

TATIANE HOSHIDA FELIPE

**Resistência térmica de diferentes espoligotipos de *Mycobacterium bovis* à  
pasteurização lenta (65°C) em leite experimentalmente inoculado**

São Paulo

2009

TATIANE HOSHIDA FELIPE

**Resistência térmica de diferentes espógotipos de *Mycobacterium bovis* à  
pasteurização lenta (65°C) em leite 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 a 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

2009

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

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2190  
FMVZ

Felipe, Tatiane Hoshida

Resistência térmica de diferentes espoligotipos de *Mycobacterium bovis* à pasteurização lenta (65°C) em leite experimentalmente inoculado / Tatiane Hoshida Felipe. – 2009.

51 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. Resistência térmica. 2. *Mycobacterium bovis*. 3. Isolados de campo. 4. Pasteurização lenta. 5. leite. I. Título.

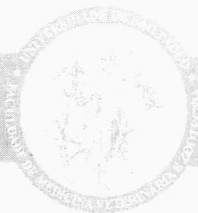
---

## ERRATA

FELIPE, T. H. **Resistência térmica de diferentes espoligotipos de *Mycobacterium bovis* à pasteurização lenta (65°C) em leite experimentalmente inoculado.** 2009. f. 51. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	3	1	51 f.	45 f.
RESUMO	1	2	f 51.	45 f.
ABSTRACT	1	2	f 51.	45 f.

---



## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Resistência de diferentes espoligotipos de *Mycobacterium bovis* à pasteurização lenta em leite experimentalmente inoculado", protocolado sob o nº1808/2009, 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 26 de outubro de 2009.

We certify that the Research "Resistance as of different espoligotipos as of *mycobacterium bovine* at the pasteurization low milk experimentally inoculate", protocol number 1808/2009, 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 10/26/09.

São Paulo, 28 de outubro de 2009

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

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FELIPE, Tatiane Hoshida

Título: Resistência térmica de diferentes espoligotipos de *Mycobacterium bovis* à pasteurização lenta (65°C) em leite 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 a 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: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

À Professora Dra. Evelise Oliveira Telles, que sempre muito atenciosa se mostrou de prontidão, seu carinho e respeito com todos demonstra claramente humanismo e profissionalismo, sendo uma pessoa admiráveis.

Ao meu irmão Eduardo Hoshida Felipe (*in memoriam*) que sempre me apoiou e se dedicou para minha formação.

Aos meus pais Luis Antonio Felipe e Lucy Thizuko Hoshida Felipe por todo amor, dedicação, paciência, apoio, incentivo e por acreditar sempre em mim.

Ao meu namorado Paulo Henrique Chinelato Guerra pelo amor, carinho, apoio e dedicação.

Aos colegas e companheiros de trabalho Livia e Leandro Ribeiro pela ajuda, companheirismo, amizade e por dividir momentos de dificuldade e alegria das durante a pós-graduação.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecimento ao Professor Dr. Fernando Ferreira pela paciência e colaboração nos dados estatísticos deste trabalho.

Ao Professor Dr. José Soares por fornecer os espoligotipos utilizados na tese.

A Zenaide e Gisele, por toda contribuição à realização deste trabalho, pelos ensinamentos, e principalmente pela paciência e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Higiene Alimentar, Olando Bispo dos Santos e Sandra Abelardo Sanches pela ajuda que foi essencial para realizar todo o experimento.

A todos pós graduandos, estagiários, professores e funcionários do Departamento de Medicina Preventiva e Animal que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.



## RESUMO

FELIPE, T. H. **Resistência térmica de diferentes espoligotipos de *Mycobacterium bovis* à pasteurização lenta (65°C) em leite experimentalmente inoculado.** [Thermal Death Kinetics (65°C) of some *Mycobacterium bovis* spoligotypes recently isolated from bovines]. 2009. f. 51. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A pasteurização do leite é obrigatória no Brasil e o sistema lento (65°C/30 minutos) é o mais empregado na fabricação de queijos. 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 (65°C) de cinco espoligotipos 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 65°C por 30 minutos. Cada espoligotipo foi testado 3 vezes. As amostras foram retiradas do banho nos tempos 0 (o momento em que o leite atingiu 65°C), 5, 10, 15, 20, 25 e 30 correspondendo ao tempo, em minutos, 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. Houve diferença de resistência entre os espoligotipos ao processo que simulou a pasteurização lenta e o 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 melhor investigados.

Palavras-chave: Leite, Resistência Térmica, *Mycobacterium bovis*, isolados de campo e pasteurização lenta.

## ABSTRACT

FELIPE, T. H. **Thermal Death Kinetics (65°C) of some *Mycobacterium bovis* spoligotypes recently isolated from bovines**]. 2009. f. 51.. [Resistência térmica de diferentes espoligotipos de *Mycobacterium bovis* à pasteurização lenta (65°C) em leite experimentalmente inoculado]. 2009. f. 51. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Milk pasteurization is mandatory in Brazil and the Low Temperature Long Time – LTLT – Pasteurization (62 to 65°C/30 min.) is normally used for cheese making. Permitted parameters were based on the reports of *Myconbacterium bovis/tuberculosis* inactivation made up to that time. Since then, just a few studies have been done to determine if the *M. bovis* in circulation nowadays among bovine population still presents the same pattern of inactivation. In this way, this study verified the behavior of recently isolated *M. bovis* against LTLT Pasteurization parameters reproduced in water bath. *M. bovis* isolated from bovines slaughtered in São Paulo State, Brazil. When milk reached 65°C the 0 tube was removed and refrigerated while the others taken out after 5, 10, 15, 20, 25 and 30 minutes and cooled. For controlling heat treatment a thermometer was adapted to one tube with 5 ml each of raw milk which were submitted together to heat treatment and used for analysis of peroxidase and alkaline phosphatase enzymes after 30 minutes of heat treatment. Milk samples were submitted to serial decimal dilution in peptone water (0.1%) and inoculated in the Stonebrink-Leslie media. After 45 days at 37°C, colonies were counted and the result expressed in CFU/ml. The results showed that heating phase determined more inactivation than the holding phase. The resentence was different between the spoligotypes that simulated the low pasteurization and BR024 was more resentence. The results enable us to speculate that in the worst scenario of natural contamination of the milk.

Keyword: Milk, heat resistance, *Mycobacterium bovis*, field isolated and holder pasteurization

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Obtenção do inóculo de <i>Mycobacterium bovis</i> empregado na contaminação do leite .....	30
Figura 2	Esquema de contaminação do leite e distribuição nos tubos para análise .....	32
Figura 3	Esquema dos tubos submetidos ao tratamento térmico em banho maria .....	33
Figura 4	Esquema dos tubos empregados para o controle enzimático e térmico do processo .....	34
Figura 5	O desenho demonstra a diluição $10^0$ sendo semeada 2 vezes.....	35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sobrevivência (LOG UFC/mL) das 5 cepas de <i>Mycobacterium bovis</i> (isolados de campo) submetidas a 65°C por 30 minutos em leite integral experimentalmente contaminado - São Paulo – ago-2008 - ago/2009.....	39
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 - ago-2008 - ago-2009.....	40

