

MYCOBACTERIUM AVIUM SUBESP. PARATUBERCULOSIS: UMA PREOCUPAÇÃO PARA A INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS

Márcio Ferraz Cunha¹
Cristiano Augusto Ballus²

RESUMO

Mycobacterium avium subesp. *paratuberculosis* é conhecida como o agente etiológico da doença de *Johne*, ou paratuberculose, que afeta principalmente animais ruminantes. É integrante da família *Mycobacteriaceae*, da qual também fazem parte a *M. tuberculosis* e a *M. bovis*, responsáveis pela tuberculose humana e bovina, respectivamente. Foi sugerido que a *M. paratuberculosis* poderia estar envolvida na patogênese da doença de *Crohn*, a qual possui sintomas similares à paratuberculose, mas afeta seres humanos. Como o microrganismo pode ser excretado no leite de animais infectados, o primeiro passo foi avaliar a sua termoresistência. Alguns estudos indicaram que a bactéria sobrevive ao tratamento térmico da pasteurização HTST (72°C/15 s). Entretanto, os estudos existentes na literatura científica até o momento não permitem afirmar que *M. paratuberculosis* seja responsável pela doença de *Crohn*, bem como apresentam dúvidas sobre a termoresistência dessa bactéria. A realização de mais pesquisas sobre este microrganismo é de fundamental importância, com o objetivo de orientar a produção de produtos lácteos isentos de contaminação por *M. paratuberculosis*.

Palavras-chave: *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis*; doença de *Crohn*; termoresistência; leite; pasteurização HTST.

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas técnicas analíticas para identificação de microrganismos, bem como estudos mais aprimorados para a determinação dos agentes etiológicos das doenças de origem alimentar em humanos, forneceu informações que comprovaram a participação de determinados microrganismos anteriormente não envolvidos neste tipo de enfermidade. Um exemplo típico deste fato é a relação da bactéria *Listeria monocytogenes*, microrganismo patogênico conhecido há muito tempo pelos microbiologistas da área de Medicina Veterinária, na eclosão de diversos surtos de listeriose humana na década de 80.

Mycobacterium avium subesp. *paratuberculosis* causa um tipo característico de doença em animais ruminantes, incluindo bovinos e caprinos, denominada doença de *Johne* ou paratuberculose, caracterizada pela inflamação crônica do intestino. Este tipo de doença já foi observado em alguns animais monogástricos como cachorros e suínos, assim como em algumas espécies de primatas (HERMON-TAYLOR, 2001; DONAGHY et al., 2008).

Embora ainda não seja classificada como uma

zoonose, algumas pesquisas detectaram indícios da presença da *M. paratuberculosis* na biópsia de intestinos com a doença de *Crohn*. Essa doença apresenta características clínicas similares às da paratuberculose. Desta maneira, caso a *M. paratuberculosis* esteja, de fato, associada à doença de *Crohn* e que pode estar disseminada em tecidos e órgãos de animais infectados, o leite poderia ser veículo deste agente, principalmente se for comprovada a sua possível resistência à pasteurização. O objetivo deste trabalho foi levantar e comentar aspectos importantes sobre *M. paratuberculosis*, suas principais características, a sua relação com a doença de *Crohn* e resistência a tratamentos térmicos com base em dados da literatura científica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa bibliográfica foi feita em artigos das bases de dados da *Commonwealth Agricultural Bureaux International (CAB)*, *Food Science Technology Abstracts (FSTA)* e *MEDLINE-PUBMED*, publicados no período de 1996 a 2009, sendo selecionados os artigos que continham os critérios de inclusão e as variáveis de interesse.

1 Curso Nutrição-Bloco Z, UNIUBE- Campus Aeroporto, Av. Nenê Sabino, 1801, 38050-501, Uberaba-MG; marcio.cunha@uniube.br

2 Mestrado em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Rua Monteiro Lobato 80, 13083-862, Campinas-SP.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DA *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBESP. *PARATUBERCULOSIS*

O gênero *Mycobacterium* compreende mais de setenta espécies, sendo as mais conhecidas *M. tuberculosis* e *M. bovis*, responsáveis pela tuberculose humana e bovina, respectivamente. A *M. avium* subesp. *paratuberculosis* foi descrita pela primeira vez na Alemanha, no ano de 1895. É um bacilo aeróbio, imóvel, não esporulado, Gram-positivo, com dimensão aproximada de 2 mm por 0,5 mm, com alto teor de ácidos micólicos na sua parede celular. Em função da presença deste material ceroso em sua superfície, trata-se de uma célula álcool-ácido resistente. Além disso, essa estrutura um pouco diferenciada torna a célula difícil de ser rompida para a extração do DNA em análises por reação de polimerase em cadeia (PCR) (GRANT, 2005).

O genótipo desta bactéria difere da espécie *M. avium* pela presença de um elemento de inserção (IS) denominado IS900. Por esta razão, a *M. paratuberculosis* é considerada como membro da espécie *M. avium*, sendo seu nome retificado como *M. avium* subesp. *paratuberculosis*. Existem diferenças fenotípicas entre estas duas bactérias: *M. avium* subesp. *paratuberculosis* é mais exigente quando cultivada *in vitro* e mais virulenta que a *M. avium* (COLLINS, 1997).

