CÁSSIA YUMI IKUTA

**Comparação entre meios de cultura e condições de incubação
para o primo isolamento de *Mycobacterium bovis* de bovinos
brasileiros**

**São Paulo
2011**

CÁSSIA YUMI IKUTA

**Comparação entre meios de cultura e condições de incubação
para o primo isolamento de *Mycobacterium bovis* de bovinos
brasileiros**

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto

São Paulo
2011

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2441
FMVZ

Ikuta, Cássia Yumi

Comparação entre meios de cultura e condições de incubação para o primo isolamento de *Mycobacterium bovis* de bovinos brasileiros / Cássia Yumi Ikuta. -- 2011.

77 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2011.

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

Orientador: Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto.

1. Primo isolamento. 2. Tuberculose bovina. 3. *Mycobacterium bovis*. 4. Meios de cultura. 5. Condições de incubação. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Influencia de dióxido de carbono no primo isolamento de Mycobacterium bovis.", protocolado sob o nº1628/2009, não utilizando animais, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, 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 em reunião de 20/05/09.

We certify that the Research "Influence of carbon dioxide on the primary isolation of Mycobacterium bovis", protocol number 1628/2009, under the Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, 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 and was approved in the meeting of day 05/20/09.

São Paulo, 21 de maio de 2009

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: IKUTA, Cássia Yumi

Título: Comparação entre meios de cultura e condições de incubação para o primo isolamento de *Mycobacterium bovis* de bovinos brasileiros.

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

Data: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Julgamento _____

*Dedico aos meus pais, **Clara e Vicente**
meu irmão, **Guto**
e ao **Marcelo**,
companheiro de todos
os momentos...
Por todo apoio e paciência.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto**, pela liberdade para aprender e pelo apoio para realizar.

Ao **Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos**, pelo apoio e incentivo a ir além.

Ao **Prof. Dr. Marcos Amaku**, pela ajuda e compreensão nos assuntos estatísticos.

À **Prof^a. Dra. Andrea Micke Moreno**, **Prof. Dr. José Antonio Jerez** e **Prof. Dr. Fumio Honma Ito**, por abrirem as portas de seus laboratórios.

Aos **Professores do VPS**, por minha formação acadêmica e por sempre terem sido solícitos.

À **Flavia** e **Gisele**, pelos momentos dentro e fora do fluxo, à **Amane**, pelas lembranças de Porto de Galinhas, e às três, pelas conversas e momentos Outback com muitas risadas.

Às colegas do LZB, **Érika**, **Léia**, **Vanessa**, **Vivianne** e **Zenaide**, pelos momentos de descontração.

Aos funcionários do VPS, **Alexandre**, **Bispo**, **Carol**, **Cristina**, **Danival**, **Hilda**, **Jucélia**, **Paula**, **Pedrinho**, **Priscilla**, **Renato**, **Rosana**, **Sandra**, **Sheila**, **Tânia**, **Virginia** e **Washington**, e pelo companheirismo e ajuda nos momentos de crise.

Aos funcionários da biblioteca, em especial **Elza**, **Helena**, **Fernanda** e **Solange**, sem as quais não haveria base para escrever esta dissertação.

Aos funcionários do VRA, **Belau**, **Irailton** e **Luiz**, pela ajuda na colheita de sangue.

À **Tânia** e **Will**, pelas horas de conversas carregadas de café.

“ – Tenho sede dessa água – disse o príncipezinho. (...)
E eu compreendi o que ele havia buscado! (...)
Aquele água era muito mais que um alimento.
Nascera da caminhada sob as estrelas,
do canto da roldana, do esforço do meu braço.”

Antoine de Saint-Exupéry

(O Pequeno Príncipe)

RESUMO

IKUTA, C. Y. **Comparação entre meios de cultura e condições de incubação para o primo isolamento de *Mycobacterium bovis* de bovinos brasileiros.** [Comparison between media and incubation conditions for primary isolation of *Mycobacterium bovis* from Brazilian cattle]. 2011. 77 f. Dissertação. (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Considerando que os meios de cultura e as condições de incubação são os principais fatores para o sucesso do primo isolamento, além do método de descontaminação, quatro meios de cultura e três condições de incubação foram investigados. Noventa e sete amostras de lesões granulomatosas foram submetidas ao método de descontaminação com cloreto de 1-hexadecilpiridínio (HPC) a 1,5%, e semeadas em dois meios a base de ovo, Stonebrink e Löwenstein-Jensen com piruvato de sódio, e em dois meios a base de ágar, B83 e Middlebrook 7H11. Cada meio foi incubado a 37°C por 90 dias em três condições de incubação, atmosfera com 10% de CO₂, atmosfera normal e atmosfera com suposta tensão de CO₂ obtida pela queima do algodão hidrófobo e fechamento do tubo com rolha de cortiça. O tipo de condição de incubação utilizado teve influência nos meios a base de ovo apenas no início da incubação (30 dias), mas nenhuma nos meios a base de ágar. A incubação em atmosfera com 10% de CO₂ diminuiu o tempo de aparecimento da primeira colônia e aumentou o número de UFC. O meio B83 foi mais rápido no aparecimento das colônias e teve o maior sucesso de isolamento aos 30 dias, mas não houve diferença com os meios Stonebrink e Löwenstein-Jensen com piruvato, no sucesso de isolamento e número de UFC aos 60 e 90 dias. De acordo com os dados, em sete oportunidades houve isolamento de *M. bovis* apenas no meio de Stonebrink e em quatro apenas no B83, assim, sugere-se a utilização desses dois meios de cultura em paralelo, incubados em atmosfera com acréscimo de CO₂.