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Tuberculose .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2 Micobactérias .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.1 Resistência Térmica .....</b>	<b>20</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Inóculo .....</b>	<b>29</b>
<b>4.2 Contaminação do Leite .....</b>	<b>31</b>
<b>4.3 Tratamento Térmico .....</b>	<b>32</b>
<b>4.4 Controle do Processo de Pasteurização .....</b>	<b>33</b>
<b>4.5 Diluição e Semeadura das Amostras.....</b>	<b>35</b>
<b>4.6 Contagem de Colônias e Registro de Resultados .....</b>	<b>37</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>47</b>

## **INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

A Tuberculose é uma doença infecciosa crônica e de conhecimento humano desde os primórdios da história, o agente causador pertence à ordem Actinomycetales, gênero *Mycobacterium* e formam o denominado “complexo *Mycobacterium tuberculosis*”, constituído por *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. africanum*, este último ainda não isolado no Brasil. A sobrevivência de um microrganismo nos alimentos depende das características específicas do agente, da carga microbiana inicial e também das características intrínsecas e extrínsecas do substrato. O *Mycobacterium* spp é um patógenos não formadores de esporos de maior resistência térmica, que normalmente pode ser transmitido pelo leite. No Brasil, os parâmetros de tempo e temperatura oficiais de pasteurização do leite foram estabelecidos na década de 50, com base em estudos anteriores sobre a inativação térmica desses agentes. Pouco foi atualizado, desde os primeiros estudos, sobre a sobrevivência do *Mycobacterium bovis*, no entanto, a microbiologia evoluiu consideravelmente nas últimas décadas e o atual emprego de métodos moleculares possibilitou a discriminação de grupos dentro de espécies já conhecidas. Tal fato, associado à escassez de informação sobre o padrão de morte térmica das estirpes que grassam em território nacional, salienta a necessidade de um estudo para avaliar a importância dessa variabilidade genética do *M. bovis* sobre sua sobrevivência. Assim, este projeto se propõe a estudar a sobrevivência de espógotipos de *M. bovis* isolados de bovinos do estado de São Paulo à pasteurização lenta de leite experimentalmente inoculado.

## **OBJETIVOS**



## 2 OBJETIVOS

Geral:

Avaliação da inativação térmica (65°C) de espoligotipos de *Mycobacterium bovis* (isolados de bovinos abatidos no estado de São Paulo) em leite integral experimentalmente inoculado.

Específicos:

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

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

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

**REVISÃO DE LITERATURA**

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Tuberculose

A tuberculose é uma doença infecciosa crônica e de conhecimento humano desde os primórdios da história, múmias da dinastia de Ramsés reinante há três mil anos apresentavam lesões de tuberculose óssea. Descrições de lesões pulmonares encontradas em artigos manuscritos hindus são muito sugestivas de que se tratasse dessa doença. Hipócrates mencionou uma doença pulmonar cujo curso é similar ao da tuberculose pulmonar. Aristóteles já afirmava que a doença era contagiosa. Várias são as indicações de que a tuberculose era comum nas populações do mundo grego e romano. Entre os animais, também seu conhecimento é antigo. A orientação da conduta para sacrifício ritualístico e de matadouro sugere que os judeus antigos conheciam as lesões da tuberculose em ruminantes (CORREA, 1992).

O agente causador da tuberculose pertence à ordem Actinomicetales, gênero *Mycobacterium* e formam o denominado “complexo *Mycobacterium tuberculosis*”, constituído por *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. africanum*, este último ainda não isolado no Brasil. Trata-se de um bacilo álcool-ácido, ou seja que moderadamente resiste ao calor, dessecação e diversos desinfetantes. Permanece viável em estábulos, pasto e esterco por até dois anos, em até um ano na água e cerca de 10 meses nos produtos de origem animal contaminados. Agentes como fenólicos, álcool e em especial o hipoclorito de sódio são bastante eficientes no combate ao bacilo, contudo sua ação pode ser afetada pela concentração do produto, o tempo de exposição, a temperatura e a presença de matéria orgânica. O calor úmido a 60°C mata o bacilo rapidamente (RUSSEL et al., 1984).

A tuberculose bovina é uma zoonose que apresenta uma evolução crônica e efeito debilitante, causada pelo *M. bovis*, cujo hospedeiro primário são os bovinos.

Entretanto outras espécies de mamíferos, incluindo o homem são susceptíveis ao bacilo (ABRAHÃO,1999).

O homem é tão sensível ao *M. bovis* quanto ao *M. tuberculosis*. A tuberculose humana por *M. bovis* pode ter origem exógena, pelo contágio via aerógena a partir de bovinos infectados ou via digestiva pela ingestão de leite contaminado. Classicamente, era descrita como de ocorrência menos comum a via cutânea, por abrasão de pele em açougueiros e magarefes. A infecção endógena, por reativação do foco primário, é observada em indivíduos adultos com idade avançada em países onde se logrou a erradicação da tuberculose bovina ha décadas. Pode ser observado o contágio homem a homem. É possível o contágio de bovinos a partir de pacientes bacilíferos infectados por *M. bovis* ou ainda pela urina de pacientes com tuberculose urogenital que excretam nos cochos e bebedouros (KLEEBERG, 1984).

Estudos fazem referência que 200.000 bovinos estão infectados. E que o *M. bovis* seja responsável por 4000 dos 80000 casos de tuberculose humana anualmente registrados (LEITE et al., 2003).

A principal forma de infecção pelo bacilo bovino é pela ingestão de leite cru contaminado (SOUZA et al.,1999).

Ball (1943) diz que a contaminação natural máxima do leite por *M. bovis* pode chegar a  $10^4$  UFC/mL, segundo Lerche (1969), uma vez que o leite não apresenta alterações visíveis fica difícil a detecção para separação e adequado tratamento do produto.

No ano de 2004, preocupados com a melhoria das condições de saúde pública animal e humana, o governo brasileiro lançou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal, que padronizou as ações profiláticas, de diagnóstico e de vigilância sanitária ativa, visando baixar a prevalência e a incidência de novos casos da doença e criar um número significativo de propriedades certificadas que ofereçam ao consumidor produtos de baixo risco sanitário (BRASIL, 2004).

### 3.2 Micobactérias

As Micobactérias pertencem à família Mycobacteriaceae, gênero *Mycobacterium*. São bacilos curtos aeróbicos, imóveis não capsulados, não flagelados, apresentando aspecto granular quando corados, medindo de 0,5 µm a 0,7 µm de comprimento por 0,3 µm de largura. Diferem das demais bactérias 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).

As Micobactérias são ambientais, mas também patógenos oportunistas, sendo comum sua presença em solo, água e podem crescer em um amplo intervalo de condições ambientais tais como temperatura, pH, salinidades e tensão de oxigênio. As doenças causadas por essas espécies incluem as formas pulmonares, disseminadas, endocardite, feridas cirúrgicas e traumáticas, doenças de pele e de tecidos (FALKINHAM, 1996; BLANCO, 2002).

Além dos prejuízos já registrados, tanto para saúde humana, quanto para animal, causados pelas micobactérias de crescimento lento, entre elas *M. tuberculosis*, *M. bovis*, e o complexo *M. avium*, foi observado também um aumento da ocorrência de doenças associadas as micobactérias de crescimento rápido, como o *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus* (FALKINHAM, 1996; BALIAN et al., 2002; BLANCO et al., 2002).

### 3.2.1 Resistência Térmica

No início do século XX, a comunidade científica mundial reconheceu a pasteurização do leite como método importante no combate à alta incidência de doenças humanas diretamente relacionadas ao consumo de leite cru e determinou padrões comerciais para seu tratamento térmico, o que resultou em um decréscimo significativo das doenças transmitidas pelo leite (STABEL, 2003).