O crescimento *in vitro* da *M. avium* subesp. *paratuberculosis* requer condições especiais, como o emprego de meios de cultivo próprios, presença de um sideróforo, a micobactina, elemento quelante de ferro que aumenta a biodisponibilidade deste elemento quando este encontra-se em pequenas concentrações no meio. O tempo necessário para contagem e isolamento nos meios de cultura convencionais é longo, cerca de dois a oito meses, principalmente quando a bactéria é submetida a algum *stress* físico como o emprego do calor. Em função disso, muitos estudos empregam técnicas que detectam a presença de material genético em amostras mediante a tecnologia fundamentada na PCR. Este procedimento é mais rápido e caracteriza-se por apresentar um alto grau de exatidão para a identificação do micorganismo (GRANT et al., 2001; NIELSEN, 2008; SLANA et al., 2008).

3.2 *M. PARATUBERCULOSIS* E A DOENÇA DE CROHN

M. paratuberculosis é reconhecidamente o agente etiológico da paratuberculose ou doença de *Johne*, enterite granulomatosa crônica, processo infeccioso que ocorre na porção terminal do íleo. As

lesões do intestino delgado caracterizam-se por espessamento acentuado da mucosa, assumindo um aspecto rugoso e aumento de tamanho dos linfonodos mesentéricos. Após um longo período de incubação, cerca de dois a três anos, a doença manifesta-se com diarreia e perda de peso dos animais, sem apresentar sinais de febre (COLLINS, 1997; MIKKELSEN, JUNGENSEN e NIELSEN, 2009). No Brasil, a paratuberculose está associada à importação de bovinos infectados, entretanto, os relatos são esporádicos e impedem uma estimativa das perdas econômicas em rebanhos infectados (LEITE et al., 2003; LILENBAUM, MARASSI e OELEMANN, 2007). Driemeier et al. (1999) encontraram oito casos de paratuberculose em um rebanho de 345 bovinos, no estado do Rio Grande do Sul.

M. paratuberculosis sobrevive por muito tempo no meio ambiente, e acredita-se que esta bactéria permaneça no interior de organismos como as amebas. Assim, multiplicar-se-ia e poderia tornar-se resistente a biocidas, resultando em um fenótipo com maior potencial patogênico para os humanos (HERMON-TAYLOR, 2001). Whan et al. (2005) realizaram um estudo na Irlanda do Norte, e avaliaram a presença de *M. paratuberculosis* em águas não tratadas coletadas em estações de tratamento de água durante um ano. Foram testadas 192 amostras de água não tratada, das quais 8% apresentaram resultado positivo para *M. paratuberculosis*. Com base nesses resultados verificou-se a necessidade de avaliar a eficiência dos processos empregados no tratamento da água para de eliminação ou remoção do micorganismo, já que se observou a presença da bactéria no ambiente, contaminando inclusive a água.

A doença de *Crohn* é um processo crônico inflamatório, ocorre no trato digestivo de humanos, principalmente na porção íleo terminal, como acontece com a paratuberculose. Alguns aspectos da doença de *Crohn* são semelhantes aos da paratuberculose, porém existem diferenças consideráveis entre estas duas enfermidades (Tabela 1).

A etiologia da doença de *Crohn* não está totalmente elucidada, entretanto, estudos epidemiológicos indicaram alguns fatores, como predisposição genética dos indivíduos, resposta imune deficiente e a ação de determinados fatores externos, agentes químicos ou microbiológicos (SELBY, 2000). Hermon-Taylor (2001) relatou duas pesquisas em que foi observada a presença do IS900 em 86% dos pacientes submetidos à cirurgia de intestino associada à doença de *Crohn* e a presença do mesmo elemento de inserção no leite materno de duas mães portadoras da doença.

Em testes imunológicos realizados na Universidade da Flórida com 108 indivíduos, 61 pacientes com a doença de *Crohn* e 47 indivíduos

"controle", 35 sem nenhuma história de doenças no trato gastrointestinal e 12 diagnosticados com colite ulcerativa, foi evidenciada presença maior de antígenos p35 e p36, proteínas expressas por genes encontrados na bactéria *M. paratuberculosis*, nos indivíduos com a doença ($p < 0,001$). Uma maior porcentagem de soropositivos (93%) foi observada em indivíduos que apresentavam o antígeno p36, e este mesmo antígeno foi detectado em apenas quatro indivíduos do grupo controle (11%) (NASER, SHAFRAN e EL-ZAATARI, 1999). Em estudos posteriores, observou-se a presença da bactéria pela identificação de fragmentos IS900 pela técnica de PCR, no sangue e na porção do íleo do intestino delgado de indivíduos com a doença em maior proporção do que no de indivíduos sem nenhuma história de enfermidade no sistema gastrointestinal (BULL et al., 2003; NASER et al., 2004).

Apesar de alguns pesquisadores admitirem que a *M. paratuberculosis* seja um dos possíveis agentes etiológicos da doença de *Crohn*, as pesquisas apresentadas na literatura científica não permitem concluir se relação dessa bactéria com a doença é causal ou mera coincidência. Em dois artigos de revisão sobre a patogenia e as causas da doença de *Crohn*, os autores questionaram a importância de *M. paratuberculosis* no desenvolvimento da doença, considerando algumas observações na literatura científica, como a presença do elemento IS900 em grupos de indivíduos sem a doença, considerados como grupo controle, e a não detecção da bactéria em tecidos entéricos acometidos pela doença, por meio da análise microscópica convencional e eletrônica (SELBY, 2000; ACHESON, 2001).