Palavras-chave: Primo isolamento. Tuberculose bovina. *Mycobacterium bovis*. Meios de cultura. Condições de incubação.

ABSTRACT

IKUTA, C. Y. **Comparison between media and incubation conditions for primary isolation of *Mycobacterium bovis* from Brazilian cattle.** [Comparação entre meios de cultura e condições de incubação para o primo isolamento de *Mycobacterium bovis* de bovinos brasileiros]. 2011. 77 f. Dissertação. (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Considering that the culture media and the incubation conditions are the main factors for the success of primary isolation, besides the decontamination procedure, four culture media and three incubation conditions were investigated. Ninety-seven samples of granulomatous lesions were submitted to the decontamination procedure by 1-hexadecylpyridinium chloride at 1,5% w/v, and inoculated on two egg-based media, Stonebrink and Löwenstein-Jensen with sodium pyruvate, and two agar-based media, B83 and Middlebrook 7H11. Each medium was incubated at 37°C for 90 days in three incubation conditions, in air containing 10% CO₂, in air, and in air with a supposed higher CO₂ tension created by burning the hydrophobic cotton used to close the tubes and subsequently closing with a cork. The type of incubation condition used had influence on the egg-based media only at the beginning of incubation (30 days), but none on the agar-based media. The incubation in air containing 10% CO₂ decreased the time to first appearance of colonies and increased the number of colonies. B83 medium showed a faster growth and detected more isolates at 30 days of incubation. However, there was no difference between B83, Stonebrink and Löwenstein-Jensen with pyruvate at 60 and 90 days of incubation. According to the data, seven *M. bovis* isolates grew only on Stonebrink and four only on B83, therefore, the use of both media, in parallel, incubated in air containing CO₂ is suggested.

Keywords: Primary isolation. Bovine tuberculosis. *Mycobacterium bovis*. Culture media. Incubation conditions.

LISTA DE FOTOS

Foto 1 –	Tubos 18x180mm com meio B83 após a incubação com crescimento de colônias escurecidas e translúcidas – São Paulo – 2010.....	27
Foto 2 –	Tubo com meio a base de ovo após a incubação com crescimento de colônias de morfologia e características compatíveis a <i>M. bovis</i> – São Paulo – 2010	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Proporção de sucesso de isolamento de <i>M. bovis</i> aos 30 dias de incubação, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010.....	28
Tabela 2 –	Valores de "p" resultantes das comparações entre as proporções de sucesso no isolamento de <i>M. bovis</i> aos 30 dias de incubação, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010.....	29
Tabela 3 –	Proporção de sucesso de isolamento de <i>M. bovis</i> aos 60 dias de incubação, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010.....	29
Tabela 4 –	Valores de "p" resultantes das comparações entre as proporções de sucesso no isolamento de <i>M. bovis</i> aos 60 dias de incubação, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010.....	29
Tabela 5 –	Proporção de sucesso de isolamento de <i>M. bovis</i> aos 90 dias de incubação, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010.....	30
Tabela 6 –	Valores de "p" resultantes das comparações entre as proporções de sucesso no isolamento de <i>M. bovis</i> aos 90 dias de incubação, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010.....	30
Tabela 7 –	Soma de ranks da variável tempo para aparecimento da primeira UFC (dias), segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010.....	31
Tabela 8 –	Valores de “p” resultantes da comparação do tempo para aparecimento da primeira UFC (dias), segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010	32
Tabela 9 –	Soma de ranks do número de UFC aos 30 dias de incubação, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010.....	32