A determinação do tempo e temperatura de pasteurização do leite teve como principal parâmetro a 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 à 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).

Entende-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 fosfatase alcalina é uma enzima termo sensível que está sempre presente no leite cru, porém, é mais resistente que o *Mycobacterium* spp, e quando o leite é aquecido em temperatura e tempo ótimos de pasteurização, ela é destruída (BEHMER, 1991).

A peroxidase, sempre presente no leite cru, é inativada à 85°C, devendo estar intacta no leite pasteurizado; sua inativação é indício de sobre-aquecimento do leite (PORTO, 1998).

No Brasil, a pasteurização lenta é freqüentemente utilizada pelas pequenas usinas e queijarias (CARVALHO, 1998) e o binômio 62 à 65°C/30 minutos foi estipulado na década de 50 (BRASIL, 1952). Há uma pequena diferença entre esta legislação

federal e a do estado de São Paulo, cujo artigo 124, item 3.1, prevê 63-65°C/30minutos (SÃO PAULO, 1994).

A escassez de dados sobre a resistência do *M. tuberculosis* var. *bovis* motivou Kells e Lear a estudarem, em 1960, a curva de tempo de morte térmica do agente, em leite bovino, e encontraram que a relação 61,6°C por 30 minutos oferecia uma margem de segurança de aproximadamente 28,5 minutos, considerando uma concentração inicial de *M. bovis* de  $10^4$  UFC/mL de leite. Em 1965, Harrington e Karlson submetem *M. bovis*, *M. avim* e *M. fortuitum* à pasteurização lenta e rápida em leite desnatado, pelo método do tubo-teste, concluindo que houve a desvitalização completa das 3 espécies.

A morte dos microrganismos, quando submetidos a uma dada temperatura, é logarítmica, ou seja, quando se coloca num gráfico semi-logarítmico, na ordenada o número de microrganismos sobreviventes (em log), e na abscissa o tempo de aquecimento, obtém-se uma linha reta. Através deste gráfico, anotando-se dois pontos na reta, correspondendo à redução de um ciclo logarítmico dos sobreviventes, e projetando-os ao eixo referente ao tempo, encontra-se o valor D, esse dado é de alta relevância para a análise de risco, possibilitando calcular o nível de segurança conferido ao produto devido 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 (foi eliminado em 2 minutos a 65°C) que as outras micobactérias (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. gordoniae*). Em contraposição, Jay (1992) e Grant, Ball e Rowe (1996) relataram que o *M. fortuitum* mostrou ser mais termo sensível que *M. avium*, *M. bovis*, *M. intracellulare* e *M. kansaii*.

A eficácia do tratamento térmico 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).

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).

Segundo McFadden (1992), um fator que pode influenciar na resistência térmica de muitas micobactérias é a tendência de formar grumos em meios líquidos, devido à natureza hidrofóbica da sua parede celular. Outro aspecto importante são as 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; BALL; ROWE, 1996).

Pouco foi reportado sobre a resistência térmica das micobactérias entre as décadas de 60 e 90, embora a microbiologia tenha se desenvolvido muito. A partir da década de 90, estudos foram desenvolvidos para avaliar se a pasteurização garantiria adequado nível de segurança contra o *M. paratuberculosis*, agente é causador da doença de Johne nos animais, e que pode ser veiculado pelo leite cru. A razão desses estudos é que há suspeita de que o *M. paratuberculosis* esteja relacionado com a ocorrência da doença de Crohn no homem (GRANT; BALL; ROWE, 1996; GRANT et al., 1996; SUNG; COLLINS, 1998, 2000; STABEL, 2001, 2003; LUND; GOULD; RAMPLING, 2002).

Grant et al. (1996) detectaram sobreviventes em 96% das amostras inoculadas (27/28) com  $10^7$  UFC/mL de *M. paratuberculosis*, e 50% (14/28) das amostras com  $10^4$  UFC/mL, submetidas à  $63,5^\circ\text{C}$ . Quando submetidas a  $71,7^\circ\text{C}/15$  seg., houve sobrevivência em 85% (29/34) das amostras inoculadas com  $10^7$  UFC/mL, e 55% (19/33) das amostras com  $10^4$  UFC/mL; a essa temperatura, relatam ainda a redução de 5 a 6 ciclos logarítmicos quando a contaminação inicial era de  $10^7$  UFC/mL, e de 2 a 3 ciclos, partindo de  $10^4$  UFC/mL.

Sung e Collins (1998) calcularam o valor D (62, 65, 68 e  $71^\circ\text{C}$ ) 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 mililitro de leite, pois o  $D_{71^\circ\text{C}}$  foi igual a 11,7 segundos, no entanto, haveria maior segurança na pasteurização lenta, cujo o valor  $D_{65^\circ\text{C}}$  foi de 47,8 segundos. Comparativamente o valor D foi maior no leite que



no lactato, em todas as temperaturas estudadas, mostrando a importância do substrato na sobrevivência do agente.

Nesse sentido, há pouco relato sobre a influência das características do substrato sobre a termorresistência do *Mycobacterium* spp, embora a literatura evidencie a ação protetora, por exemplo, da gordura, contra a morte térmica de outros microrganismos (MOLIN; SNYGG, 1967; BRIGGS, 1986; MCDONALD; SUTHERLAND, 1993; DONNELLY; FRANCO; LANDGRAF, 1996; CHHABRA et al., 1999; BUSATTA, 2005).

Sung e Collins (1998) testaram ainda, em meio lactato, dois métodos de quantificação de *M. paratuberculosis*, por método de cultura radiométrica (BACTEC) e contagem padrão em placas, para o cálculo do valor  $D_{62^{\circ}\text{C}}$ . A curva de sobreviventes referente à contagem em placas não foi linear ( $R^2=0,61$ ) e o valor D foi de 11,2 min enquanto que pelo método radiométrico a curva foi linear ( $R^2=0,95$ ) e o D foi mais baixo, 5,4 min. Sugerem que a contagem em placas não seria tão exata quanto à radiométrica para estudos de termotolerância desse agente, devido à influência da formação de grumos na contagem de células viáveis. No entanto esses autores não encontraram diferença significativa, em lactato, no valor  $D_{65^{\circ}\text{C}}$  do *M. paratuberculosis* entre amostras com grumos e sem grumos.

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  $65^{\circ}\text{C}$ . 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  $71^{\circ}\text{C}$ , mas quando a inoculação foi feita no substrato já aquecido à essa temperatura, houve redução de 6 Log UFC/mL nos 90 segundos.

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

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°C/30min), 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.

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 obtida quando a pasteurização foi realizada no leite homogeneizado.

Nishimoto (2006) e Starikoff (2006) não registraram redução de *M. fortuitum* (NCTN 8573) para níveis abaixo do detectável (<10 UFC/mL) após a pasteurização lenta (65°C/30 min.) em leite de vaca e cabra, respectivamente, independentemente de ser integral ou desnatado.