Bernstein et al. (2004) estudaram diferentes grupos de pessoas no Canadá para a presença de anticorpos contra *M. paratuberculosis*, grupo controle, grupo com doença de *Crohn*, grupo com colite ulcerativa e familiares controles. A análise foi realizada por meio do teste ELISA, modificado para ser usado em humanos. A prevalência dos anticorpos para *M.*

paratuberculosis em todos os grupos foi de, aproximadamente, 35%, e não houve diferença significativa entre os grupos. Porém, os autores concluíram que, em função desta alta prevalência de *M. paratuberculosis* na população, é bem possível que a bactéria seja necessária, mas não suficiente, para causar alguns casos da doença de *Crohn*. Assim, uma associação entre *M. paratuberculosis* e a doença de *Crohn* permanece inconclusiva. Da mesma forma Ellingson et al. (2003) comparando tecidos de bovinos com doença de *Johne* e de humanos com síndrome de *Crohn* por meio de métodos histológicos, imunocitoquímicos e PCR, verificaram presença da *M. paratuberculosis* em todos os tecidos afetados pela doença de *Johne*, mas estavam ausentes nos tecidos acometidos pela síndrome de *Crohn*. Com estes resultados, concluíram que *M. paratuberculosis* não estava associada com as lesões provocadas pela doença de *Crohn* naqueles tecidos, e que a síndrome de *Crohn* e a doença de *Johne* possuem etiologias distintas.

A associação da doença de *Crohn* e a presença da bactéria *M. paratuberculosis* é motivo de controvérsia no meio científico. Em um artigo publicado na revista *Gut*, Sartor (2005) fez um comentário lúcido, imparcial, em que apresentou as dificuldades no esclarecimento deste assunto e a preocupação em resolver o mais breve este impasse para que as autoridades de saúde tomem as devidas providências. O autor do artigo ressaltou alguns argumentos a favor e contra a associação da doença de *Crohn* com a presença da bactéria (Quadro 1).

3.3 *Mycobacterium paratuberculosis* e o leite

A excreção de *M. paratuberculosis* dá-se principalmente pelas fezes de bovinos contaminados e, em menor escala, pelo leite. A bactéria pode disseminar-se em diversas partes do corpo, como pulmão, rins, fígado e outros compartimentos, podendo, desta forma, contaminar uma grande variedade de produtos de origem animal. Estudos

Tabela 1 – Similaridades e diferenças entre a Doença de *Johne* e a Doença de *Crohn*.

Manifestações clínicas e outros indicadores	Paratuberculose (Doença de <i>Johne</i>)	Doença de <i>Crohn</i>
Infecção íleo terminal	Sim	Sim
Espessamento da mucosa intestinal	Sim	Sim
Presença de granulomas	Sim	Sim
Perda de massa corporal	Sim	Sim
Diarréia	Sim	Sim
Presença da bactéria (microscopia)	Sim	Não
Febre	Sim	Não
Dor abdominal	Sim	Não
Presença de fistulas	Sim	Não
Anticorpos <i>M. paratuberculosis</i>	Sim	Não

Fonte: Adaptado de Selby (2000).

para avaliar a incidência de *M. paratuberculosis* em alimentos e a capacidade dos processos de conservação na eliminação deste microrganismo são necessários em razão dos possíveis efeitos nocivos à população (COLLINS, 1997). Grant (2005) comentou que a animais portadores doença de *Johne* clínicos e com infecção subclínica são sabidamente acometidos pela *M. paratuberculosis*. Além disso, esta bactéria está presente não apenas em leite da espécie bovina, mas também em leites de outros mamíferos afetados pela doença de *Johne*.

A maioria das pesquisas concentrou-se na avaliação da termoresistência da bactéria à pasteurização do leite. Em 1993, dois pesquisadores britânicos foram os primeiros a verificar a termoresistência desta bactéria, ao simularem a pasteurização do leite em escala laboratorial. Os pesquisadores observaram que de 3 a 100% da bactéria inoculada no leite cru, na ordem de 10^4 UFC/mL, sobreviveram após o leite ser submetido a uma temperatura de $71,7^\circ\text{C}$, durante 15 s em banho-maria com temperatura controlada (COLLINS, 1997). O tempo de resfriamento do leite e o tipo de estirpe de *M. paratuberculosis* tiveram influência na sua capacidade de sobreviver ao tratamento térmico.

Para avaliar a inativação térmica de *M. paratuberculosis* sob temperatura de pasteurização, Grant et al. (1996) testaram 11 linhagens da bactéria, inoculadas em leite bovino em concentrações de 10^7 e 10^4 UFC/mL. O tratamento térmico foi realizado de duas formas: temperatura de $63,5^\circ\text{C}$, por 30 min, com a amostra alocada em tubos de ensaio, imersos em banho-maria com temperatura controlada; temperatura de $71,7^\circ\text{C}$ por 15 s, em um pasteurizador

