eram reforçadas com a administração de quinino, Cálcio, creosoto, Enxofre, Ouro e Bismuto. Neste ínterim, havia a crença generalizada no meio científico, inclusive compartilhada por Koch, de que existia apenas um tipo de bacilo da tuberculose acometendo os humanos e os animais. Poucos se atreviam a discordar dessa idéia, tamanho o prestígio e credibilidade de Koch à época. Entre os que se opunham a este conceito, havia celebridades coevas da medicina veterinária, a

exemplo de Ravanel, M'Fadyean e Bang (GRANGE; YATES, 1994; MICHALANY, 1995; ROXO, 1997).

Em 1897, Theobald Smith, nos Estados Unidos da América (EUA), observando que o bacilo que acometia bovino era menor, crescia mais lentamente *in vitro* e era menos sensível às modificações dos meios de cultura do que o bacilo que acometia humano, levantou dúvidas sobre a teoria da existência de um único bacilo e descreveu a diferenciação entre os bacilos, denominando-os *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium avium* (PRITCHARD, 1988).

O século XIX foi, em função da tuberculose, de desalento para a sociedade contemporânea. A humanidade perdia precocemente seus ícones e cidadãos em geral. Como exemplo pode-se citar Frédéric Chopin, compositor clássico que, vitimado pela tuberculose, chegou a ser isolado em um monastério na Ilha de Mallorca onde compôs uma de suas mais belas obras, *Prelúdios*. Por volta de 1900, tantas eram as dúvidas acerca da doença, afetando tanto os humanos quanto os animais, principalmente com relação ao possível aspecto zoonótico da tuberculose bovina, que o governo inglês decidiu nomear uma comissão para estudar o assunto (PRITCHARD, 1988; DORMAND, 2002).

Foi então criada a *Royal Commission on Tuberculosis*, que, ao invés de limitar-se às opiniões de especialistas, resolveu desenvolver um extenso programa de pesquisa, visando a geração de conhecimento que esclarecessem definitivamente as dúvidas sobre a tuberculose em bovinos e sua relação com a doença em humanos. Essa comissão trabalhou de 1901 à 1911, dispondo de um laboratório e uma fazenda de experimental, e chegou a uma conclusão que bovinos tuberculosos representam

risco a saúde pública e que algo deveria ser feito, pois a ocorrência da doença nesses animais era em número alarmante (PRITCHARD, 1988; CORREA; CORREA, 1992).

A patogênese da enfermidade era ainda confusa, quando em 1917 Karl Ranke comparou seu desenvolvimento com a sífilis, determinando três períodos distintos, isto é, infecção primária, disseminação e lesão orgânica isolada, posteriormente essa última forma passou a ser denominada como tuberculose primária, a partir da qual poderia ocorrer evolução para tuberculose de reativação endógena ou de reinfecção exógena (PRITCHARD, 1988; GRANGE; YATES, 1994).

Entre o fim do século XIX e início do século XX, a tuberculose acometia entre 20 e 40% dos bovinos de muitos países da Europa. A partir de então ficaram patentes os problemas sociais e econômicos decorrentes da doença e os países desenvolvidos iniciaram a implantação de programas para controle e erradicação. Após várias décadas, muitos países europeus da Oceania e da América do Norte. Alcançou boa parte de seus objetivos, apresentando atualmente baixíssimas taxas de incidências e prevalência da tuberculose bovina (CORRÊA; CORRÊA, 1992; FERREIRA NETO; BERNARDI, 1997).

Até 1970 o bacilo da tuberculose bovina era considerado uma variante do *Mycobacterium tuberculosis* e denominado *M. tuberculosis* variante *bovis* ou *M. tuberculosis* subespécie *bovis*. A proposta para sua classificação como espécie individual denominada *Micobacterium bovis* feita por Karlson e Lessel em 1970 (FERREIRA NETO; BERNARDI, 1997).

No âmbito pecuário, a terapêutica ainda é discutível, pois a legislação sanitária da maioria dos países que alcançaram bons níveis de controle, não a preconizam em contrapartida existem pesquisas indicando tratamento para bovinos em doses diárias e

intervaladas utilizando principalmente a isomiazida (LANGEMEGGER et al., 1991; CORRÊA; CORRÊA, 1992; MOTA et al, 2004).

O microrganismo é classificado como micobactérias quando possui como característica fundamental a “ácido-resistência”, ou seja, essas bactérias resistem à descoloração com álcool acidificado quando coradas com carbolfucsina (KONEMAN et al., 2001).

As micobactérias pertencem à família *Mycobacteriaceae*, gênero *Mycobacterium*. São bacilos curtos aeróbicos, imóveis, não capsulados, não flagelados, apresentando aspecto granular quando corados, medindo de 0,5µm a 0,7µm de comprimento por 0,3µm de largura, tem dificuldade em se desenvolverem meios glicerinados, e por este motivo se desenvolve melhor no meio Stonebrink, onde o glicerol é substituído pelo piruvato de sódio. Para isolamento primário de *M. bovis* em meio a base de agar, recomenda-se uma pequena concentração de CO₂ (não superior a 5%) já que é considerado microaerófilo e demora de 24 a 40 dias para crescer. Diferem das demais bactérias em uma série de propriedades, muitas das quais estão relacionadas com a quantidade e tipos de lipídeos complexos que estes germes contêm na parede celular (KANTOR, 1979).

Também são características peculiares do *M. bovis* um período de geração longo, demandando de 16 a 20 horas. Dependendo da oferta de Oxigênio e de nutrientes. Possui estreita relação filogenética com o *Mycobacterium tuberculosis*, cujos genomas, ambos descritos por complexo, apresentam mais de 99,95% de similaridade. Esta última espécie de micobacteria, possui quase 250 genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos (KAUFANAM, 2001; GAMIER et al., 2003).

3.3 *Mycobacterium* no leite

Devido às suas características nutritivas, o leite é extremamente susceptível à contaminação por microrganismos podendo causar sérios danos à saúde do consumidor, sendo a tuberculose uma das principais doenças por ele veiculadas (ALVES, 2003).

O leite destinado ao consumo “in natura”, bem como para a produção de derivados comestíveis, deve ser propriamente pasteurizado segundo o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal – RIISPOA (BRASIL, 1952); exceção é feita apenas aos queijos com maturação acima de 60 (BRASIL, 1996) ou, no estado de São Paulo, 90 dias (SÃO PAULO, 1994).

Ressalta-se que 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.

Leite et al. (2003) analisaram *Mycobacterium* em 78 amostras de leite cru e 40 de pasteurizado e obtiveram: 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. kansaii*, 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. kansaii* 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.

Em um dos primeiros trabalhos sobre a resistência térmica do *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis*, Kells e Lear (1960) obtiveram redução completa do inóculo de 10^4 UFC/mL em 1,5 minuto de tratamento.