Tabela 10 –	Valores de “p” resultantes da comparação do número de UFC aos 30 dias de incubação, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010	32
Tabela 11 –	Soma de ranks do número de UFC aos 60 dias de incubação, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010.....	33
Tabela 12 –	Valores de “p” resultantes da comparação do número de UFC aos 60 dias de incubação, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010	33
Tabela 13 –	Soma de ranks do número de UFC aos 90 dias de incubação, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010.....	33
Tabela 14 –	Valores de “p” resultantes da comparação do número de UFC aos 90 dias de incubação, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010	34
Tabela 15 –	Proporção de sucesso de isolamento de <i>M. bovis</i> aos 30 dias de incubação, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010	34
Tabela 16 –	Valores de "p" resultantes das comparações das proporções de sucesso no isolamento de <i>M. bovis</i> aos 30 dias de incubação, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010	35
Tabela 17 –	Proporção de sucesso de isolamento de <i>M. bovis</i> aos 60 dias de incubação, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010	35
Tabela 18 –	Valores de "p" resultantes das comparações das proporções de sucesso no isolamento de <i>M. bovis</i> aos 60 dias de incubação, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010	35
Tabela 19 –	Proporção de sucesso de isolamento de <i>M. bovis</i> aos 90 dias de incubação, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010	36

Tabela 20 –	Valores de "p" resultantes das comparações das proporções de sucesso no isolamento de <i>M. bovis</i> aos 90 dias de incubação, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010	36
Tabela 21 –	Soma de ranks da variável tempo para aparecimento da primeira UFC (dias), segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010.....	37
Tabela 22 –	Valores de “p” resultantes da comparação do tempo para aparecimento da primeira UFC (dias), segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010.....	38
Tabela 23 –	Soma de ranks do número de UFC aos 30 dias de incubação, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010	38
Tabela 24 –	Valores de “p” resultantes da comparação do número de UFC aos 30 dias de incubação, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010	38
Tabela 25 –	Soma de ranks do número de UFC aos 60 dias de incubação, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010	39
Tabela 26 –	Valores de “p” resultantes da comparação do número de UFC aos 60 dias de incubação, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010	39
Tabela 27 –	Soma de ranks do número de UFC aos 90 dias de incubação, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010	39
Tabela 28 –	Valores de “p” resultantes da comparação do número de UFC aos 90 dias de incubação, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010	40

Tabela 29 –	Proporção de sucesso de isolamento de <i>M. bovis</i> aos 30 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010	41
Tabela 30 –	Valores de "p" resultantes das comparações entre as proporções de sucesso no isolamento de <i>M. bovis</i> aos 30 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010	42
Tabela 31 –	Proporção de sucesso de isolamento de <i>M. bovis</i> aos 60 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010	43
Tabela 32 –	Valores de "p" resultantes das comparações entre as proporções de sucesso no isolamento de <i>M. bovis</i> aos 60 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010	44
Tabela 33 –	Proporção de sucesso de isolamento de <i>M. bovis</i> aos 90 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010	45
Tabela 34 –	Valores de "p" resultantes das comparações entre as proporções de sucesso no isolamento de <i>M. bovis</i> aos 90 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010	46
Tabela 35 –	Soma de ranks da variável tempo para aparecimento da primeira UFC (dias), segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010	47
Tabela 36 –	Valores de “p” resultantes da comparação do tempo para aparecimento da primeira UFC (dias), segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010	48

Tabela 37 –	Soma de ranks do número de UFC aos 30 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010	49
Tabela 38 –	Valores de “p” resultantes da comparação do número de UFC aos 30 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010.....	50
Tabela 39 –	Soma de ranks do número de UFC aos 60 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010	51
Tabela 40 –	Valores de “p” resultantes da comparação do número de UFC aos 60 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010.....	52
Tabela 41 –	Soma de ranks do número de UFC aos 90 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010	53
Tabela 42 –	Valores de “p” resultantes da comparação do número de UFC aos 90 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010.....	54

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Proporção de sucesso de isolamento de *M. bovis* aos 30, 60 e 90 dias, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010..... 31
- Gráfico 2 – Proporção de sucesso de isolamento de *M. bovis* aos 30, 60 e 90 dias, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010 37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3	OBJETIVOS	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	Amostras.....	24
4.2	Meios de cultura	24
4.3	Delineamento experimental	25
4.4	Fluxograma	26
5	RESULTADOS	27
5.1	Meios de cultura	28
5.2	Condições de incubação	34
5.3	Meios de cultura e condições de incubação	40
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÃO.....	58
	REFERÊNCIAS	59
	APÊNDICES	64
	ANEXOS	69

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma zoonose bem conhecida que ocorre no mundo inteiro (O'REILLY; DABORN, 1995; MODA et al., 1996). Seu agente causador, *Mycobacterium bovis*, possui uma das variedades mais amplas de hospedeiros entre os patógenos conhecidos e, portanto, mecanismos de transmissão complexos, com interação infecciosa entre seres humanos, animais domésticos e silvestres (MORRIS; PFEIFFER; JACKSON, 1994).

Os casos humanos dessa tuberculose zoonótica têm maior incidência em áreas rurais, geralmente associados à exposição ocupacional, por inalação de aerossóis e contato com carcaças, e sua ocorrência apresenta uma considerável variação regional, dependendo da quantidade de rebanhos infectados, da situação socioeconômica, da aplicação de medidas preventivas (MODA et al., 1996; COSIVI et al., 1998) e dos hábitos alimentares relacionados aos produtos lácteos, principalmente (SMITH, 1898).