Nishimoto (2006) observou redução de 1,7 Log UFC/mL de *M. fortuitum* em leite integral submetido à 65°C/30 min. e Starikoff (2006) registrou redução de 2,9 Log UFC/mL nas mesmas condições, em leite de cabra. Esses dados assemelham-se às reduções detectadas na presente pesquisa: entre 0,4 a 5,7 Log UFC/mL nos diferentes isolados.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Leite UHT foi contaminado com 5 cepas de *Mycobacterium bovis* isoladas de bovinos no Estado de São Paulo e submetido à pasteurização lenta em banho-Maria. Foram realizadas 3 repetições de pasteurização para cada cepa testada.

Essas cepas são oriundas 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 cepas em 19 diferentes espoligotipos de *M. bovis*, sendo que 11 delas ainda não haviam sido descritas (ROSALES et al., 2003). Os espoligotipos escolhidos para a realização da presente pesquisa foram:

- 1) SB0121 - por ter sido o mais prevalente naquela pesquisa;
- 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 ter sido o espoligotipo novo mais prevalente.

### 4.1 Inóculo

Foram utilizadas culturas com até 10 dias (36° C) em meio Stonebrink em garrafas de cultivo celular TPP.

Três tubos contendo cultura da cepa de *Mycobacterium bovis* foram numerados e pesados 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. Em seguida, foram adicionados 11,5mL de solução salina 0,85% até completar 12 mL de inóculo, que foi transferido para um frasco shott de 250 mL esterilizado, contendo pérolas de vidro para evitar a formação de grumos (Figura 1).

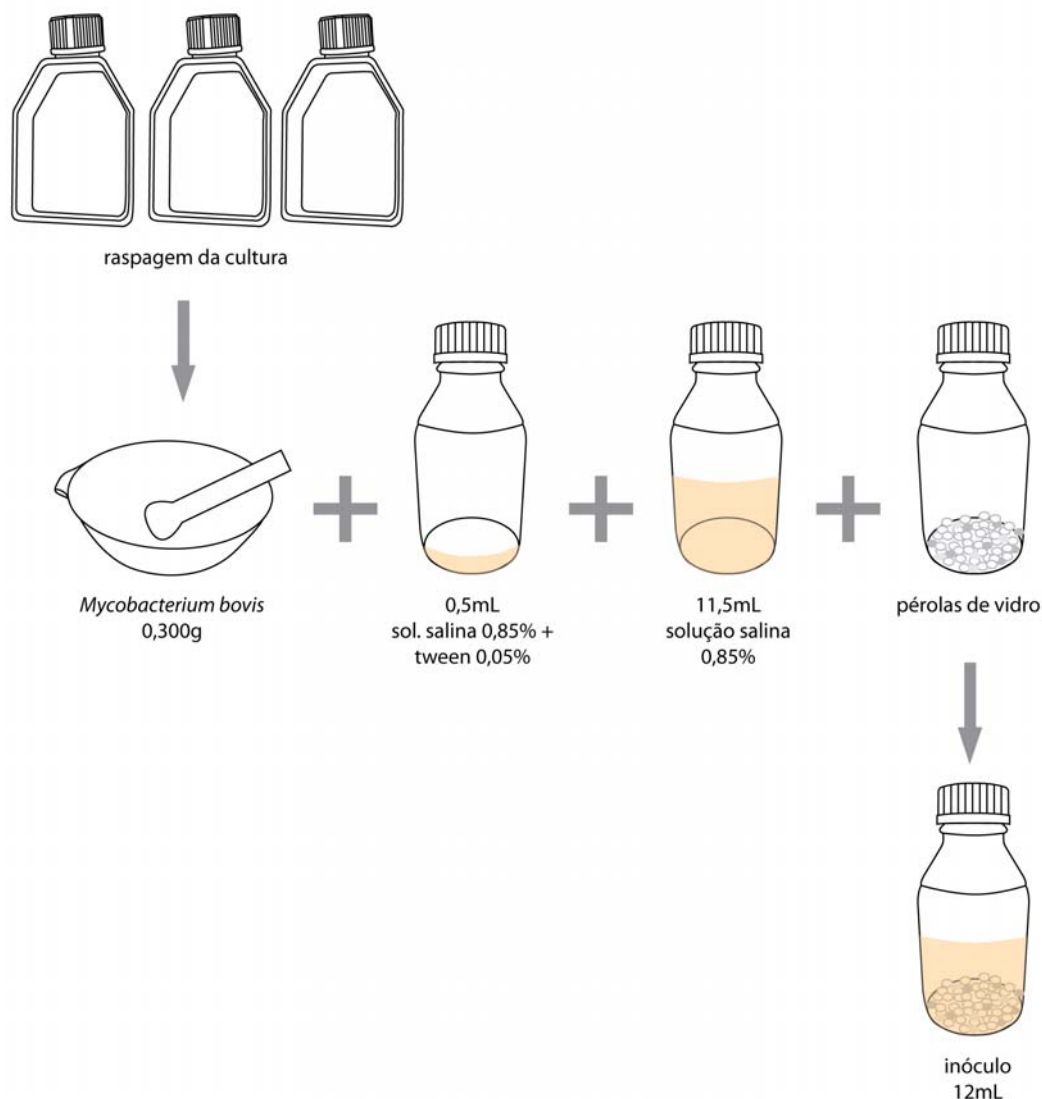


Figura 1 - Obtenção do inóculo de *Mycobacterium bovis* empregado na contaminação do leite

## 4.2 Contaminação do Leite

Foi empregado leite UHT integral. Foram retirados assepticamente 25mL da embalagem original e transferidos para frasco Shott de 250 mL. Foram então adicionados 2 mL do inóculo e, após homogeneização, o leite contaminado foi distribuído em oito tubos 16mmx160mm estéreis (5 mL em cada), previamente identificados como 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 (indicando o tempo em minutos a ser

submetido ao tratamento térmico), e um tubo nomeado como controle de contaminação do leite (Figura 2).

Essas sub-amostras foram submetidas ao tratamento térmico em banho-maria, com exceção da sub-amostra controle da contaminação do leite que foi utilizada para a quantificação inicial do agente. 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.