Sung e Collins (1998) calcularam o valor D (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 foi mais termotolerante do que o *M. bovis* e que poderia sobreviver à pasteurização rápida quando a concentração inicial de organismos fosse maior que 101 células por mililitro de leite, pois o $D_{71^\circ\text{C}}$ foi igual a 11,7 seg. No entanto, haveria maior segurança na pasteurização lenta, cujo valor $D_{65^\circ\text{C}}$ foi de 47,8 seg. Comparando o valor D foi maior no leite que no lactato, em todas as temperaturas estudadas, mostrando a importância do substrato na sobrevivência do agente.

Sung e Collins (1998) obtiveram valor $D_{65^\circ\text{C}}$ igual a 38,9 segundos para o *M. paratuberculosis* inoculado em leite já aquecido à 65°C. Ressaltam que a inoculação em substrato já aquecido à temperatura alvo, altera o resultado: quando inoculou *M. paratuberculosis* em substrato não aquecido, houve redução de 1 Log UFC/mL após 90 seg. a 71°C, mas quando a inoculação foi feita no substrato já aquecido à essa temperatura, houve redução de 6 Log UFC/mL nos 90 segundos.

O substrato também se mostrou importante na eficácia do tratamento térmico sobre *M. fortuitum*. Nishimoto (2006) e Starikoff (2006) trabalharam com em leite integral e desnatado oriundos, respectivamente, das espécies bovina e caprina, e os dados mostram que a eficiência da pasteurização do leite é influenciada pelo teor de gordura e pela espécie de origem.

Pearce et al. (2001) estudaram também a sensibilidade térmica do *M. paratuberculosis* (10^3 UFC/mL) em leite submetido à 63, 66, 69 e 72°C/15seg em fluxo

turbulento. Não houve sobreviventes à 72°C e o valor $D_{63^\circ\text{C}}$ foi de 15 seg. e o valor $D_{72^\circ\text{C}}$ extrapolado foi inferior a 2,03 seg.

McDonald et al. (2005) realizaram uma avaliação quantitativa da letalidade da pasteurização sobre *M. paratuberculosis* em leite. Testaram 20 partidas de leite contaminadas com 10^3 a 10^4 UFC/mL, submetidas aos binômios 72°C/15 seg., 75°C/25 seg. e 78°C/15 seg. A redução obtida foi >4 UFC/mL em 14% dos testes e >6 Log UFC/mL em 85% deles.

Grant et al. (2005) usaram uma planta comercial piloto de pasteurização rápida para avaliar a viabilidade do *M. paratuberculosis* em leite com 10^1 a 10^5 cels/mL (com e sem a tecnologia de homogeneização). Em 96,7% das amostras (n=816) pasteurizadas houve inativação completa do inoculo. Os resultados sugeriram, segundo os autores, que a homogeneização desagrupa as micobactérias, o que explicaria a maior inativação.

3.4 Pasteurização

Segundo o RIISPOA, a pasteurização consiste no aquecimento do leite para eliminar os microrganismos patogênicos que, eventualmente, estejam presentes e reduzir a microbiota deteriorante, alterando o mínimo possível as diástases do leite. Os binômios aprovados para o leite são: 62 a 65°C por 30 minutos (pasteurização lenta) ou 72 a 75°C por 15 a 20 segundos (rápida) e ambos devem resultar em enzima fosfatase alcalina negativa e peroxidase positiva, garantindo que o binômio tempo e temperatura de processo foram respeitados.

Os parâmetros de pasteurização do leite basearam-se na resistência térmica do *Mycobacterium* spp e da *Coxiella burnetti*. O primeiro padrão, estabelecido em 1924,

indicava que o aquecimento a 61,1°C por 30 minutos eliminava o *M. tuberculosis* (NORTH; PARK, 1927), porém, mais tarde verificou-se que a *Coxiella burnetti* sobrevivia a 61,7°C/30 minutos (HUEBNER et al., 1949); tal fato determinou o aumento da temperatura para 62,8°C/30 minutos como padrão oficial nos Estados Unidos (STABEL, 2003).

O tratamento térmico para ser eficaz não depende somente do tempo e da temperatura empregados, mas também de outros fatores que afetam a morte térmica dos microrganismos, como a carga microbiana inicial, a atividade de água, pH, NaCl, proteínas e porcentagem de gordura dos produtos (CHHABRA et al., 1999).

As teorias sobre o aumento da resistência térmica dos microrganismos em produtos com elevado teor de gordura relacionam-se à baixa condutividade térmica ou à reduzida atividade de água na porção gordurosa (CHHABRA et al., 1999).

Quanto maior a quantidade de microrganismos, 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 (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Ainda que a legislação brasileira determine que todo o leite para ser comercializado ou industrializado, deva ser pasteurizado (BRASIL, 1998), nota-se, a partir do início da década de 90 o crescimento do chamado “leite informal”, produto comercializado sem qualquer tipo de inspeção oficial e que não possui nenhuma garantia que sofreu processos de eliminação de agentes patogênicos. É importante salientar, também, a participação dos queijos dentro do mercado informal, geralmente fabricados com leite cru, particularmente o queijo tipo minas frescal, minas meia cura,

minas curado, queijo coalho, ricota e mussarela (OLIVAL, 2002); com exceção da mussarela, não há, nos outros queijos, nenhuma etapa que possa reduzir ou eliminar a eventual carga de bacilos presentes no leite.

Segundo Behmer (1991) os tratamentos térmicos aplicados ao leite foram organizados para serem suficiente para destruição do bacilo de Koch (*Mycobacterium*), que é um dos germes patogênicos mais resistentes, sem, contudo, modificar os componentes do leite.

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).

Quando a pasteurização é propriamente realizada, à temperatura e tempo convenientes, os germes são destruídos na proporção de 99,98% (BEHMER, 1991), o que corresponde a uma destruição de aproximadamente 4 ciclos logarítmicos. Entretanto, essa estimativa não considera nem as variações de resistência térmica de cada agente, nem a influência do substrato.

Historicamente, com a pasteurização, diminuíram os relatos de doenças transmitidas pelo leite e seus derivados, como brucelose, tuberculose, difteria, febre Q e uma série de gastroenterites. Contudo, deve ser ressaltado que embora altamente efetivo no controle de doenças de origem alimentar, o tratamento térmico é insuficiente se não complementado com padrões de higiene, desde a produção até o completo

processamento (SHARP, 1987). O fato de os países em desenvolvimento ainda apresentarem taxas significativas de consumo de leite cru ou de produtos preparados com leite não pasteurizado também é preocupante (ACHA; SZYFRES 1986).

Compreende-se por pasteurização, segundo a legislação brasileira, o emprego conveniente do calor, com o fim de destruir totalmente a flora microbiana patogênica sem alteração sensível da constituição física e do equilíbrio do leite, sem prejuízo de seus elementos bioquímicos, assim como de suas propriedades organolépticas normais, o controle do processo deve ser confirmado pelas enzimas fosfatase alcalina e peroxidase, que devem resultar, respectivamente, negativa e positiva no leite pasteurizado (BRASIL, 1952).