Apesar de intensos esforços durante várias décadas, a tuberculose bovina continua a ser um problema significativo na perspectiva global, com influência adversa na economia agropecuária em todas as regiões em que está presente (POLLOCK et al., 2006).

Para combater esta doença, os países implementam programas de controle e erradicação, baseados na certificação de propriedades livres e na detecção e saneamento de focos. Essa última atividade é essência de um sistema de vigilância, cuja base é a detecção de lesões tuberculosas em abatedouros, com subsequente colheita para que o diagnóstico definitivo seja realizado mediante isolamento e identificação. Assim, a propriedade foco pode ser rastreada e saneada (COUSINS, 2001; LAGE et al., 2006; AMBROSIO et al., 2008).

No Brasil, o combate à tuberculose de forma organizada foi iniciado apenas em 2001, com o lançamento do Programa de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) (LAGE et al., 2006). Entretanto, em virtude das características das cadeias produtivas de carne e leite brasileiras, a expectativa de prevalência da tuberculose bovina é baixa, sobretudo nos estados grandes produtores de carne. Neste ambiente de baixa prevalência, torna-se muito interessante a implementação de sistemas de vigilância visando a detecção e o saneamento dos focos residuais. Assim, como a detecção de focos é feita por métodos diretos de diagnóstico, ou seja, isolamento e identificação do agente a partir de lesões colhidas em abatedouro, a sensibilidade do primo isolamento de *M. bovis* é componente importante da sensibilidade de todo o sistema de vigilância.

Apesar de muitos estudos com ênfase em diagnóstico *in vitro* terem sido realizados (SCHAEFER, 1952; GALLAGHER; HORWILL, 1977; CORNER; NICOLACOPOULOS, 1988; CORNER; TRAJSTMAN, 1988; COUSINS; FRANCIS; GOW, 1989; AMBROSIO et al., 2008), é necessário investigar o comportamento de cepas de *M. bovis* circulantes no Brasil em relação aos métodos de primo isolamento, notadamente os meios de cultura e as condições de incubação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para a obtenção de culturas puras do bacilo da tuberculose bovina, vários estudos foram conduzidos em busca de meios de cultura com o melhor desempenho (SCHAEFER, 1952; BIRN, 1965; GALLAGHER; HORWILL, 1977; CORNER; NICOLACOPOULOS, 1988; COUSINS; FRANCIS; GOW, 1989).

Atualmente, não há muito padrão entre os laboratórios para a escolha dos meios de cultura (CORNER; NICOLACOPOULOS, 1988), mas para assegurar a melhor sensibilidade possível, recomenda-se o uso concomitante dos meios a base de ágar e a base de ovo, já que ambos têm vantagens sobre o outro e nenhum é capaz de detectar *M. bovis* de todas as lesões (TARSHIS, 1953; BIRN, 1965; COUSINS; FRANCIS; GOW, 1989; CORNER, 1994).

As cepas “de campo” requerem meios enriquecidos para seu crescimento (CORNER, 1994), e a adição de piruvato de sódio no meio de cultura tem efeito favorável (SCHAEFER, 1952) por causa da falta de piruvato quinase funcional, que torna o bacilo bovino inapto a usar o glicerol ou qualquer carboidrato para gerar energia (KEATING et al., 2005). Contudo, esse efeito não foi observado no meio Middlebrook 7H11 acrescido de piruvato a 0,4%, por Gallagher e Horwill (1977). Apesar do glicerol em sua composição, o Middlebrook 7H11 promove um crescimento rápido (CORNER; NICOLACOPOULOS, 1988; COUSINS; FRANCIS; GOW, 1989).

Wherry e Ervin¹ (1918 apud ROCKWELL; HIGHBERGER, 1926, p. 92) foram os primeiros a inferir a necessidade de dióxido de carbono (CO₂) no cultivo do bacilo da tuberculose.

A partir deste momento, vários estudos foram conduzidos a fim de sanar essa questão. Entretanto, eram dedicados ao isolamento de *M. tuberculosis*, utilizando meio líquido e cepa de laboratório, H.37 (DAVIES, 1940), e amostras clínicas de esputo semeadas em meio sólido de ágar ou a base de ovo, como Löwenstein-Jensen (SCHAEFER; COHN; MIDDLEBROOK, 1955; WHITCOMB; FOSTER; DUKES, 1962; BEAM; KUBICA, 1968; KRASNOW; WAYNE, 1969; GRUFT; LODER, 1971; CHAUHAN; SREENIVAS; CHAUDHURI, 1991). Em todos os trabalhos, foi observado o aparecimento mais rápido com maior proporção de

¹ WHERRY, W. B.; ERVIN, D. M. The necessity of carbon dioxide for the growth of *B. tuberculosis*. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 22, p. 194-197, 1918.

isolados, número e tamanho de colônias, quando incubados em atmosfera com aumento da concentração de CO₂, desde 2,5% a 11%.