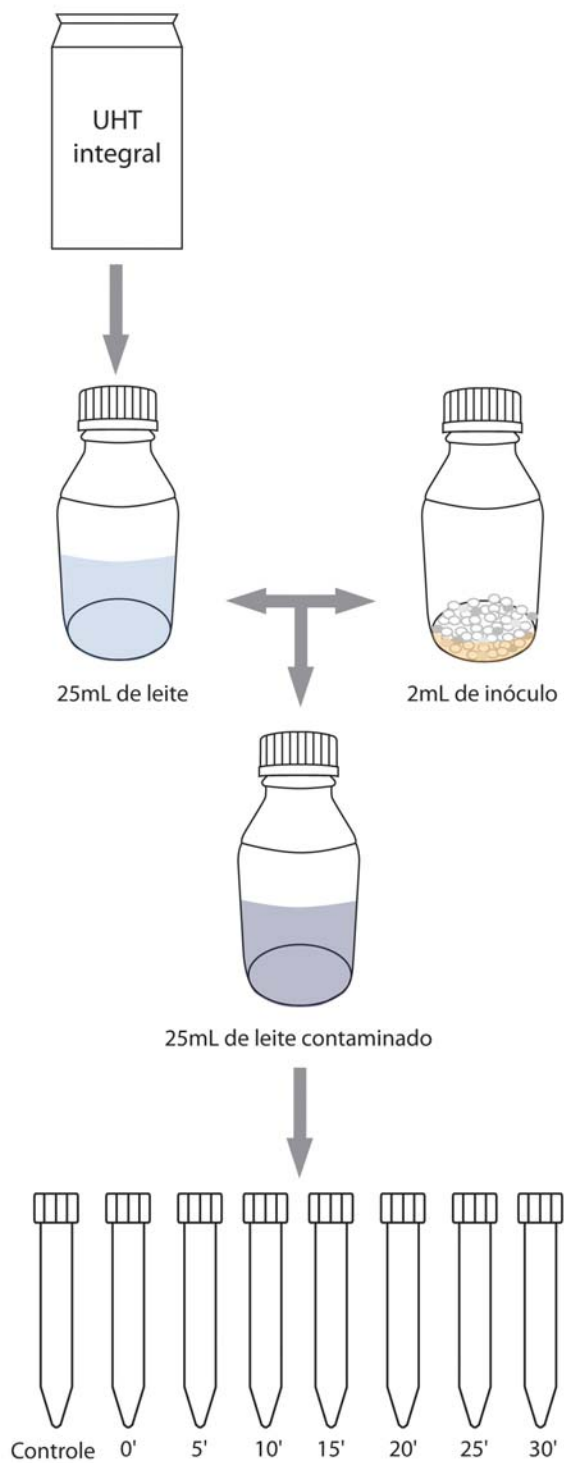


Figura 2 - Esquema de contaminação do leite e distribuição nos tubos para análise

### 4.3 Tratamento Térmico

Os tubos contendo as sub-amostras foram colocados em banho-maria a 65°C (Figura 3), até que atingisse a temperatura de 65°C, quando o tubo 0 foi retirado e colocado em banho de gelo para cessar o efeito térmico sobre as células. Inicia-se a contagem do tempo de pasteurização do restante das sub-amostras, uma vez alcançando o tempo desejado, de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos, os respectivos tubos foram retirados e também resfriados em gelo.

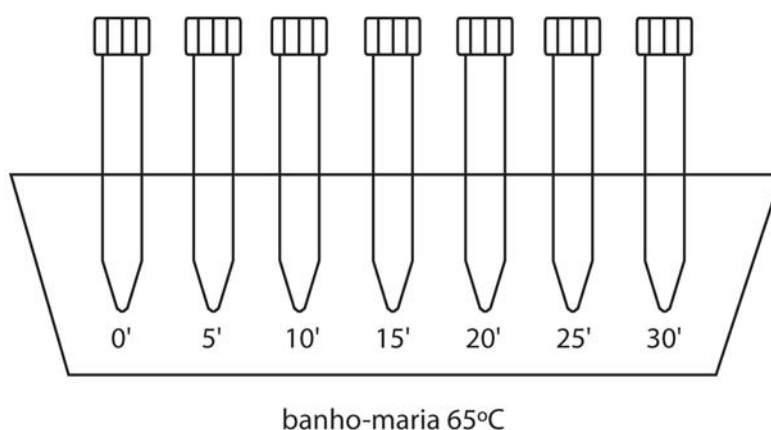


Figura 3 – Esquema dos tubos submetidos ao tratamento térmico em banho maria.

### 4.4 Controle do Processo de Pasteurização

Para verificar a propriedade com que o tratamento térmico foi realizado, foram empregados 4 tubos contendo leite cru e não inoculado, com mesmo volume de leite das amostras testes, em cada processo de pasteurização. Em um desses tubos foi colocado um termômetro, para controlar a temperatura de aquecimento do leite,



tomando-se o cuidado para que o bulbo não estivesse em contato com as paredes do tubo. As outras três amostras foram empregadas para análise, ao final do processo térmico, das enzimas peroxidase (BRASIL, 1981) e fosfatase alcalina (teste colorimétrico da Laborclin®, seguindo orientação do fabricante) (Figura 4).

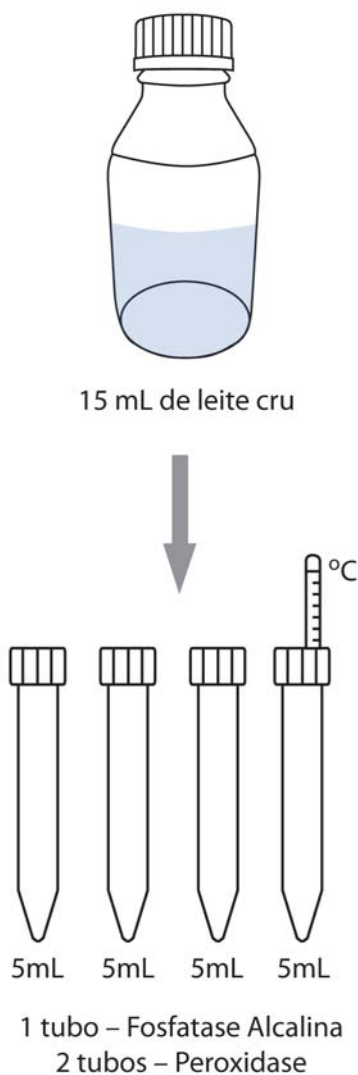


Figura 4 - Esquema dos tubos empregados para o controle enzimático e térmico do processo

#### 4.5 Diluição e Semeadura das Amostras

As sub-amostras foram submetidas à diluição decimal seriada em água peptonada 0,1%, até diluição  $10^{-8}$ . Após homogeneização em vórtex por 10 segundos, 0,1mL

de cada diluição foi semeado, empregando micropipetas estéreis com filtro, na superfície do meio Stonebrink distribuído em garrafas TPP, em duplicata (Figura 5). O meio foi preparado segundo a técnica do Centro Panamericano de Zoonoses (CENTRO PANAMERICANA DE ZONOSIS, 1985). As garrafas semeadas foram fechadas com o primeiro clique da rosca pelas primeiras 24 horas e então fechadas completamente, para evitar que o meio ressecasse. As garrafas foram incubadas a 36°C/45 dias; fazendo uma leitura aos 30 dias para selecionar as diluições potenciais para leitura, reduzindo espaço ocupado na estufa.