A população de microrganismos em um determinado ambiente submetido a um estresse térmico apresenta um decréscimo exponencial em relação ao tempo dessa exposição. Para usufruir desse comportamento, normalmente se representa a variação da população em um gráfico semi-logarítmico, onde na ordenada se registra o número de microrganismos sobreviventes e na abscissa o tempo de aquecimento. No gráfico resultante se identifica a distribuição de valores que apresentem o maior coeficiente de correlação com uma reta para selecionar a redução de um ciclo logarítmico dos microrganismos sobreviventes (em log), e projetando-os ao eixo referente ao tempo, encontra-se o valor D; esse valor numérico é de alta relevância para a análise de risco, possibilitando calcular o nível de segurança conferido ao produto submetido a um processamento térmico (TEIXEIRA NETO, 2000).

Comparando a resistência térmica de micobactérias, Pavlas (1990), reporta que o *M. bovis* é mais sensível ao calor (o inóculo foi desvitalizado em 2 minutos a 65°C)

que as outras micobactérias (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. gordonae*). Em contraposição, Jay (1992) e Grant, Ball e Rowe (1996) relataram que o *M. fortuitum* mostrou ser mais termosensível que *M. avium*, *M. bovis*, *M. intracellulare* e *M. kansasii*.

Segundo McFadden (1992), um fator que influencia na resistência térmica de muitas micobactérias é a formação de grumos em meios líquidos, devido à natureza hidrofóbica da sua parede celular. Outro aspecto importante é a diferença nos padrões de formação dos 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; BALL; ROWE, 1996).

Leite et al. (2003) pesquisaram a presença de micobactérias em 78 amostras de leite cru, 40 amostras de leite pasteurizado (71,7°C por 15 segundos), e 10 amostras de leite esterilizado pelo processo UHT (150°C por 2 segundos). Foram encontradas micobactérias em 23 das 128 (18%) amostras de leite, distribuídas da seguinte forma: no leite cru, foram encontradas 1 (1,3%) *M. bovis* e 13 (16,7%) micobactérias de crescimento rápido, sendo 4 (30,8%) identificadas como *M. fortuitum*; no leite pasteurizado, foram encontradas 9 (22,5%) micobactérias de crescimento rápido, sendo 2 (22,2%) identificadas como *M. fortuitum*. No leite esterilizado não foram isoladas micobactérias.

Em 2002, Lund, Gould e Rampling fizeram uma revisão crítica sobre as informações relacionadas com a resistência térmica do *M. avium* subsp. *paratuberculosis* no leite em relação às condições de pasteurização. E ressaltaram que as diferenças nos resultados obtidos por vários autores (que variaram de <2 reduções

decimais à >10 , considerando $63^{\circ}\text{C}/30\text{min}$), podem estar relacionadas aos fatores: a) características do agente (natureza hidrofóbica, formação de grumos); b) tratamento do inóculo (congelamento prévio, utilização ou não de substância para quebra de grumos na suspensão); c) método de pasteurização (tubo teste, tubo selado submerso, tubo capilar, tempo requerido para atingir a temperatura desejada); d) meio de cultura para a contagem, entre outros; Sung e Collins (1998) relataram diferenças devido ao método de quantificação.

O *M. paratuberculosis* suscitou, ainda, a preocupação com a sua inativação por processamentos não térmicos, como mostram Sung e Collins (2000) que, após contaminarem o leite pasteurizado com para fabricação de queijo branco macio (tipo hispânico) curado por 60 dias a 4°C , observaram que o valor $D_{4^{\circ}\text{C}}$ no queijo foi de 59,9 dias. Assim, se produzido com leite cru, com contaminação acima de 1 log UFC/ml, a cura do queijo não garantiria adequada margem de segurança.

Foram publicadas relativamente poucas pesquisas sobre a resistência térmica das micobactérias, incluindo o *Mycobacterium bovis* (NORTH; PARK, 1927; GRANT; BALL; ROWE, 1996; GRANT et al., 1996; LUND; COLLINS, 1998, 2000; GOULD; RAMPLING, 2002; STABEL, 2001, 2003; SUNG;). Nota-se que os estudos realizados com *M. bovis* são mais antigos e realizados fora do Brasil. A cinética de morte térmica desse agente não foi mais testada para avaliar se as cepas atualmente circulantes apresentam o mesmo comportamento e, conseqüentemente, se os binômios de pasteurização aprovados continuam a conferir o mesmo nível de segurança ao leite.

3.5 LEGISLAÇÃO

No Brasil, a primeira lei do setor sanitário data de 1808 (coincidindo com a vinda da Família Real). A legislação sobre alimentos inicia-se em 1906, com a criação do Ministério dos Negócios da Agricultura, Indústria e Comércio, tendo como objetivo primordial o estudo e a normatização de todo e qualquer assunto relacionado à indústria de produtos de origem animal. O marco histórico mais significativo do Serviço de Inspeção Federal foi a promulgação da Lei nº. 1.283, em 18 de dezembro de 1950 e sua regulamentação em 1952 (GERMANO; GERMANO, 2001).

Já em 1969, o Decreto Lei Federal nº. 923, de 10 de outubro, proibia a venda de leite cru para consumo direto da população, em todo o território nacional, podendo ser permitida, em caráter revogável, nas localidades que não pudessem ser abastecidas, permanentemente, com leite beneficiado.

Decreto Federal nº. 66.183, de 5 de novembro de 1970, que regulamenta o referido Decreto Lei, dispõe que a autoridade local competente inutilizará para consumo humano os leites crus cuja distribuição contrariar suas normas, sem prejuízo das sanções penais aplicáveis ao infrator.

No entanto, existem diversos estudos relatando o vasto comércio de produtos de origem animal, tanto cárneos quanto lácteos, informalmente produzidos e, via de regra, em condições higiênico-sanitárias questionáveis, podendo expor a saúde pública a elevados riscos de contrair doenças (GERMANO, 1991; BADINI et al., 1996; FARINA, 2000; SANTOS; VILELA, 2000; PONSANO et al., 2001 OLIVAL et al., 2002).

A responsabilidade pela fiscalização das propriedades rurais, das indústrias e do transporte dos produtos de origem animal está a cargo das divisões responsáveis pela agricultura na União, nos Estados e nos Municípios enquanto que a fiscalização nas casas atacadistas e nos estabelecimentos varejistas é de competência dos órgãos da Saúde, ou seja, dos departamentos responsáveis pela Vigilância Sanitária. Nenhum estabelecimento industrial ou entreposto de produtos de origem animal pode funcionar, no país, sem que seja previamente registrado no órgão competente para a fiscalização de sua atividade (BRASIL, 1989).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Leite UHT integral foi contaminado com *Mycobacterium bovis* (isolado de bovinos abatidos no Estado de São Paulo) e submetido ao tratamento térmico em Banho Maria a 75°C por até 25 segundos. Foram testados 5 espoligotipos, com três repetições de cada.