Diferenças entre *M. tuberculosis* e *M. bovis*, com base nas características de crescimento e reações bioquímicas, já eram evidentes aos pesquisadores antes mesmo do segundo ser nomeado espécie (KARLSON; LESSEL, 1970). Entre elas está a preferência por oxigênio, observada através da inoculação em meio de ágar com consistência semi-sólida, no qual as micobactérias aeróbias crescem apenas próximo da superfície e as microaerófilas têm crescimento profundo, geralmente formando uma banda densa submersa (LEBEK², 1959 apud COLLINS; GRANGE, 1983, p. 17; MARKS, 1972; MARKS, 1976; COLLINS; YATES; GRANGE, 1982; GRANGE; YATES, 1994).

Esta técnica se tornou um teste de identificação (MARKS, 1972; MARKS, 1976; COLLINS; YATES; GRANGE, 1982; GRANGE et al., 1990), pois a taxa de crescimento em meio de ovos não era considerada adequada para determinar a preferência de oxigênio (MARKS, 1976). Entretanto, a presença de debris dos tecidos no meio líquido ou semi-sólido pode causar viés, já que o crescimento é observado pela turvação, e as características de crescimento e a morfologia das colônias, observadas apenas em meio sólido, são fatores usados para a tipificação do organismo (LESSLIE, 1959).

Apesar das várias investigações realizadas, o papel do dióxido de carbono (CO₂) no primo isolamento de *M. bovis* ainda é controverso (CORNER; NICOLACOPOULOS, 1988; CORNER; TRAJSTMAN, 1988; COUSINS; FRANCIS; GOW, 1989; CORNER, 1994). Inclusive, o “Manual de Testes Diagnósticos e Vacinas para Animais Terrestres 2010” da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) considera a utilização de atmosfera de CO₂ uma condição facultativa.

Além dos meios de cultura e das condições de incubação, os métodos de descontaminação podem influenciar o sucesso do primo isolamento de *M. bovis*. Existem vários protocolos para essa finalidade e os mais utilizados são aqueles que se valem do tratamento da amostra com detergentes, ácidos ou álcalis, sendo que todos têm alguma toxicidade para micobactérias (CORNER; TRAJSTMAN, 1988; CORNER, 1994).

² LEBEK, G. Dependence of the oxygen optimal concentration of both strains of mammalian mycobacterium tuberculosis on the nutritive substrate. **Zentralblatt für Bakteriologie: international journal of medical microbiology**, Stuttgart, v. 176, p. 530-537, 1959.

3 OBJETIVOS

Visando aperfeiçoar o primo isolamento de *Mycobacterium bovis* a partir de lesões colhidas de bovinos em abatedouros no Brasil, os objetivos deste experimento foram investigar o comportamento de quatro meios de cultura e três diferentes formas de incubação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

As amostras utilizadas foram obtidas a partir 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), a partir do qual foi constituída uma coleção de homogeneizados de lesões granulomatosas de bovinos condenados por tuberculose em abatedouros, mantida em laboratório a -20°C .

Dessa coleção foram selecionadas 97 amostras, sendo que de 48 delas foi isolado o *M. bovis* no referido projeto e das outras 49 não se logrou êxito na tentativa de isolamento.

4.2 Meios de Cultura

Os meios de cultura testados foram: Stonebrink (Anexo A), Löwenstein-Jensen com adição de Piruvato de Sódio (Anexo B), Ágar Sangue Tuberculose, também denominado de B83 (Anexo C), e Middlebrook 7H11 (Anexo D).

Após o preparo de cada meio, 7 a 8 mL destes foram distribuídos em tubos de vidro 18x180 mm com e sem tampa de rosca. Os meios a base de ovo – Stonebrink e Löwenstein-Jensen com piruvato – foram levados à coaguladora a 86°C durante 40 minutos, e os meios a base de ágar, deixados sobre a bancada até solidificarem-se. Todos foram armazenados em temperatura de refrigeração até o momento do uso.

4.3 Delineamento Experimental

As amostras de homogeneizados escolhidas foram submetidas ao processo de descontaminação com Cloreto de 1-Hexadecilpiridínio (HPC). Este método consiste na adição de HPC a 1,5% à amostra, em proporção de 1:1, seguida de repouso em estufa a 37°C por 20 minutos (AMBROSIO et al., 2005) e centrifugação a 3000 r.p.m. durante 20 minutos (CORNER; TRAJSTMAN, 1988).