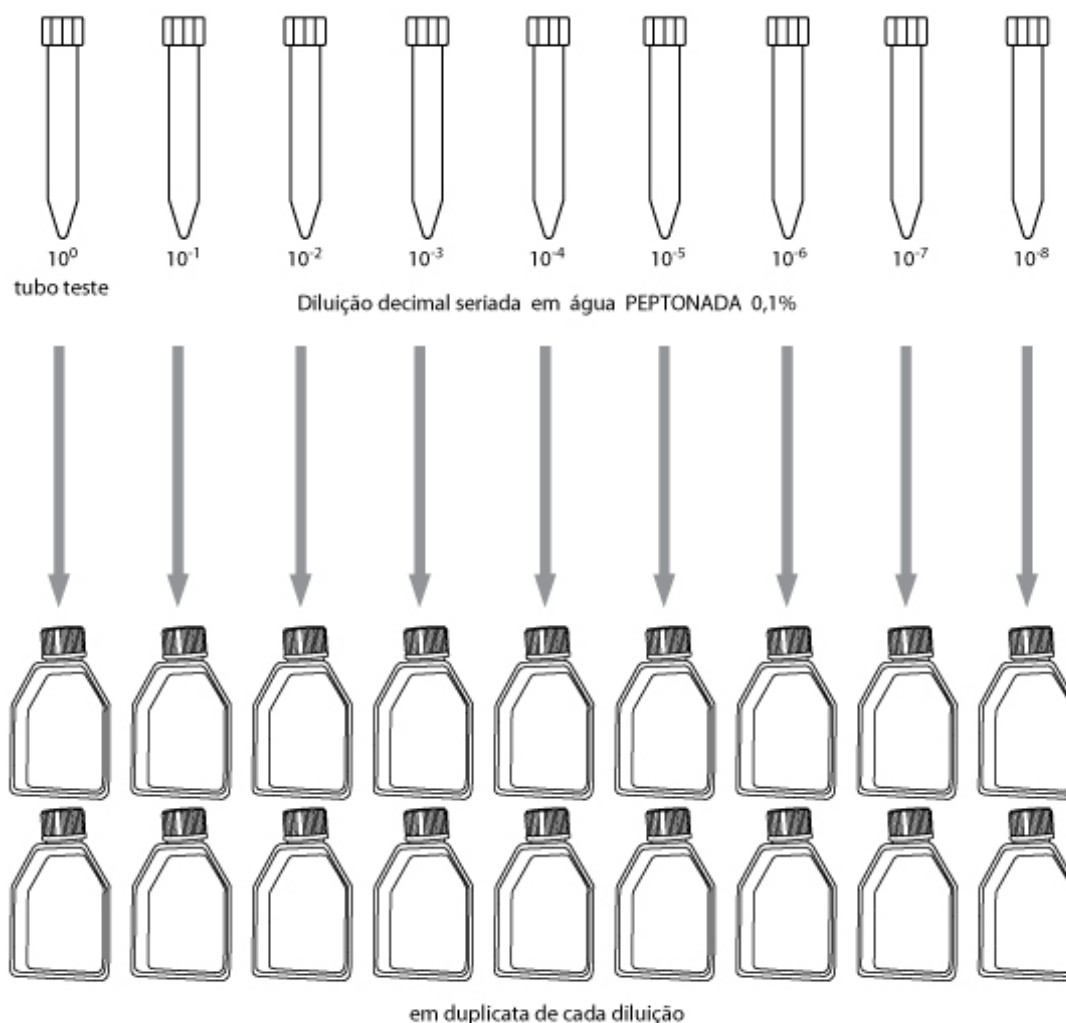


Figura 5 – Esquema da diluição e semeadura das amostras

#### **4.6 Contagem de Colônias e Registro de Resultados**

A diluição de eleição foi aquela que apresentou entre 10 e 150 colônias, no entanto, em alguns casos, houve necessidade de contar diluições que se apresentaram fora desse intervalo.

Foi feita a média aritmética das UFC da diluição eleita e o resultado foi multiplicado por 10 (correção da alíquota semeada = 0,1mL) e pelo inverso da diluição; o resultado foi transformado em log<sub>10</sub> e expresso como log<sub>10</sub> das UFC/mL de leite.

## **RESULTADOS**

## 5 RESULTADOS

A análise enzimática do leite cru usado como controle do processo térmico mostrou que as enzimas fosfatase alcalina e peroxidase estavam presentes. Após o tratamento térmico fosfatase alcalina resultou negativa e a peroxidase, positiva, em todas as amostras, revelando concordância com os critérios enzimáticos oficiais para o leite pasteurizado (BRASIL, 1952).

Os resultados de sobrevivência das 5 cepas submetidas ao binômio tempo e temperatura de pasteurização lenta estão apresentados na tabela 1. Observa-se que durante o tratamento térmico propriamente dito (os 30 minutos a 65°C) houve, de modo geral, pequena variação na população de *Mycobacterium bovis*. Os testes com a cepa BR024 foram refeitos e, devido a pouca variação observada nos outros isolados durante os 30 min a 65°C, realizou-se apenas as análises na contaminação inicial (controle), no minuto 0 e aos 30 minutos.

Tabela 1 – Sobrevivência (LOG UFC/mL) das 5 cepas de *Mycobacterium bovis* (isolados de campo) submetidas a 65°C por 30 minutos em leite integral experimentalmente contaminado - São Paulo – ago-2008 - ago/2009

CEPA	REPETIÇÃO	Controle		Minuto 0		Minuto 5		Minuto 10		Minuto 15		Minuto 20		Minuto 25		Minuto 30	
		UFC/mL	LOG	UFC/mL	LOG	UFC/mL	LOG	UFC/mL	LOG	UFC/mL	LOG	UFC/mL	LOG	UFC/mL	LOG	UFC/mL	LOG
SB0881	1	2.5E+08	8.4	1.8E+04	4.2	1.6E+03	3.2	1.4E+04	4.1	1.5E+04	4.2	5.5E+02	2.7	4.5E+02	2.7	2.4E+03	3.4
	2	5.3E+07	7.7	2.2E+04	4.3	5.0E+03	3.7	3.3E+04	4.5	3.7E+02	2.6	5.2E+04	4.7	7.8E+04	4.9	2.2E+04	4.3
	3	4.3E+06	6.6	8.5E+02	2.9	1.1E+03	3.0	5.5E+02	2.7	3.0E+02	2.5	3.0E+02	2.5	1.0E+03	3.0	1.3E+03	3.1
	Média	1.0E+08	7.6	1.3E+04	3.8	2.6E+03	3.3	1.6E+04	3.8	5.1E+03	3.1	1.8E+04	3.3	2.6E+04	3.5	8.6E+03	3.6
SB0120	1	5.5E+10	10.7	2.1E+05	5.3	1.9E+05	5.3	1.4E+05	5.1	3.6E+04	4.6	7.5E+04	4.9	8.5E+04	4.9	2.2E+04	4.3
	2	6.9E+08	8.8	1.1E+04	4.0	4.2E+03	3.6	1.3E+04	4.1	3.5E+03	3.5	9.0E+03	4.0	1.3E+04	4.1	9.0E+03	4.0
	3	3.4E+08	8.5	1.9E+03	3.3	3.5E+04	4.5	5.0E+03	3.7	2.5E+04	4.4	6.8E+03	3.8	5.0E+04	4.7	6.0E+02	2.8
	Média	1.9E+10	9.4	7.4E+04	4.2	7.5E+04	4.5	5.3E+04	4.3	2.1E+04	4.2	3.0E+04	4.2	4.9E+04	4.6	1.1E+04	3.7
SB0121	1	4.4E+07	7.6	9.0E+03	4.0	2.8E+03	3.4	5.0E+02	2.7	3.5E+02	2.5	6.5E+01	1.8	3.3E+03	3.5	1.5E+04	4.2
	2	2.9E+07	7.5	1.2E+03	3.1	8.7E+03	3.9	1.5E+05	5.2	3.0E+02	2.5	1.7E+03	3.2	3.5E+04	4.5	1.7E+05	5.2
	3	3.4E+07	7.5	6.0E+03	3.8	2.6E+04	4.4	3.9E+03	3.6	2.8E+04	4.4	1.9E+05	5.3	4.5E+03	3.7	6.5E+02	2.8
	Média	3.5E+07	7.5	5.4E+03	3.6	1.2E+04	3.9	5.1E+04	3.8	9.6E+03	3.2	6.4E+04	3.4	1.4E+04	3.9	6.3E+04	4.1
SB0295	1	7.3E+08	8.9	1.2E+05	5.1	5.4E+04	4.7	8.9E+04	4.9	1.2E+05	5.1	7.4E+03	3.9	4.6E+05	5.7	9.6E+05	6.0
	2	7.3E+08	8.9	2.7E+05	5.4	2.7E+05	5.4	3.4E+04	4.5	1.1E+05	5.0	3.5E+05	5.5	2.3E+03	3.4	1.9E+04	4.3
	3	2.0E+08	8.3	3.4E+04	4.5	5.0E+01	1.7	1.5E+02	2.2	5.0E+02	2.7	1.7E+03	3.2	2.4E+03	3.4	1.7E+03	3.2
	Média	5.5E+08	8.7	1.4E+05	5.0	1.1E+05	4.0	4.1E+04	3.9	7.4E+04	4.3	1.2E+05	4.2	1.5E+05	4.1	3.3E+05	4.5
BR024	1	3.3E+04	4.5	2.3E+04	4.4											2.3E+04	4.4
	2	5.3E+04	4.7	1.2E+04	4.1											2.2E+04	4.3
	3	4.9E+04	4.7	1.7E+05	5.2											1.3E+04	4.1
	Média	4.5E+04	4.6	6.7E+04	4.5											1.9E+04	4.3