4.1 Estirpes testadas

Os espoligotipos de *Mycobacterium bovis* provieram do projeto “Abatedouros como instrumento de rastreabilidade de focos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo. Mapeamento e Epidemiologia Molecular” (Processo Fapesp: 99/12732-7), no qual os isolados foram discriminados pela técnica de *Spoligotyping* (HERMANS et al. 1991), o que permitiu a organização das estirpes em 19 diferentes espoligotipos de *M. bovis*, 11 dos quais nunca descritos na literatura internacional (ROSALES et al. 2003). Dentre os 19 identificados, foram testados os seguintes espoligotipos:

- 1) SB0121 - por ter sido o mais prevalente naquele estudo;
- 2) SB0295 - por ter sido o segundo mais prevalente e por ter apresentado uma distribuição espacial agrupada;
- 3) SB0120 - por ter sido a mais difundida espacialmente;
- 4) SB0881 - por ter apresentado um pequeno grau de homologia no dendograma;
- 5) BR24 - por ser o espoligotipo novo mais prevalente.

4.2 Obtenção do inóculo

Foram utilizadas culturas de *Mycobacterium bovis* cultivadas por 10 dias (36°C) em meio Stonebrink. Com uma haste de plástico transferiu-se 0,300g da cultura para um cadinho. Essa massa foi vigorosamente macerada com 0,5 mL de solução salina 0,85% com 0,05% de solução Tween 80 e depois foram adicionados mais 11,5 mL de solução salina 0,85%, totalizando 12mL de inóculo. Esse inóculo foi transferido para um frasco shott com pérolas de vidro para prevenir a formação de grumos (Figura 1).

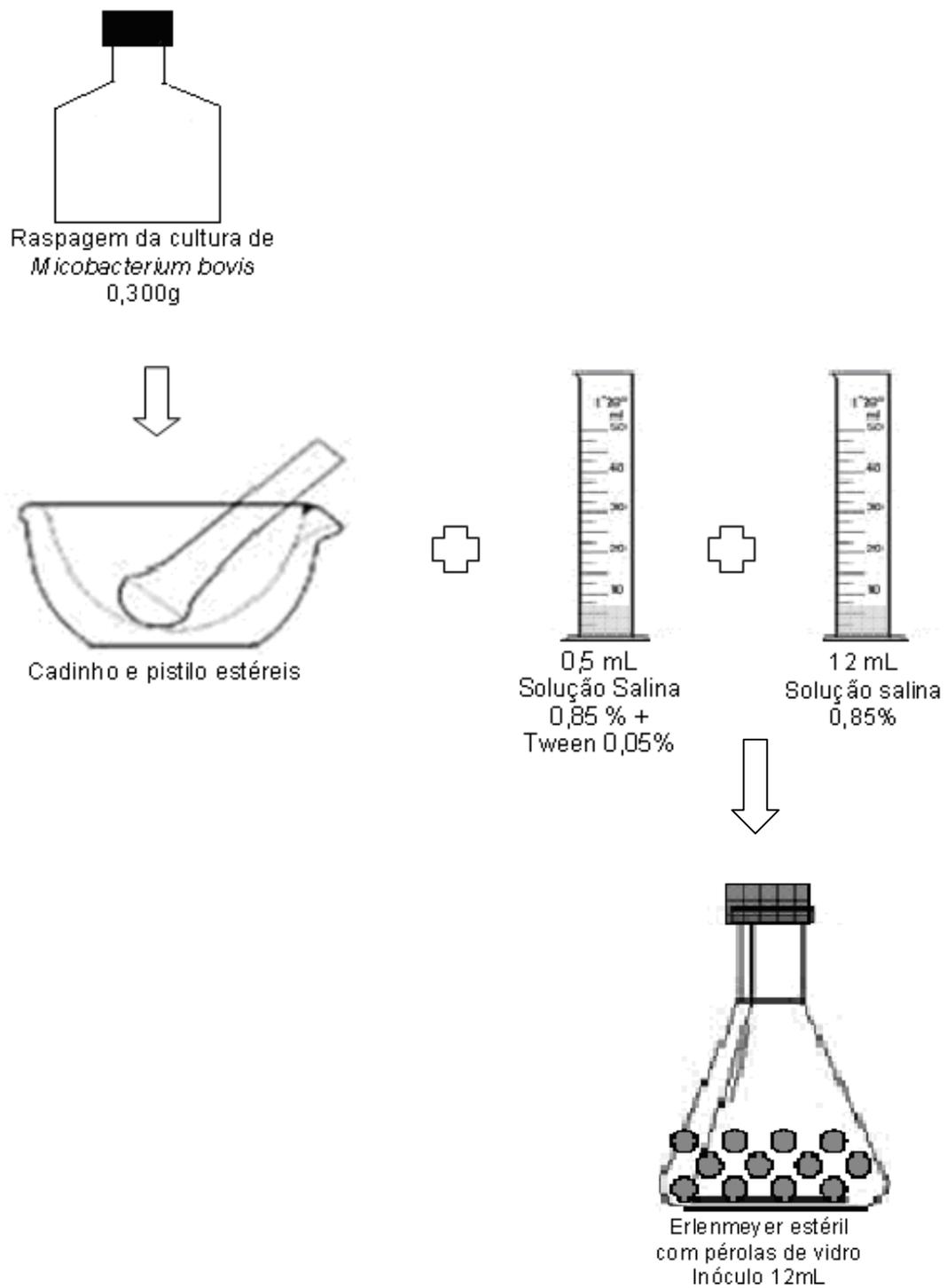


Figura 1- Obtenção do inóculo de *Mycobacterium bovis* empregado na contaminação do leite

4.3 Contaminação do leite

Utilizou-se 2 mL do inóculo para contaminar 25 mL de leite UHT integral, em frasco Shott de 250 mL. O leite contaminado foi distribuído em 7 tubos (16x160mm), sendo 5mL em cada. Os tubos foram identificados como 0, 5, 10, 15, 20 e 25, correspondendo ao tempo em segundos que sofreriam o tratamento térmico, e o sétimo tubo foi denominado “controle da contaminação do leite”. Todo procedimento de manipulação do inóculo e do leite foi realizado em fluxo laminar previamente descontaminado com hipoclorito de sódio e seguido de luz ultravioleta por aproximadamente 30 minutos (Figura 2).