O sobrenadante de cada amostra foi desprezado e seu sedimento ressuspensão com 3 mL de solução salina a 0,85% estéril para semear 100 µL em cada tubo, sendo dois com tampa de rosca de baquelite e outro fechado com algodão hidrófobo. Todos semeados em duplicata para cada um dos quatro meios de cultura.

Um dos tubos com tampa de rosca foi incubado em estufa com acréscimo de 10% de CO₂, enquanto o outro foi incubado em estufa normal junto com o tubo fechado com algodão. Para a secagem da superfície, os tubos com tampa de rosca foram mantidos com a tampa semi-aberta a 37°C durante 24 horas (CORNER; NICOLACOPOULOS, 1988), permitindo maior tempo de contato do meio com a atmosfera oferecida pela estufa antes do fechamento total. O tubo sem rosca, após esse período sob as mesmas condições, foi submetido à queima do algodão e ao fechamento com rolha de cortiça. A incubação foi feita a 37°C durante 90 dias.

As colônias com morfologia e características compatíveis com micobactérias foram coradas pelo método de Ziehl-Neelsen e identificadas pelas técnicas moleculares PRA (Anexo F) e Spoligotyping (Anexo G).

Foram realizadas leituras a cada três dias de incubação e as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de micobactérias foram contadas aos 30, 60 e 90 dias de incubação. Para as análises, foram calculadas as médias dos tubos semeados em duplicata. Quando as UFC eram incontáveis foi adotado o valor de 300 UFC (adaptado de BRASIL, 1993).

As variáveis analisadas foram o tempo em dias para o aparecimento da primeira colônia, o sucesso no isolamento e o número de UFC aos 30, 60 e 90 dias de incubação. A variável sucesso no isolamento foi analisada pelo teste de comparação de proporções com auxílio do programa MedCalc. As variáveis tempo em dias para aparecimento da primeira colônia e número de UFC foram analisadas pelos testes de Friedman e Dunn, com auxílio do programa MiniTab.

4.4 Fluxograma

Segue um esquema para melhor entendimento do procedimento:

5 RESULTADOS

Colônias de *Mycobacterium bovis* foram isoladas a partir de 46 amostras (47,4%) entre as 97 utilizadas no presente estudo (Apêndice A).

Fonte: Cássia Yumi Ikuta – São Paulo – 2010.

Foto 1 – Tubos 18x180mm com meio B83 após a incubação com crescimento de colônias escurecidas e translúcidas – São Paulo – 2010

Fonte: Cássia Yumi Ikuta – São Paulo – 2010.

Foto 2 – Tubo 18x180mm com meio a base de ovo após a incubação com crescimento de colônias de morfologia e características compatíveis a *M. bovis* – São Paulo – 2010

5.1 Meios de cultura

As proporções de sucesso de isolamento consolidadas para os meios de cultura e a comparação entre elas nos três momentos de contagem, 30, 60 e 90 dias, são apresentadas nas tabelas 1 a 6. A progressão do número de isolados pode ser observada no gráfico 1.

Tabela 1 – Proporção de sucesso de isolamento de *M. bovis* aos 30 dias de incubação, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010

meios de cultura	30 dias			
	Sto ¹	LJp ²	7H11 ³	B83 ⁴
isolados	41	21	11	64
total	291	291	291	291
%	14,09	7,22	3,78	21,99

¹Stonebrink; ²Löwenstein-Jensen com piruvato; ³Middlebrook 7H11; ⁴Ágar sangue tuberculose

Tabela 2 – Valores de "p" resultantes das comparações entre as proporções de sucesso no isolamento de M. bovis aos 30 dias de incubação, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010

30 dias			
variáveis	Sto ¹	LJp ²	7H11 ³
LJp	0,0107		
7H11	<0,0001	0,1014	
B83 ⁴	0,0178	<0,0001	<0,0001

¹Stonebrink; ²Löwenstein-Jensen com piruvato;

³Middlebrook 7H11; ⁴Ágar sangue tuberculose

Tabela 3 – Proporção de sucesso de isolamento de M. bovis aos 60 dias de incubação, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010

60 dias				
meios de cultura	Sto ¹	LJp ²	7H11 ³	B83 ⁴
isolados	70	68	19	77
total	291	291	291	291
%	24,05	23,37	6,53	26,46

¹Stonebrink; ²Löwenstein-Jensen com piruvato; ³Middlebrook 7H11; ⁴Ágar sangue tuberculose

Tabela 4 – Valores de "p" resultantes das comparações entre as proporções de sucesso no isolamento de M. bovis aos 60 dias de incubação, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010

60 dias			
variáveis	Sto ¹	LJp ²	7H11 ³
LJp	0,924		
7H11	<0,0001	<0,0001	
B83 ⁴	0,5662	0,4437	<0,0001

¹Stonebrink; ²Löwenstein-Jensen com piruvato;