HTST de escala laboratorial. Foram empregados também tempos de aquecimento de 5, 10, 15, 20 e 40 min a $63,5^\circ\text{C}$, para a construção de uma curva de morte térmica. Para o leite inoculado com 10^6 a 10^7 UFC/mL, foram encontradas células viáveis em 96% das amostras para o método dos tubos de ensaios e em 85% das amostras para o método em que utilizou o pasteurizador de laboratório. Para as amostras inoculadas com 10^3 a 10^4 UFC/mL da *M. paratuberculosis*, 50% apresentaram células viáveis para o teste com tubos de ensaio, enquanto 58% continham células viáveis no caso do pasteurizador laboratorial. A curva de morte térmica revelou uma redução considerável no número de microrganismos nos primeiros minutos, mas em seguida, a queda foi interrompida, e o número de células viáveis apresentou redução muito lenta. Assim, células viáveis da *M. paratuberculosis* poderiam estar presentes mesmo após a pasteurização. Os pesquisadores sugeriram como explicação para o comportamento da curva de morte térmica o fato de que *M. paratuberculosis* poderia estar formando pequenos aglomerados, o que resultaria na sua maior resistência térmica. O aglomeramento também poderia ter sido favorecido pelo fato de não ter ocorrido agitação durante o tratamento térmico, além de ser uma característica de *M. paratuberculosis*.

Stabel, Steadham e Bolin (1997) realizaram experimentos similares aos estudos de Grant et al. (1996). Os pesquisadores utilizaram o método dos tubos de ensaio e o do pasteurizador de laboratório, com inóculos de *M. paratuberculosis* de 10^4 e 10^6 UFC/mL. A diferença foi que o pasteurizador de laboratório utilizado era uma versão em miniatura

Quadro 1 – Argumentos a favor e contra a associação de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (MAP) com a Doença de *Crohn*.

Argumentos a favor:

- Similaridades clínica e patológica entre Doença de *Crohn* e Doença de *Johne*;
- Presença da bactéria na cadeia alimentar (leite e carnes) e mananciais de água;
- Um número significativo de pesquisas detectou a presença de MAP em tecidos de indivíduos com a Doença de *Crohn* utilizando diversos tipos de procedimentos analíticos (PCR, isolamento e contagem em meio de cultura);
- Detecção de MAP em leite materno utilizando meios de cultura e a técnica de PCR;
- O uso de antibióticos específicos promove uma melhora no quadro clínico do indivíduo com Doença de *Crohn*.

Argumentos contra:

- Diferenças no tratamento da Doença de *Crohn* e Doença de *Johne*;
 - Não há evidência de transmissão da bactéria de animais contaminados para humanos;
 - Genótipo das espécies de MAP isoladas de animais infectados e de indivíduos com a doença de *Crohn* não são similares;
 - Uso de antibióticos convencionais não promove a melhora no quadro clínico do indivíduo com Doença de *Crohn*;
 - Falta de estudos epidemiológicos que evidenciem a associação de MAP com a Doença de *Crohn*;
-

extremamente acurada de um pasteurizador industrial, e o escoamento do líquido era do tipo turbulento. O emprego do pasteurizador de laboratório a 72°C, por 15 s, inativou todas as células de *M. paratuberculosis*, o que indicou que a veiculação de células viáveis da bactéria, de animais para humanos, por meio da ingestão de produtos lácteos pasteurizados era improvável, minimizando a ameaça deste microrganismo como um agente zoonótico da doença de *Crohn*. Os autores argumentaram que seus resultados diferiram do estudo de Grant et al. (1996) em função de que, neste último, o pasteurizador piloto não possuía escoamento turbulento, com o leite permanecendo estático. O estudo realizado por Stabel, Steadham e Bolin (1997) indica que o escoamento turbulento do leite durante a pasteurização é de fundamental importância para a inativação completa de *M. paratuberculosis*. Grant, Ball e Rowe (1998) também estudaram o efeito da pasteurização HTST (72°C/15 s) sobre o leite com números reduzidos de células de *M. paratuberculosis* ($d'' 10^3$ UFC/mL). Os autores constataram 14,8% de sobreviventes para leite inoculado com 10^3 UFC/mL e 10% para leite inoculado com 10^2 UFC/mL. Nenhuma célula viável foi recuperada das amostras inicialmente contaminadas com 10 UFC/mL ou 10 UFC/50 mL. Deve-se salientar, entretanto, que o equipamento utilizado neste estudo, pasteurizador piloto de laboratório, foi o mesmo empregado no estudo anterior destes autores, em que o leite permaneceu estático durante o tratamento térmico. Os autores sugeriram a equivalência dos métodos com ou sem escoamento turbulento, com base na inativação total da fosfatase alcalina. Afirmaram ainda que, mesmo que as partículas que compõem o produto sejam aquecidas em graus ligeiramente diferentes, todas elas receberam o tratamento térmico mínimo necessário para a pasteurização do leite.

Pearce et al. (2001) avaliaram o efeito da pasteurização com escoamento turbulento validado, com número de Reynolds 11.050, sobre a sobrevivência da *M. paratuberculosis* inoculado intencionalmente ao leite cru. Para o escoamento turbulento ser considerado validado, o número de Reynolds deve ser maior que 3.000. Foram avaliadas cinco linhagens neste estudo. Os autores constataram que nenhuma célula foi recuperada nas amostras submetidas ao tratamento de 72°C, por 15 s. Apenas uma linhagem sobreviveu a 69°C. A média extrapolada para o valor $D_{72^\circ\text{C}}$ foi $< 2,03$ s, o que representa uma redução equivalente a $> 7 \log_{10}$, a 72°C, por 15 s com intervalo de confiança de 95%. Assim, os autores afirmaram que o manuseio e a manutenção adequada do equipamento podem garantir a ausência de células viáveis de *M. paratuberculosis* no leite e em outros produtos lácteos pasteurizados disponíveis no comércio.