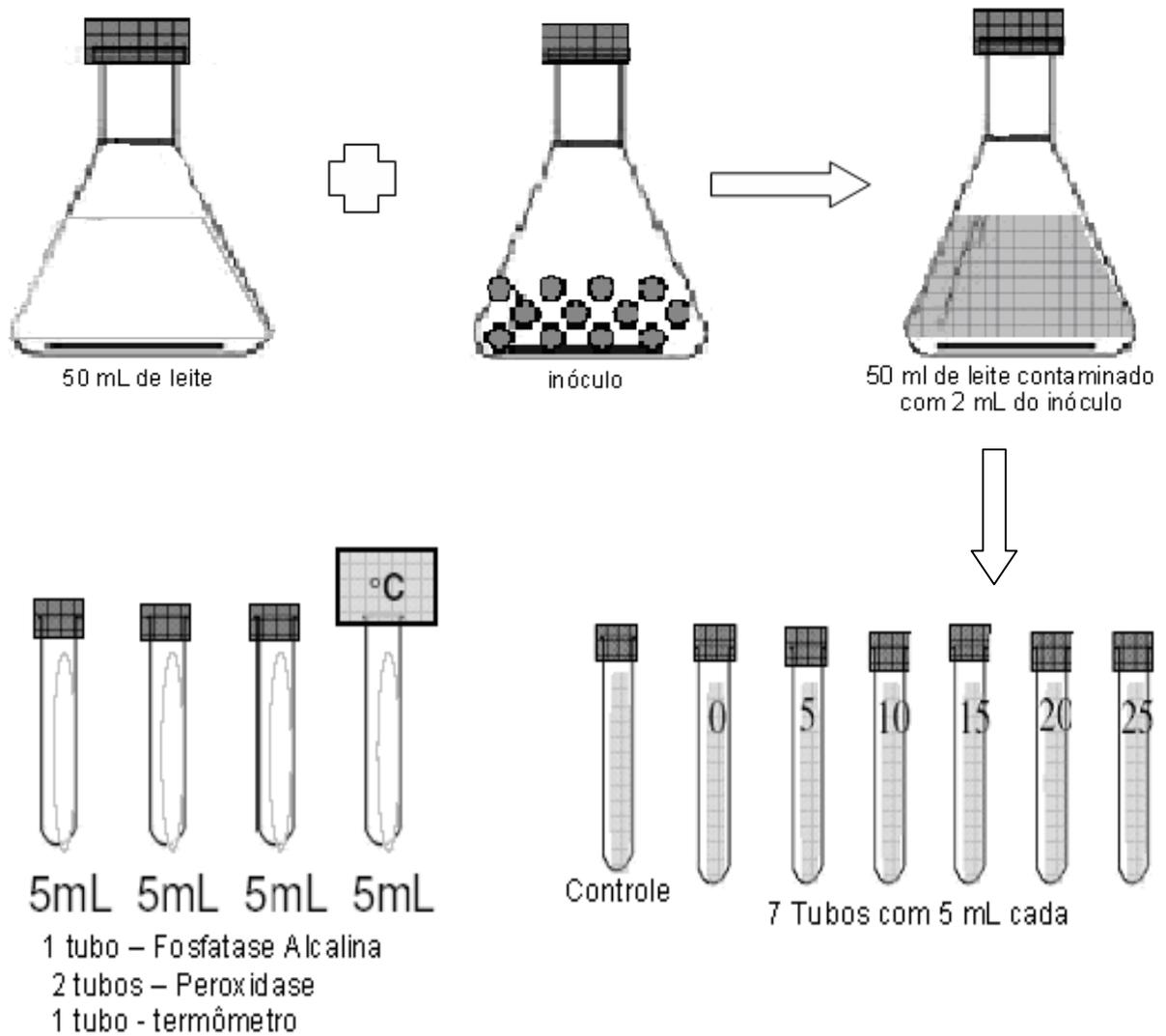


Figura 2 - Esquema de contaminação do leite e distribuição nos tubos para análise

4.4 Tratamento térmico

Os 6 tubos identificados com os números 0, 5, 10,15, 20 e 25 foram colocados no Banho Maria. Com o intuito de agilizar o procedimento, inicialmente foi empregado um banho-maria à 85°C, por 1 minuto e 45 segundos, até que o leite atingisse os 75°C desejados. Nesse momento, o tubo 0 foi resfriado em banho de gelo e os outros tubos foram transferidos para outro banho-maria, à 75°C, para manutenção da temperatura. Esses tubos foram retirados aos 5, 10, 15, 20 e 25 segundos de tratamento a 75°C e colocados em banho de gelo para cessar o efeito térmico sobre as células.

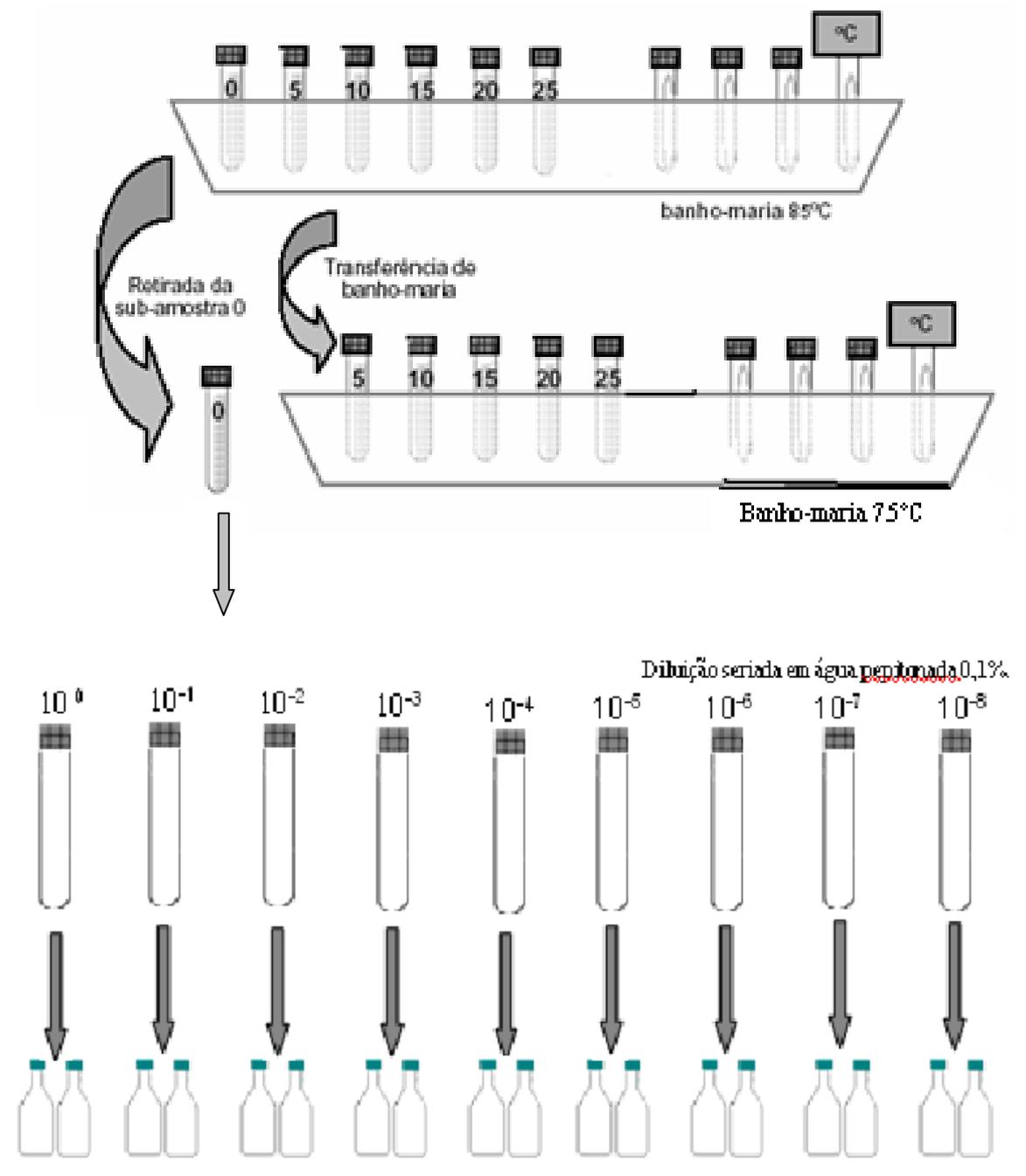
4.5 Controle do processo de pasteurização