³Middlebrook 7H11; ⁴Ágar sangue tuberculose

Tabela 5 – Proporção de sucesso de isolamento de *M. bovis* aos 90 dias de incubação, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010

90 dias				
meios de cultura	Sto ¹	LJp ²	7H11 ³	B83 ⁴
isolados	76	73	21	78
total	291	291	291	291
%	26,12	25,09	7,22	26,80

¹Stonebrink; ²Löwenstein-Jensen com piruvato; ³Middlebrook 7H11; ⁴Ágar sangue tuberculose

Tabela 6 – Valores de "p" resultantes das comparações entre as proporções de sucesso no isolamento de *M. bovis* aos 90 dias de incubação, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010

90 dias			
variáveis	Sto ¹	LJp ²	7H11 ³
LJp	0,8496		
7H11	<0,0001	<0,0001	
B83 ⁴	0,9267	0,7069	<0,0001

¹Stonebrink; ²Löwenstein-Jensen com piruvato;

³Middlebrook 7H11; ⁴Ágar sangue tuberculose

Gráfico 1 – Proporção de sucesso de isolamento de *M. bovis* aos 30, 60 e 90 dias, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010

As somas de ranks, consolidadas para os meios de cultura, da variável tempo para aparecimento da primeira UFC (dias) e a comparação entre elas são apresentadas nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7 – Soma de ranks da variável tempo para aparecimento da primeira UFC (dias), segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010

meios de cultura	Soma dos ranks
B83 ¹	282,5
Sto ²	306
LJp ³	357
7H11 ⁴	434,5

¹Ágar sangue tuberculose; ²Stonebrink; ³Löwenstein-Jensen com piruvato; ⁴Middlebrook 7H11

Tabela 8 – Valores de “p” resultantes da comparação do tempo para aparecimento da primeira UFC (dias), segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010

variáveis	Sto ¹	LJp ²	7H11 ³
LJp	>0,05		
7H11	<0,001	<0,01	
B83 ⁴	>0,05	<0,01	<0,001

¹Stonebrink; ²Löwenstein-Jensen com piruvato;

³Middlebrook 7H11; ⁴Ágar sangue tuberculose

As somas de ranks dos números de UFC consolidadas para os meios de cultura e a comparação entre elas aos 30, 60 e 90 dias são apresentadas nas tabelas 9 a 14.

Tabela 9 – Soma de ranks do número de UFC aos 30 dias de incubação, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010

30dias	Soma dos ranks
B83 ¹	404
Sto ²	361
LJp ³	317
7H11 ⁴	298

¹Ágar sangue tuberculose;

²Stonebrink; ³Löwenstein-Jensen com

piruvato; ⁴Middlebrook 7H11.

Tabela 10 – Valores de “p” resultantes da comparação do número de UFC aos 30 dias de incubação, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010

30 dias			
variáveis	Sto ¹	LJp ²	7H11 ³
LJp	>0,05		
7H11	<0,05	>0,05	
B83 ⁴	>0,05	<0,001	<0,001

¹Stonebrink; ²Löwenstein-Jensen com piruvato;

³Middlebrook 7H11; ⁴Ágar sangue tuberculose

Tabela 11 – Soma de ranks do número de UFC aos 60 dias de incubação, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010

60dias	Soma dos ranks
B83 ¹	379
Sto ²	372
LJp ³	372
7H11 ⁴	257

¹Ágar sangue tuberculose;

²Stonebrink; ³Löwenstein-Jensen com piruvato; ⁴Middlebrook 7H11.

Tabela 12 – Valores de “p” resultantes da comparação do número de UFC aos 60 dias de incubação, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010

60 dias			
variáveis	Sto ¹	LJp ²	7H11 ³
LJp	>0,05		
7H11	<0,001	<0,001	
B83 ⁴	>0,05	>0,05	<0,001

¹Stonebrink; ²Löwenstein-Jensen com piruvato;

³Middlebrook 7H11; ⁴Ágar sangue tuberculose

Tabela 13 – Soma de ranks do número de UFC aos 90 dias de incubação, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010

90dias	Soma dos ranks
LJp ¹	377
Sto ²	375,5
B83 ³	373
7H11 ⁴	254,5

¹Löwenstein-Jensen com piruvato;

²Stonebrink; ³Ágar sangue tuberculose; ⁴Middlebrook 7H11

Tabela 14 – Valores de “p” resultantes da comparação do número de UFC aos 90 dias de incubação, segundo os meios de cultura – São Paulo – 2010

variáveis	90 dias		
	Sto ¹	LJp ²	7H11 ³
LJp	>0,05		
7H11	<0,001	<0,001	
B83 ⁴	>0,05	>0,05	<0,001

¹Stonebrink; ²Löwenstein-Jensen com piruvato;

³Middlebrook 7H11; ⁴Ágar sangue tuberculose

5.2 Condições de incubação

As proporções de sucesso de isolamento consolidadas para as condições de incubação e a comparação entre elas nos três momentos de contagem, 30, 60 e 90 dias, são apresentadas nas tabelas 15 a 20. A progressão do número de isolados pode ser observada no gráfico 2.