A eficácia do tratamento térmico pode ser observada na tabela 2 onde se apresentam os resultados (em LOG UFC/mL) da redução obtida durante cada fase: aquecimento, tratamento térmico propriamente dito (65°C/30 min.) e o processo completo. Depreende-se desta tabela que a fase de aquecimento, que levou cerca

de 2 minutos, foi mais eficaz na redução de 4 dos 5 isolados testados (SB0120, SB0121, SB0295 e SB0881), quando comparado aos 30 min de processo a 65°C. Além disso, nota-se que a cepa SB0120 revelou-se mais sensível ao processo térmico estudado, mostrando uma redução de 5,7 Log UFC/mL. Já a cepa BR024 praticamente não variou durante o aquecimento e, ainda, mostrou-se como a mais resistente ao processo térmico completo, reduzindo apenas 0,4 Log UFC/mL.

Tabela 2 - Redução da população (LOG UFC/mL) de *Mycobacterium bovis* (cinco cepas isoladas do campo) inoculado em leite integral durante o processo de pasteurização lenta mimetizado em banho-maria - São Paulo - ago-2008 - ago-2009

CEPA	REPETIÇÃO	Redução Aquecimento	Redução A 65 C	Redução Processo
SB0881	1	4.2	0.9	5.0
	2	3.4	0.0	3.4
	3	3.7	-0.2	3.5
	Média	3.7	0.2	4.0
SB0120	1	5.4	1.0	6.4
	2	4.8	0.1	4.9
	3	5.3	0.5	5.8
	Média	5.2	0.5	5.7
SB0121	1	3.7	-0.2	3.5
	2	4.4	-2.2	2.2
	3	3.8	1.0	4.7
	Média	3.9	-0.5	3.5
SB0295	1	3.8	-0.9	2.9
	2	3.4	1.1	4.6
	3	3.8	1.3	5.1
	Média	3.7	0.5	4.2
BR024	1	0.2	0.0	0.2
	2	0.6	-0.3	0.4
	3	-0.5	1.1	0.6
	Média	0.1	0.3	0.4

Existem poucos trabalhos que descrevem a cinética de morte térmica das micobactérias, em especial do *Mycobacterium bovis*, principalmente após a década de 60. Não foi encontrado dados sobre resistência térmica de *Mycobacterium bovis* no Brasil.

Kells e Lear (1960) construíram a curva de sobreviventes do *M. tuberculosis* var. *bovis* e, embora não esteja claro o valor  $D_{61,6^{\circ}\text{C}}$  encontrado, pode-se deduzir pelos dados mostrados que foi 22,5 segundos. Isso se deduz do fato: o tratamento a 61,6°C eliminou 4 ciclos logarítmicos do agente em 1,5 minuto. Na presente pesquisa, observa-se uma variação entre as repetições de um mesmo isolado; só se

obteve uma redução de grandeza semelhante ao encontrado pelos autores citados (4 ciclos) após 30 minutos de processo, em algumas repetições dos isolados SB0881, SB 0120, SB0121 e SB 0295.

Ao contrário do que foi observado nesta pesquisa, e corroborando com os achados de Kells e Lear (1960) alguns autores mostraram desvitalização completa do inóculo de *M. bovis* (HARRINGTON; KARLSON, 1965; GRANT; BALL; ROWE, 1996; GRANT et al., 1996). Harrington e Karlson (1965) inocularam (não relatam a carga inicial) *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. fortuitum* em leite desnatado e avaliaram a sobrevivência frente às temperaturas 62,8/30min. e 71,7°C/15 seg. Grant, Ball e Rowe (1996) partiram de inóculo de  $10^7$ /mL de *M. fortuitum* NCTC 10394 e *M. bovis* T/94/163C em leite tratado a 63,5°C/30 min. Grant et al. (1996) registraram inativação de  $10^7$  UFC/mL de *M. bovis* em 20 min. a 63,5°C e de  $10^4$  UFC/mL em 10 min., na mesma temperatura.

Em concordância com o presente resultado, Nishimoto (2006) e Starikoff (2006) não registraram redução de *M. fortuitum* (NCTN 8573) para níveis abaixo do detectável (<10 UFC/mL) após a pasteurização lenta (65°C/30 min.) em leite de vaca e cabra, respectivamente, independentemente de ser integral ou desnatado, embora tenham constatado que a gordura exerceu um efeito protetor sobre o agente; a redução foi maior no leite desnatado. Nishimoto (2006) observou redução de 1,7 Log UFC/mL de *M. fortuitum* em leite integral submetido à 65°C/30 min. e Starikoff (2006) registrou redução de 2,9 Log UFC/mL nas mesmas condições, em leite de cabra. Esses dados assemelham-se às reduções detectadas na presente pesquisa: entre 0,4 a 5,7 Log UFC/mL nos diferentes isolados.

Sobre a resistência do *M. paratuberculosis*, Grant et al. (1996) detectaram sobreviventes em 96% das amostras inoculadas (27/28) com  $10^7$  UFC/mL, e 50% (14/28) das amostras com  $10^4$  UFC/mL, submetidas à 63,5°C. É interessante apontar que os autores também detectaram grande redução nos primeiros 10 minutos; após esse tempo, pouca alteração da carga microbiana foi observada até os 30 minutos finais. O tratamento a 71,7°C/15 seg. reduziu de 5 a 6 ciclos logarítmicos quando a contaminação inicial era de  $10^7$  UFC/mL, e de 2 a 3 ciclos, partindo de  $10^4$  UFC/mL. Isso sugere que a eficácia da pasteurização pode variar, dependendo do tamanho do inóculo.

A eficácia observada em processos experimentais de pasteurização pode sofrer outras interferências como mostram os resultados de Sung e Collins (1998). Os autores mostraram que a inoculação em substrato já aquecido à temperatura alvo, altera o resultado: quando inocularam *M. paratuberculosis* em substrato não aquecido, houve redução de 1 Log UFC/mL após 90 seg. a 71°C; quando a inoculação foi feita no substrato já aquecido à essa temperatura, a redução foi de 6 Log UFC/mL nos 90 segundos. O valor  $D_{65^{\circ}\text{C}}$  obtido foi igual a 38,9 segundos para o *M. paratuberculosis* inoculado em leite já aquecido à 65°C. Os resultados apresentados pelos autores sugerem que o agente seja capaz de se “adaptar” à temperatura em elevação, durante a fase de aquecimento, talvez produzindo alguma proteína de choque térmico que o protegeria dos efeitos deletérios do calor.