Grant et al. (2002a) realizaram outro estudo, empregando leite naturalmente inoculado com *M. paratuberculosis*, o qual foi pasteurizado em um

pasteurizador de escala comercial, capacidade de 2.000 L/hora, em 12 ocasiões diferentes. Os autores observaram que a homogeneização contribuiu para a um aumento do grau de letalidade do tratamento térmico, além de que um período maior de tempo de pasteurização, de 25 segundos, poderia ser mais efetivo para a inativação de *M. paratuberculosis* do que o tempo padrão de 15 segundos. Os resultados deste estudo reforçaram que células viáveis de *M. paratuberculosis* poderiam sobreviver à pasteurização quando presentes no leite cru em número suficiente. No pasteurizador de escala comercial, o escoamento do leite foi do tipo turbulento, o que permitiu eliminar a alegação anterior de que a sobrevivência da bactéria estava associada ao tipo de escoamento empregado no estudo. Porém, no estudo conduzido por Lynch et al. (2007), não houve diferença na letalidade dos tratamentos com ou sem homogeneização anterior à pasteurização, pois em ambos os casos não foram encontradas células viáveis da bactéria.

McDonald et al. (2005) constataram que a pasteurização realizada em pasteurizador contínuo e com escoamento turbulento reduziu o número de células viáveis de *M. paratuberculosis* em pelo menos $4 \log_{10}$. Todos os binômios de temperaturas e tempos de pasteurização avaliados no estudo, 72, 75 e 78°C, por 15, 20 e 25 s, foram efetivos para a inativação de *M. paratuberculosis*, com reduções superiores a $6 \log_{10}$ em 85% das avaliações, e superiores a $4 \log_{10}$ em 14% das avaliações.

Ao usar um pasteurizador HTST comercial em escala piloto, Grant et al. (2005a) avaliaram o efeito de várias condições de tempo/temperatura em conjunto com a homogeneização sobre a inativação da *M. paratuberculosis* no leite. Em 96,7% das amostras, *M. paratuberculosis* foi completamente inativado pela pasteurização HTST, com ou sem homogeneização. Entretanto, o emprego da homogeneização resultou em um número menor de culturas positivas. O impacto da homogeneização sobre os agrupamentos de células de *M. paratuberculosis* também foi avaliado empregando-se um espectrômetro específico, e foi demonstrado que os grandes agrupamentos foram reduzidos a células únicas ou "mini-agrupamentos" após homogeneização a 2.500 lb/in². Com o desagrupamento das células, o tratamento térmico promoveu uma maior inativação da bactéria.

Cerf, Griffiths e Aziza (2007) desenvolveram um modelo quantitativo que descreve a probabilidade de encontrar a bactéria em leite pasteurizado sob as condições prevalentes nos países industrializados. Eles chegaram a conclusão que a probabilidade de encontrar *M. paratuberculosis* em amostras de 50 mL de leite pasteurizado é menor a 1%.

A remoção de *M. paratuberculosis* por outros métodos físicos também foi avaliada. Grant et al.

(2005b) estudaram o efeito da centrifugação e da microfiltração, por meio de simulações de laboratório. Observou-se uma remoção de 95,0 a 99,9% de células de *M. paratuberculosis* por meio da centrifugação, a 7000 g, por 10 segundos, de leite pré-aquecido a 60°C, e por meio da microfiltração usando-se filtro com diâmetro de poros de 1,2 µm. Portanto, estes métodos poderiam ser empregados como pré-tratamento na indústria de laticínios, de forma a reduzir a contaminação do leite cru com *M. paratuberculosis*. Donaghy et al. (2007) verificaram que o uso de altas pressões foi efetivo na redução do número de células viáveis da bactéria no leite.

Donaghy, Totton e Rowe (2004) produziram queijo *Cheddar* com leite pasteurizado inoculado intencionalmente com diferentes concentrações de diferentes linhagens de *M. paratuberculosis*, com o objetivo de avaliar a sobrevivência das células bacterianas durante 27 semanas de maturação. No primeiro dia após o preparo dos queijos, observou-se que houve efeito da concentração sobre a quantidade de células de todas as linhagens de *M. paratuberculosis*. Após a maturação iniciou-se um decréscimo do número, e nos queijos em que a contaminação no primeiro dia foi alta, superior a 3,6 log₁₀, o microrganismo foi detectado mesmo após 27 semanas de maturação. Quando a contaminação inicial era baixa, apenas uma linhagem foi cultivada após as 27 semanas. Outro detalhe interessante é que *M. paratuberculosis* foi recuperada do soro de 10 dos 12 queijos, independente da contaminação inicial.

Outro estudo avaliando o efeito de fatores envolvidos na produção de queijos, pH, cloreto de sódio e aquecimento, sobre a viabilidade de *M. paratuberculosis* foi realizada por Sung e Collins (2000). Os resultados evidenciaram que o cloreto de sódio teve pouco ou nenhum efeito sobre a inativação da bactéria, enquanto que o pH apresentou correlação positiva entre baixos valores e o decréscimo do valor D de *M. paratuberculosis*. O tratamento térmico do leite cru diminuiu o valor D comparado ao das células que não foram submetidas ao tratamento térmico (SUNG e COLLINS, 2000). Stephan et al. (2007) não encontraram células viáveis da *M. paratuberculosis* em amostras de diferentes tipos de queijos comercializados na Suíça.