Para verificar a propriedade com que o tratamento térmico foi realizado, foram empregados 4 tubos com 5mL de leite cru não inoculado. A um dos tubos foi acoplado um termômetro, tomando-se o cuidado para que o bulbo não tocasse as paredes do tubo, para controlar a temperatura do leite durante o processo; esse tubo acompanhou as amostras até o final do processo. As outras três amostras de leite foram empregadas para pesquisa das enzimas fosfatase alcalina (Laborclin®) e peroxidase (BRASIL, 1981) ao completar 20 segundos de tratamento, tempo regulamentar máximo da pasteurização rápida.

4.6 Diluição e semeadura das amostras

As amostras foram submetidas à diluição decimal seriada, em água peptonada 0,1%, até 10^{-8} . Após homogeneização vigorosa com auxílio do vórtex por 10 segundos, 0,1mL de cada diluição foi semeado, em duplicata, na superfície do meio Stonebrink-Leslie (garrafa) que foram incubados a 37°C/45dias.

O meio de cultura Stonebrink-Leslie foi preparado segundo a técnica do Centro Panamericano de Zoonoses (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSES, 1985).



0,1 ml de cada diluição, semeados em duplicata em meio Stonebreik-lesli. Incubação a 37°C.

Figura 3 - ilustração dos procedimentos de pasteurização, diluição e sementeiras das sub-amostras

4.7 Contagem e registro das colônias

A diluição de eleição foi aquela que apresentou entre 10 e 150 colônias. Foi feita a média aritmética das UFC da duplicata e o resultado foi multiplicado por 10 (correção da alíquota semeada = 0,1mL) e pelo inverso da diluição, o resultado foi transformado em Log₁₀ e expresso como Log das UFC/mL de leite.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos na contagem de colônias (Log UFC/ml) nos diferentes momentos da pasteurização estão contidos na tabela 1. Ressalta-se que todas as repetições dos tratamentos térmicos apresentaram resultado negativo para a enzima fosfatase alcalina e positivo para a peroxidase, demonstrando que os processos térmicos atenderam os parâmetros oficiais para a pasteurização do leite.

Tabela 1 – Sobrevivência (Log UFC/mL) das 5 espoligotipos de *Mycobacterium bovis* isolados de campo) submetidas a 75°C por 25 segundos em leite integral experimentalmente contaminado - São Paulo – ago-2008 - ago/2009

espoligotipo	repetição	controle log UFC/mL	0 seg. log UFC/mL	5 seg. log UFC/mL	10 seg. log UFC/mL	15 seg. log UFC/mL	20 seg. log UFC/mL	25 seg. log UFC/mL
SB0881	1	7,2	3,3	3,1	3,3	3,4	3,5	3,2
	2	7,2	3,4	3,1	3,3	3,4	3,4	2,8
	3	7,2	3,2	3,3	3,1	3,1	3,4	3,0
	Média	7,2	3,3	3,1	3,2	3,3	3,4	3,0
SB0120	1	8,4	3,6	2,9	3,8	3,9	2,8	4,8
	2	8,4	3,3	2,6	3,1	2,7	2,9	1,2
	3	8,4	3,4	2,4	3,8	3,9		3,7
	Média	8,4	3,4	2,6	3,6	3,5	2,9	3,2
SB0121	1	7,5	4,1	3,7	3,9	3,4	3,6	3,8
	2	7,5	3,7	3,6	3,8	4,0	3,7	3,6
	3	7,5	4,4	3,9	3,9	3,2	3,7	3,9
	Média	7,5	4,1	3,7	3,9	3,5	3,7	3,8
SB0295	1	7,6	3,6	3,9	3,6	3,7	3,1	3,4
	2	7,6	3,5	3,2	3,6	3,6	3,8	3,5
	3	7,6	3,5	3,3	3,7	3,5	3,7	3,6
	Média	7,6	3,5	3,4	3,6	3,6	3,5	3,5
BR024	1	7,7	5,5	5,7		4,4	5,6	4,2
	2	7,8	4,3	5,2	4,5	4,2	5,4	4,5
	3	7,8	5,1	5,5	4,6	4,5	2,2	2,9
	Média	7,8	5,0	5,5	4,5	4,4	4,4	3,9

A eficácia do tratamento térmico pode ser observada na tabela 2 onde se apresentam os resultados (em log UFC/mL) da redução média obtida durante cada etapa: aquecimento, tratamento térmico propriamente dito (75°C/20 seg.) e o processo completo. Depreende-se desta tabela que a fase de aquecimento (1 minuto e 45 segundos) foi a etapas mais eficaz na redução dos 5 espoligotipos testados. Além disso, nota-se que a cepa SB0120 revelou-se mais sensível ao processo térmico estudado, mostrando uma redução total de 5,5 Log UFC/mL. Já a cepa BR024 mostrou-se a mais resistente, reduzindo 3,4 Log UFC/mL ao final do tratamento.

Tabela 2 - Redução média (em Log UFC/mL) de *Mycobacterium bovis* (cinco espoligotipos isolados do campo) em leite integral, durante o processo de pasteurização rápida mimetizado em banho-maria - São Paulo ago-2008 - ago-2009

Espoligotipos	Redução durante o aquecimento	Redução durante os 20 seg. à 75°C	Redução devido ao processo completo
SB0881	3,9	-0,2	3,8
SB0120	5,0	0,6	5,5
SB0121	3,5	0,4	3,9
SB0295	4,1	0,0	4,1
BR024	2,8	0,6	3,4

6 DISCUSSÃO

Existem poucos trabalhos que descrevem a cinética de morte térmica das micobactérias, em especial do *Mycobacterium bovis*. Não foram encontrados dados sobre resistência térmica de *Mycobacterium bovis* no Brasil.

Em um dos primeiros trabalhos sobre a resistência térmica do *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis*, Kells e Lear (1960) construíram a curva do tempo de morte térmica do agente para o cálculo do valor de Z. Os autores não informam o valor de D encontrado, contudo, com base nos dados apresentados, pode-se inferir que o valor de $D_{61,6^{\circ}\text{C}}$ tenha sido de 22,5 segundos (porque em 1,5 minuto houve redução de 4 ciclos logarítmicos do agente). No entanto, o artigo não esclarece se a carga inicial relatada (10^4 UFC/mL) referia-se ao leite logo após a contaminação ou quando o leite atingiu a temperatura desejada de $61,6^{\circ}\text{C}$. Isso é fundamental para entender a diferença entre os resultados por eles obtidos e aqueles ora relatados.