Pearce et al. (2001) estudaram 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) testaram 20 partidas de leite contaminado com *M. paratuberculosis* ( $10^3$  a  $10^4$  UFC/mL) aos binômios 72°C/15 seg., 75°C/25 seg. e 78°C/15 seg e obteve redução superior a 4 UFC/mL em 14% dos testes e superior a 6 Log UFC/mL em 85% deles.

Grant et al. (2005) estudaram a viabilidade do *M. paratuberculosis* em leite com  $10^1$  a  $10^5$  cels/mL (com e sem a tecnologia de homogeneização), usando uma planta comercial piloto de pasteurização rápida. Em 96,7% das amostras (n=816) pasteurizadas houve inativação completa do inóculo; mais freqüentemente nas amostras homogeneizadas. Os resultados sugeriram, segundo os autores, que a homogeneização desagruparia as micobactérias, o que explicaria a maior inativação obtida quando a pasteurização foi realizada no leite homogeneizado.

As divergências das informações sobre a resistência térmica do *M. Avium* subsp. *paratuberculosis* em leite foi alvo de uma revisão crítica, realizada por Lund, Gould e Rampling (2002). Concluíram que as diferenças nos resultados obtidos por vários autores (que variam de < 2 reduções decimais à > 10 considerando 63°C/30 min) podem estar relacionadas às diferenças entre as cepas empregadas, o tratamento dado ao inóculo, os métodos de pasteurização experimental realizados, aos meios



de cultura empregados para recuperação/contagem do agente, entre outros. Também o método de quantificação do agente foi reportado como fator que determina diferença nos resultados de resistência térmica, conforme observado por Sung e Collins (1998).

Nessa linha de raciocínio, o significado da diferença entre os dados de resistência térmica do *M. bovis* encontrados na presente pesquisa e os reportados na literatura são de difícil compreensão, pois também foram obtidos em condições diversas (cepa empregada, carga inicial do agente, substrato empregado, sistema de simulação da pasteurização, meio de cultura e métodos de enumeração do agente, etc.).

Deve-se ter em mente, desta forma, que os resultados encontrados nesta pesquisa não são suficientes para estabelecer a resistência de *M. bovis* isolado de campo à pasteurização lenta, mas enfatizam a importância de dar continuidade a esse tipo de estudo.

Para finalizar, considerando os dados encontrados nessa pesquisa, pode-se 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. Especialmente se considerado que a pasteurização lenta é largamente empregada para a fabricação de queijos, o que determina uma concentração dos sólidos e, provavelmente do eventual *M. bovis* presente.

**CONCLUSÕES**

## 6 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 (30 minutos a 65°C).

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

O processo completo da pasteurização lenta, nas condições do estudo, foi capaz de reduzir entre 3,5 e 5,7 LOG UFC/mL dos espoligotipos testados, exceto o BR024 que reduziu apenas 0,4 Log UFC/mL, o que sugere que o processo pode não garantir a inocuidade do produto.

**REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, R. M. C. M. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. **Archives of Veterinary Science**, v. 4, n. 1, p. 5-15, 1999.

BALIAN, S. C.; PINHEIRO, S. R.; GUERRA, J. L.; MORAIS, Z. M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Estudo comparativo de dois métodos de descontaminação na pesquisa de micobactérias. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 69, n. 2, p. 11-14, 2002.

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.

BLANCO, R. M.; INAMARU, V. T. G.; MARTINS, M. C.; GIAMPAGLIA, C. M. S.; UEKI, S. Y. M.; CHIMARA, E.; YOSHIDA, J. T. U.; TELLES, M. A. S. Estratégias para a identificação de espécies do complexo *Mycobacterium fortuitum*. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo: v. 61, n. 2, p. 91-96, 2002.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretária de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa DAS n. 6, de 08 de janeiro de 2004. Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 3, p. 408-411, 2005.

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

CARVALHO, M. G. X. **Características físico-químicas e microbiológicas do leite de cabra processado em micro usinas da região da Grande SP**. 1998. 102 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

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.

CORREA, W. M.; CORREA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992.

DONNELLY, C. W.; BRIGGS, E. H. Psychrotrophic 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.

FALKINHAM III, J. O. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2, p. 177-215, 1996.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. In: **Controle do desenvolvimento microbiano nos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 111-115.

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. **Letters in applied Microbiology**, v. 22, n. 02, p. 253-256, 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.

HARRINGTON, R.; KARLSON, A. G. Destruction of various kinds of mycobacteria in milk by pasteurization. **Applied Microbiology**, v. 13, n. 03, p. 494-495, 1965.

HUEBNER, R. J.; JELLISON, W. L.; BECK, M. D.; WILCOX, F. P. Q fever studies in southern California: effects of pasteurization on survival of *Coxiella burnetii* in naturally infected milk. **Public Health Reports**, v. 64, n. 16, 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.

KELLS, H. R.; LEAR, S. A. Thermal death time curve of *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* in artificially infected milk. **Applied Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 234-236, 1960.

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

KLEEBERG, H. K. Tuberculosis humana de origem bovina y salud publica. **Revue Scientifique et Technique International Office of Epizootics**, v. 3, n.04 , p. 55-76, 1984.

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, **Mémoires 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.

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, 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. 75, n. 4, p. 336-343, 1993.

MCDONALD, W. L.; O'RILEY, K. J.; SCHROEN, C. J.; CONDRON, R. Heat Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in Milk. . **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 04, p. 1785-1789, 2005.

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. 02, p. 3070-3073, 1992.

NISHIMOTO, E. J. **Efeito da gordura do leite de vaca sobre o valor  $D_{65^{\circ}\text{C}}$  do *Mycobacterium fortuitum***. 2006. 81 f. Tese ( Mestrado em Medicina Veterinária) - 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. 01, p. 147-173, 1927.

PARDO, R. B.; LANGONI, H.; MENDONÇA, L. J. P. Isolamento de *Mycobacterium* spp. Do leite de vacas suspeitas e positivas para tuberculose. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 284-287, 2001.

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

PIERCE, E. L.; TRUONG, H. T.; CRAWFORD, R. A.; YATES, G. F.; CAVIGNAC, S.; LISLE, G. W. Effect of turbulent-flow pasteurization on survival of *Mycobacterium*

*avium* subsp. *Paratuberculosis* added to raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 09, p. 3964-3969, 2001.

PORTO, E. **Microbiologia do leite**. 1998. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/TecnologiaLeite.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2009.

SÃO PAULO. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Resolução SAA 24, de 02 de agosto de 1994. **Normas técnicas sobre as condições higiênico-sanitárias mínimas necessárias para a aprovação, funcionamento e reaparelhamento dos estabelecimentos de produtos de origem animal**. 1994. Disponível em: <<http://www.cda.sp.gov.br/www/legislacoes/index.php#>>. Acesso em: 12 jul 2009.

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. 02, p. 10-15, 2003.

STARIKOF, K. R. **Efeito da gordura do leite de cabra sobre o valor D<sub>65°C</sub> do *Mycobacterium fortuitum***. 2006. 83 f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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

TEIXEIRA NETO, R. O. Avaliação dos processos térmicos utilizando o método genérico. In: CURSO DE ESTERILIZAÇÃO DE ALIMENTOS, 2000, Campinas. 2000. Cap. 4.