Algumas maneiras de evitar a disseminação de *M. paratuberculosis* no rebanho são relativamente fáceis de aplicar. A mais importante delas refere-se à prevenção de contaminações cruzadas cuja origem, em geral, encontra-se nas fezes, de onde o microrganismo consegue facilmente disseminar-se entre os animais. O emprego do estrume sem tratamento adequado como fertilizante em pastagens torna-se uma fonte de contaminação, considerando que *M. paratuberculosis* pode sobreviver no solo por mais de um ano. Os bezerros são mais susceptíveis à contaminação, portanto, o mais adequado é removê-

los logo após o nascimento. É de grande importância separar os animais infectados dos animais não infectados, e dispor as fezes de ambos separadamente. Fontes de água estagnada são reservatórios excelentes para *M. paratuberculosis*, onde pode sobreviver por longos períodos. A melhor maneira de lidar com a doença de *Johnes* é adotar os procedimentos de boas práticas de higiene (STABEL, 1998; RUZANTE et al., 2008).

Em função da possível sobrevivência de *M. paratuberculosis* ao processo de pasteurização do leite, foram realizados estudos para avaliar a presença desta bactéria em leite cru e leite pasteurizado vendido no comércio de vários países. Uma das primeiras avaliações da presença de *M. paratuberculosis* em leite pasteurizado foi realizada na Inglaterra, entre setembro de 1991 e março de 1993 (MILLAR et al., 1996). A metodologia empregada foi a detecção do elemento de inserção IS900 pela técnica de PCR. Após validação do método, foram analisadas amostras de leite bovino pasteurizado proveniente de vários locais da Inglaterra. Dentre 312 amostras, 7% apresentaram resultados positivos para *M. paratuberculosis*. Destas amostras positivas, 81% apresentaram sinal de PCR consistente com a presença de bactérias intactas. Os autores afirmaram, então, que existiria um alto risco de que uma contaminação residual por *M. paratuberculosis* pudesse estar presente em leite bovino pasteurizado na Inglaterra.

Grant, Ball e Rowe (2002b) coletaram, entre março de 1999 e julho de 2000, 244 amostras de leite cru a granel e 567 amostras de leite pasteurizado comercial, 228 integral, 179 semi-desnatado e 160 desnatado, em estabelecimentos localizados por todo o Reino Unido. Células viáveis foram encontradas em 1,6% das amostras de leite cru e em 1,8% das amostras de leite pasteurizado. Como, a princípio, o processo de pasteurização havia sido realizado corretamente, com condições de tempo e temperatura de acordo com a legislação, além do fato de que todas as amostras apresentaram fosfatase negativa e de uma contaminação posterior ser bastante improvável, os autores concluíram que células viáveis de *M. paratuberculosis* poderiam estar presentes em concentrações baixas no leite pasteurizado comercializado no Reino Unido.

Corti e Stephan (2002) examinaram 1384 amostras de leite cru a granel, no período entre fevereiro e junho de 2001, coletadas em 18 diferentes regiões da Suíça, com 41 a 100 amostras por região. A detecção de *M. paratuberculosis* foi realizada por PCR (elemento de inserção IS900). Foi encontrado que 19,7% das amostras apresentaram resultado positivo para o elemento de inserção. A prevalência entre as diferentes regiões da Suíça variou entre 1,7% e 49,2%. Os autores concluíram que a infecção subclínica por *M. paratuberculosis* encontrava-se

amplamente distribuída entre os rebanhos da Suíça, e que *M. paratuberculosis* poderia ser transmitida com frequência a humanos por meio da ingestão de leite cru contaminado.

O'Reilly et al. (2004) avaliaram 389 amostras de leite cru a granel e 357 amostras de leite pasteurizado comercial durante 13 meses, outubro de 2000 a novembro de 2001, na Irlanda do Norte. O DNA da *M. paratuberculosis* foi detectado em 12,9% das amostras de leite cru e em 9,8% das amostras de leite pasteurizado. Entretanto, células viáveis foram cultivadas apenas de uma amostra de leite cru, o que significa que o DNA da *M. paratuberculosis* pode estar presente ocasionalmente, em baixas concentrações, no leite cru e no leite pasteurizado. Ainda considerando que as células viáveis não foram cultivadas a partir de leite pasteurizado, o processo de pasteurização da Irlanda teria sido efetivo para a inativação da bactéria.

Em avaliação realizada na República Tcheca entre novembro de 2002 e abril de 2003 foram analisadas 244 garrafas e caixas de leite pasteurizado comercializadas no país. As amostras foram escolhidas aleatoriamente. No mesmo período, também foi adquirido leite cru e leite submetido a um tratamento térmico mínimo de 71,7°C, por 15 segundos, em uma unidade de pasteurização local, sendo este último proveniente dos rebanhos A e B, com concentrações baixas e altas associadas à infecção subclínica por *M. paratuberculosis*, respectivamente, e um rebanho C, não infectado. Dentre as 244 amostras de leite pasteurizado comercial, 1,6% possuíam células viáveis de *M. paratuberculosis*. A bactéria também foi cultivada de duas amostras das 100 caixas de leite pasteurizado localmente, proveniente dos rebanhos infectados A e B. Do leite proveniente do rebanho C, foram analisadas 100 caixas, todas isentas de células de *M. paratuberculosis*. A bactéria também foi detectada no leite cru de vacas leiteiras infectadas subclínicamente (AYELE et al., 2005).