Vários outros autores também registraram inativação completa de inóculo de *Mycobacterium* spp em seus experimentos. Grant et al. (1998) não observaram nenhum *M. bovis* ou *M. fortuitum* sobrevivendo a $63^{\circ}\text{C}/30$ minutos, empregando uma contaminação inicial de 10^7 CFU/mL.

Pearce et al. (2001) estudaram a sensibilidade térmica do *M. paratuberculosis* (10^3 UFC/mL) em leite submetido à 63, 66, 69 e $72^{\circ}\text{C}/15$ seg em fluxo turbulento. Não houve sobreviventes à 72°C e o valor $D_{63^{\circ}\text{C}}$ foi de 15 seg. e o valor $D_{72^{\circ}\text{C}}$ extrapolado foi inferior a 2,03 seg.

McDonald et al. (2005) realizaram uma avaliação quantitativa da letalidade da pasteurização sobre *M. paratuberculosis* em leite. Testaram 20 partidas de leite contaminadas com 10^3 a 10^4 UFC/mL, submetidas aos binômios 72°C/15 seg., 75°C/25 seg. e 78°C/15 seg. A redução obtida foi >4 UFC/mL em 14% dos testes e >6 Log UFC/mL em 85% deles.

Grant et al. (2005) usaram uma planta comercial piloto de pasteurização rápida para avaliar a viabilidade do *M. paratuberculosis* em leite com 10^1 a 10^5 cels/mL (com e sem a tecnologia de homogeneização). Em 96,7% das amostras (n=816) pasteurizadas houve inativação completa do inóculo. Os resultados sugeriram, segundo os autores, que a homogeneização desagrupa as micobactérias, o que explicaria a maior inativação.

Ao contrário da literatura, não houve nesta pesquisa redução da contagem do agente para níveis abaixo do detectável (<10 UFC/mL) após a pasteurização, em nenhuma das repetições.

Resultados de pesquisa com *M. fortuitum* (NCTN 8573) também não tiveram inativação completa do inóculo a 65°C/30min. em leite de vaca e cabra, integral ou desnatado. Nishimoto (2006) obteve redução do agente, considerando o processo completo, entre 3,3 e 4,6 Log UFC/mL em leite de vaca integral. Starikoff (2006) observou reduções na mesma ordem de grandeza em leite integral de cabra (entre 3,7 e 5,0 Log UFC/mL em leite de vaca integral).

No entanto, os padrões de morte observados por esses autores diferem dos que são aqui reportados. Em leite integral de vaca, Nishimoto (2006) observou que a taxa de morte foi equivalente entre as etapas de aquecimento e o tratamento térmico propriamente dito. Considerando o leite bovino desnatado (Nishimoto, 2006) e os leites

caprinos integral e desnatado (Starikoff, 2006), os dados são opostos aos encontrados na presente pesquisa; houve pouca redução do *M. fortuitum* (NCTN 8573) durante a fase de aquecimento; portanto, o tempo de exposição à 65°C foi o principal responsável pela eficácia final do processo.

A diferença no padrão de inativação observado entre os trabalhos é muito interessante porque esses autores empregaram um sistema de trabalho muito semelhante ao que foi empregado na presente pesquisa. Excetuando a temperatura de processo e a espécie de micobactéria testada, toda a metodologia foi reproduzida.

Não se calculou o valor $D_{75^{\circ}\text{C}}$ neste estudo porque houve pouca redução dos agentes testados durante os 25 segundos em que a amostra permaneceu à 75°C.

Sung e Collins (1998) calcularam o valor D (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 foi mais termotolerante do que o *M. bovis* e que poderia sobreviver à pasteurização rápida quando a concentração inicial de organismos fosse maior que 10^1 células por mL de leite, pois o $D_{71^{\circ}\text{C}}$ foi igual a 11,7 seg., no entanto, haveria maior segurança na pasteurização lenta, cujo o valor $D_{65^{\circ}\text{C}}$ foi de 47,8 seg. Comparando o valor D foi maior no leite que no lactato, em todas as temperaturas estudadas, mostrando a importância do substrato na sobrevivência do agente.

Sung e Collins (1998) obtiveram valor $D_{65^{\circ}\text{C}}$ igual a 38,9 segundos para o *M. paratuberculosis* inoculado em leite já aquecido à 65°C. Ressaltam que a inoculação em substrato já aquecido à temperatura alvo, altera o resultado: quando inoculou *M. paratuberculosis* em substrato não aquecido, houve redução de 1 Log UFC/mL após 90 seg. a 71°C, mas quando a inoculação foi feita no substrato já aquecido à essa temperatura, houve redução de 6 Log UFC/mL nos 90 segundos.

Deve-se ter em mente que os resultados encontrados nesta pesquisa não são suficientes para estabelecer a resistência de *M. bovis* isolado de campo à pasteurização rápida. Os achados desse estudo apenas enfatizam a necessidade de ampliar esse tipo de estudo, especialmente porque dados disponíveis na literatura foram obtidos em condições diversas às da presente pesquisa, como a cepa empregada, a carga inicial, o sistema de tratamento térmico, os métodos de quantificação do agente, o meio de cultura para recuperação do agente, etc., dificultando a compreensão das diferenças observadas nos resultados.

No entanto, os resultados deste estudo permitem especular que no pior cenário de contaminação natural do leite (10^4 UFC/mL, de acordo com BALL, 1943) pelo espoligotipo BR024 a pasteurização pode não determinar a redução necessária para garantir a segurança do consumidor. Assim, sugere-se um aprofundamento desse tipo de estudo para avaliar a reprodutibilidade dos resultados. Sugere-se, ainda, com base na curva de morte observada nesta pesquisa que não há necessidade da análise em tempos intermediários, durante o tratamento térmico, assim podem-se estudar as fases de aquecimento e tratamento propriamente dito.

7 CONCLUSÕES

A fase de aquecimento foi mais eficaz na redução do *M. bovis* isolado de campo do que a fase de tratamento térmico propriamente dito (20 segundos a 75°C).

Houve diferença na resistência térmica entre os espoligotipos testados e o BR024 foi o mais resistente.

O processo completo da pasteurização rápida, nas condições do estudo, foi capaz de reduzir entre 3,4 e 5,5 Log UFC/mL dos espoligotipos testados.

REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis **y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2. ed. Washington: Organización Científica. Panamericana de la Salud, 1986. p. 174-185. (Publicación Científica, 503).
- ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. A importância do leite de cabra na nutrição humana. **Registro da Agropecuária Catarinense**, p. 05. 2003.
- ANTUNES, J. L. F.; MORAES, M. de; BIAZEVIC, M. G. H.; WALDMAN, E. A.; CORRÊA, M. O. A. Tuberculose e leite: elementos para a história de uma polêmica. **História, Ciências, Saúde — Manguinhos**, v. 9, n. 3, p. 609-623, 2002.
- BADINI, B. B.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L. A.; GERMANO P. M. L. Risco à saúde representado pelo leite cru comercializado clandestinamente. **Revista de Saúde Pública**, v. 30, n. 6, dez. 1996. Disponível em : http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003489101996000600009&In.. Acesso em: 15 fev. 2009.
- 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 e 109.
- BELCHIOR, F. Caprino cultura busca representatividade. **Revista Leite e Derivados**, n. 71, p. 54 – 63, 2003. Disponível em : http://www.depemar.com.br/LEITE/71/materis_capa.leite.htm. Acesso em : 18 jan. 2009.
- BERNABÉ, A.; GÓMEZ, M. A.; NAVARRO, J. A.; GÓMEZ, S.; SÁNCHEZ, J.; SIDRACH, J.; MENCHEN, V.; VERA, A.; SIERRA, M. A. Morphopathology of caprine tuberculosis II. Tuberculosis generalizada. **Annales de Veterinária de Murcia**, v. 6/7, p. 21-29, 1991.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. **Métodos analíticos para o controle de produtos de origem animal e seus ingredientes** : Métodos Físico-químicos. Brasília, DF, 1981.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989. Dispõe sobre a inspeção sanitária e industrial dos produtos de origem animal, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 nov. 1989. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/sda/imagens/lei7889.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento Secretaria de Defesa Agropecuária Lei nº 9.712 de 20 de novembro de 1998. Alteram a Lei nº 8.171 de 17 de janeiro de 1991, acrescentando-lhe dispositivos referentes à defesa agropecuária. 1998. Disponível em <http://www.lei.adv.br/9712-98.htm>. Acesso em: 20 fev. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria **146 de 7 de março de 1996**. Regulamento técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos (Creme de Leite, Queijos entre outros). 1996 Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>. Acesso em: 25 fev. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria 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**, n. 07, Brasília, 12 jan. 2004. Seção 1, p. 06-10.

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

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

COVISI, O.; GRANGE, J. M.; DABORN, C. J.; RAVIGLIONE, M. C.; FUJIKURA, T.; COUSINS, D.; ROBINSON, R. A.; HUCHZERMAYER, H. F. A. K.; KANTOR, I.; MESLIN, F. X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerging Infectious Diseases**. v. 4, n. 1, p. 59-70, 1998.

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

DUNLOP, R. H.; WILLIAMS, D. J. **Veterinary medicine: an illustrated history** 1996.

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**. Local: Atheneu, 1996 p. 111-115.

FREITAS, J. A.; PANETTA, J. C.; CURCIO, M.; UEKI, S.Y. M. Isolamento de cepas de *Mycobacterium avium* em búfalo abatido para consumo. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 3, p. 315-317, 2001.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. 629 p.

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

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.; 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, 2005.

HIJJAR, M. A. Inquérito de resistência as drogas utilizadas no tratamento da tuberculose no Brasil. In: CONGRESSO MUNDIAL DE SAÚDE PÚBLICA, 11, 2006, Rio de Janeiro – Brasil.

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, n. p.499-511, 1949.

JAY, J. M. High temperature food preservation and characteristics of thermophilic microorganisms. **Modern food microbiology**. 4th ed. New York: Chapman & Hall.1992 p. 335-355.

KANTOR, I. N. Bacteriologia de la tuberculosis. **Centro Panamericano de Zoonosis**, n. 11, p. 63, 1979.

KANTOR, I. N.; RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and Caribbean: current status, control and eradication programs. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1/2, p. 5 - 14, 1994.

KAUFMANN, S. H. E. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nature Reviews Immunology**, v. 1, n. p. 20 – 30, 2001.

KEELS, 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.

KLEEBERG, H. K. Tuberculosis humana de origen bovino y salud publica. **Rev.Sci.Tech. Off. Int. Epiz.**, v. 3, n. p. 55-76, 1984.

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

LANGENEGGER, J.; LANGENEGGER, C. H.; P.M.P.C.; LEITE, R.C. Reações inespecífica no diagnóstico da tuberculose Bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 1, n. 4, p. 145, 1981.

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, **Memoria Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p. 319 – 323, 2003.

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

LUND, B. M.; GOULD, G. W.; RAMPLING, A. M. Pasteurization of milk and the heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: a critical review of the data. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, n. p. 135-145, 2002.

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**, v. 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, p. 3070-3073, 1992.

MONAGHAN, M. L.; DOHERTY, M. L.; COLLINS, J. D.; KAZDA, J. F.; QUINN, P. J. The tuberculin test. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. p. 111 - 124, 1994.

NISHIMOTO, E. J. Efeito da gordura do leite de vaca sobre o valor de $D_{65^{\circ}\text{C}}$ do *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573). 2006. 81 f. Dissertação 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, n. p. 147-173, 1927.

OLIVAL, A. A.; SPEXOTO, A. A.; CAMPOS, D. F. S.; FERREIRA, F.; FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V.; DIAS, R. A. Hábitos de consumo do Leite Informal, associados ao risco de transmissão de doenças, no município de Pirassununga, SP. **Higiene Alimentar**, v. n. 102/103, p. 35-40, 2002.

PAVLAS, M. Thermoresistance of Mycobacteria. **Acta Veterinaria Brunensis**, v. 59, n. p. 65-71, 1990.

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

PRITCHARD, D.G. A century of bovine tuberculosis 1888 – 1988: conquest and controversy. **Journal of Comparative Pathology**, v. 99, n. p. 356 - 397, 1988.

ROXO, E. Tuberculose bovina: revisão. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 2, p. 91 - 97, 1996.

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

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. **Resolução SAA 24 de 01 de agosto de 1994**. Normas Técnicas sobre as Condições Higiênico-Sanitárias Mínimas Necessárias para a Aprovação, Funcionamento e Re-aparelhamento dos Estabelecimentos de Produtos de Origem Animal. 1999. Disponível em: <http://www.cda.sp.gov.br/www/legislacoes/index.php#>>. Acesso em: 12 jul. 2006.

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

STABEL, J. R. Effective methods for postharvest intervention in dairy processing. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. p. 10-15, 2003.

STARIKOFF, K.R. Efeito da gordura do leite de cabra sobre o valor $D_{65^{\circ}\text{C}}$ do *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573). 2006. 83f. Dissertação mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SUNG, N.; COLLINS, M. T. Effect of thee factors in chesse production (ph, salt and heat) on *Mycobacterium* subsp. *paratuberculosis* viability. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, n.4, p.1334 - 1339, 2000.

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

TEIXEIRA NETO, R. O. Avaliação dos processos térmicos utilizando o método genérico. In: CURSO DE ESTERILIZAÇÃO DE ALIMENTOS. 2000 Campinas, cap.

ZUMARRAGA, M.; MARTÍN, C.; SAMPER,S.; ALITO,; LATINI, O.; BIGI, F.; ROXO, E.; CICUTA, M. E.; ERRICO, F.; RAMO, M. C.; CATALDI, A.; SOOLIGEN, D.;ROMANO, M. I. Usefulness of spoligotyping in molecular epidemiology of *Mycoacterium bovis* – related infections in South América. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 296 - 303, 1999.