4 CONCLUSÃO

Os dados apresentados pela literatura científica são inconclusivos sobre a possibilidade de *Mycobacterium paratuberculosis* ser considerado um patógeno de origem alimentar. Sua associação com a doença de *Crohn* em humanos é também, inconclusiva, principalmente em função da ocorrência desta bactéria no intestino de pessoas saudáveis. Quanto à termoresistência, a princípio pode-se sugerir que, quando o leite cru apresenta alto grau de contaminação, o microrganismo pode ser encontrado no leite pasteurizado. Porém há ainda controvérsias entre os resultados das pesquisas disponíveis. Assim, é de fundamental importância a continuidade de pesquisas nesta área com o objetivo de elucidar as

dúvidas ainda existentes. No Brasil, onde o consumo de leite UHT é crescente comparado ao consumo de leite pasteurizado, considera-se importante avaliar a termoresistência da *M. paratuberculosis* às condições de tempo e temperatura empregadas neste tratamento.

SUMMARY

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* is known as the etiologic agent of *Johne's* disease, or paratuberculosis, which affects mostly ruminants. *M. paratuberculosis* belongs to *Mycobacteriaceae* family, which also includes *M. tuberculosis* and *M. bovis*, human and cattle tuberculosis-causing species, respectively. It has been suggested that *M. paratuberculosis* could be involved at *Crohn's* disease pathogenesis, which has symptoms similar to paratuberculosis, but affects humans. As the microorganism may be excreted in the milk of infected animals, the first step was to assess its thermal resistance. Some studies showed that the bacterium could survive to heat treatment of HTST pasteurization (72°C/15 s). However, until this moment, studies from scientific literature don't allow to state that *M. paratuberculosis* is responsible by *Crohn's* disease, as well as they show some doubts about its thermal resistance. More research about this microorganism is of great importance, with the goal of producing dairy products with absence of *M. paratuberculosis* contamination.

Keywords: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*; *Crohn's* disease; thermal resistance; milk; HTST pasteurization.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHESON, D. W. K. An alternative perspective on the role of *Mycobacterium paratuberculosis* in the etiology of *Crohn's* disease. **Food Control**, Amsterdam, v. 12, n. 6, p. 335-338, 2001.
- AYELE, W. Y.; SVASTOVA, P.; ROUBAL, P.; BARTOS, M.; PAVLIKI, I. *Mycobacterium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 71, n. 3, p. 1210-1214, 2005.
- BERNSTEIN, C. N.; BLANCHARD, J. F.; RAWSTHORNE, P.; COLLINS, M.T. Population-based case control study of seroprevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with *Crohn's* disease and ulcerative colitis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 42, n. 3, p. 1129-1135, 2004.
- BULL, T. J.; McMINN, E. J.; SIDI-BOUMEDINE, K.; SKULL, A.; DURKIN, D.; NEILD, P.; RHODES, G.; PICKUP, R.; HERMON-TAYLOR, J. Detection and verification of *Mycobacterium avium* subspecies

- paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without *Crohn's* disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 41, n. 7, p. 2915-2923, 2003.
- CERF, O.; GRIFFITHS, M.; AZIZA, F. Assessment of the prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in commercially pasteurized milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 4, n. 4, p. 433-447, 2007.
- COLLINS, M. T. *Mycobacterium paratuberculosis*: A potential food-borne pathogen? **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 12, p. 3445-3448, 1997.
- CORTI, S.; STEPHAN, R. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. **BMC Microbiology**, London, v. 2, n. 15, p. 1-7, 2002.
- DONAGHY, J. A.; TOTTON, N. L.; ROWE, M. T. Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of Cheddar Cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 70, n. 8, p. 4899-4905, 2004.
- DONAGHY, J. A.; LINTON, M.; PATTERSON, M. F.; ROWE, M. T. Effect of high pressure and pasteurization on *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in milk. **Letters in Applied Microbiology**, Cardiff, v. 45, n. 2, p. 154-159, 2007.
- DONAGHY, J. A.; ROWE, M. T.; RADEMAKER, J. L. W.; HAMMER, P.; HERMAN, L.; DE JONGHE, V.; BLANCHARD, B.; DUHEM, K.; VINDEL, E. An inter-laboratory ring trial for the detection and isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from raw milk artificially contaminated with naturally infected faeces. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 128-135, 2008.
- DRIEMEIER, D.; CRUZ, C. E. F.; GOMES, M. J. P.; CORBELLINI, G.; LORETTI, A. P.; COLODEL, E. M. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 3/4, p. 109-115, 1999.
- ELLINGSON, J. L. E.; CHEVILLE, J. C.; BREES, D.; MILLER, J. M.; CHEVILLE, N. F. Absence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* components from *Crohn's* disease intestinal biopsy tissues. **Clinical Medicine & Research**, Marshfield, v. 1, n. 3, p. 217-226, 2003.
- 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**, Washington DC, v. 62, n. 2, p. 631-636, 1996.
- GRANT, I. R.; BALL, H. J.; ROWE, M. T. Effect of high-temperature, short-time (HTST) pasteurization on milk containing low numbers of *Mycobacterium paratuberculosis*. **Letters in Applied Microbiology**, Cardiff, v. 26, n. 2, p. 166-170, 1998.
- GRANT, I. R.; ROWE, M. T.; DUNDEE, L.; HITCHINGS, E. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: its incidence, heat resistance and detection in milk and dairy products. **International Journal of Dairy Technology**, Oxford, v. 54, n. 1, p. 02-13, 2001.
- GRANT, I. R.; HITCHINGS, E. I.; McCARTNEY, A.; FERGUSON, F.; ROWE, M. T. Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cows' milk. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 68, n. 2, p. 602-607, 2002a.
- GRANT, I. R.; BALL, H. J.; ROWE, M. T. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 68, n. 5, p. 2428-2435, 2002b.
- GRANT, I. R. Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position. **Journal of Applied Microbiology**, Northern Ireland, v. 98, n. 6, p. 1282-1293, 2005.
- 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**, Washington DC, v. 71, n. 6, p. 2853-2861, 2005a.
- GRANT, I. R.; WILLIAMS, A. G.; ROWE, M. T.; MUIR, D. D. Investigation of the impact of simulated commercial centrifugation and microfiltration conditions on levels of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in milk. **International Journal of Dairy Technology**, Oxford, v. 58, n. 3, p. 138-142, 2005b.
- HERMON-TAYLOR, J. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: the nature of the problem. **Food Control**, Amsterdam, v. 12, n. 6, p. 331-334, 2001.
- LEITE, C. Q. F.; ANNO, I. S.; LEITE, S. R. A.; ROXO, E.; MORLOCK, G. P.; COOKSEY, R. C. Isolation and identification of *Mycobacteria* from livestock specimens and milk obtained in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p. 319-323, 2003.
- LILENBAUM, W.; MARASSI, C. D.; OELEMANN, W. M. R. Paratuberculosis: An Update. **Brazilian Journal of**

- Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 580-590, 2007.
- LYNCH, D.; JORDAN, K. N.; KELLY, P. M.; FREYNE, T.; MURPHY, P. M. Heat sensitivity of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in milk under pilot plant pasteurization conditions. **International Journal of Dairy Technology**, Oxford, v. 60, n. 2, p. 98-104, 2007.
- McDONALD, W. L.; O'RILEY, K.; SCHROEN, C. J.; CONDRON, R. J. Heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 71, n. 4, p. 1785-1789, 2005.
- MIKKELSEN, H.; JUNGENSEN, G.; NIELSEN, S. S. Association between milk antibody and interferon-gamma responses in cattle from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infected herds. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 127, n. 3-4, p. 235-241, 2009.
- MILLAR, D.; FORD, J.; SANDERSON, J.; WITHEY, S.; TIZARD, M.; DORAN, T.; HERMON-TAYLOR, J. IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 62, n. 9, p. 3446-3452, 1996.
- NASER, S. S.; SHAFRAN, I.; EL-ZAATARI, F. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Crohn's Disease is serologically positive. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington DC, v. 6, n. 2, p. 282, 1999.
- NASER, S. S.; GHOBRIAL, G.; ROMERO, C.; VALENTINE, J. F. Culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's Disease. **Lancet**, London, v. 364, n. 9439, p. 1039-1044, 2004.
- NIELSEN, S. S. Transitions in diagnostic tests used for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections in cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 132, n. 3-4, p. 274-282, 2008.
- O'REILLY, C. E.; O'CONNOR, L.; ANDERSON, W.; HARVEY, P.; GRANT, I. R.; DONAGHY, J.; ROWE, M. T.; O'MAHONY, P. Surveillance of bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved Irish liquid-milk pasteurization plants to determine the incidence of *Mycobacterium paratuberculosis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 70, n. 9, p. 5138-5144, 2004.
- PEARCE, L. E.; TRUONG, H. T.; CRAWFORD, R. A.; YATES, G. F.; CAVAINAC, S.; DE LISLE, G. W. Effect of turbulent-flow pasteurization on survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* added to raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 67, n. 9, p. 3964-3969, 2001.
- RUZANTE, J. M.; GARDNER, I. A.; CULLOR, J. S.; SMITH, W. L.; KIRK, J. H.; ADASKA, J. M. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from waste milk delivered to California calf ranches. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 5, n. 5, p. 681-686, 2008.
- SARTOR, R. B. Does *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cause Crohn's disease? **Gut**, London, v. 54, n. 7, p. 896-898, 2005.
- SELBY, W. Pathogenesis and therapeutic aspects of Crohn's disease. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 77, n. 3-4, p. 505-511, 2000.
- SLANA, I.; PAOLICCHI, F.; JANSTOVA, B.; NAVRATILOVA, P.; PAVLIK, I. Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. **Veterinarni Medicina**, Brno, v. 53, n. 6, p. 283-306, 2008.
- STABEL, J. R.; STEADHAM, E. M.; BOLIN, C. A. Heat inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk: Are current pasteurization conditions effective? **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 63, n. 12, p. 4975-4977, 1997.
- STABEL, J. R. Johne's disease: A hidden threat. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 1, p. 283-288, 1998.
- STEPHAN, R.; SCHUMACHER, S.; TASARA, T.; GRANT, I. R. Prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss raw milk cheeses collected at the retail level. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 8, p. 3590-3595, 2007.
- SUNG, N.; COLLINS, M. T. Effect of three factors in cheese production (pH, salt, and heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 66, n. 4, p. 1334-1339, 2000.
- WHAN, L.; BALL, H. J.; GRANT, I. R.; ROWE, M. T. Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in untreated water in northern Ireland. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 71, n. 11, p. 7107-7112, 2005.