Tabela 15 – Proporção de sucesso de isolamento de *M. bovis* aos 30 dias de incubação, segundo as condições de incubação– São Paulo – 2010

condição de incubação	30 dias		
	CO ₂ ¹	NOR ²	QUE ³
isolados	76	33	28
total	388	388	388
%	19,59	8,51	7,22

¹Atmosfera com 10% de CO₂; ²Atmosfera ambiente; ³Algodão queimado.

Tabela 16 – Valores de "p" resultantes das comparações das proporções de sucesso no isolamento de M. bovis aos 30 dias de incubação, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010

30 dias		
variáveis	CO ₂ ¹	NOR ²
NOR	<0,0001	
QUE ³	<0,0001	0,5933

¹Atmosfera com 10% de CO₂ ;

²Atmosfera ambiente; ³Algodão queimado.

Tabela 17 – Proporção de sucesso de isolamento de M. bovis aos 60 dias de incubação, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010

60 dias			
condição de incubação	CO ₂ ¹	NOR ²	QUE ³
isolados	90	76	68
total	388	388	388
%	23,20	19,59	17,53

¹Atmosfera com 10% de CO₂ ; ²Atmosfera ambiente; ³Algodão queimado.

Tabela 18 – Valores de "p" resultantes das comparações das proporções de sucesso no isolamento de M. bovis aos 60 dias de incubação, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010

60 dias		
variáveis	CO ₂ ¹	NOR ²
NOR	0,2549	
QUE ³	0,0612	0,5185

¹Atmosfera com 10% de CO₂ ;

²Atmosfera ambiente; ³Algodão queimado.

Tabela 19 – Proporção de sucesso de isolamento de M. bovis aos 90 dias de incubação, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010

90 dias			
condição de incubação	CO ₂ ¹	NOR ²	QUE ³
isolados	94	81	73
total	388	388	388
%	24,23	20,88	18,81

¹Atmosfera com 10% de CO₂ ; ²Atmosfera ambiente; ³Algodão queimado.

Tabela 20 – Valores de "p" resultantes das comparações das proporções de sucesso no isolamento de M. bovis aos 90 dias de incubação, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010

90 dias		
variáveis	CO ₂ ¹	NOR ²
NOR	0,3028	
QUE ³	0,0802	0,5268

¹Atmosfera com 10% de CO₂ ;

²Atmosfera ambiente; ³Algodão queimado.

Gráfico 2 – Proporção de sucesso de isolamento de *M. bovis* aos 30, 60 e 90 dias, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010

As somas de ranks, consolidadas para as condições de incubação, da variável tempo para aparecimento da primeira UFC (dias) e a comparação entre elas são apresentadas nas tabelas 21 e 22.

Tabela 21 – Soma de ranks da variável tempo para aparecimento da primeira UFC (dias), segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010

condição de incubação	Soma dos ranks
CO ₂ ¹	302,5
NOR ²	397,5
QUE ³	404

¹Atmosfera com 10% de CO₂ ; ²Atmosfera ambiente;

³Algodão queimado.

Tabela 22 – Valores de “p” resultantes da comparação do tempo para aparecimento da primeira UFC (dias), segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010

variáveis	CO ₂ ¹	NOR ²
NOR	<0,001	
QUE ³	<0,001	>0,05

¹Atmosfera com 10% de CO₂ ;

²Atmosfera ambiente; ³Algodão queimado.

As somas de ranks dos números de UFC consolidadas para as condições de incubação e a comparação entre elas aos 30, 60 e 90 dias são apresentadas nas tabelas 23 a 28.

Tabela 23 – Soma de ranks do número de UFC aos 30 dias de incubação, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010

30dias	Soma dos ranks
CO ₂ ¹	429,5
NOR ²	341,5
QUE ³	333

¹Atmosfera com 10% de CO₂ ;

²Atmosfera ambiente; ³Algodão queimado.

Tabela 24 – Valores de “p” resultantes da comparação do número de UFC aos 30 dias de incubação, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010

30 dias		
variáveis	CO ₂ ¹	NOR ²
NOR	<0,001	
QUE ³	<0,001	>0,05

¹Atmosfera com 10% de CO₂ ;

²Atmosfera ambiente; ³Algodão queimado.

Tabela 25 – Soma de ranks do número de UFC aos 60 dias de incubação, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010

60dias	Soma dos ranks
CO ₂ ¹	422
QUE ²	341,5
NOR ³	340,5

¹Atmosfera com 10% de CO₂ ;

²Algodão queimado; ³Atmosfera ambiente.

Tabela 26 – Valores de “p” resultantes da comparação do número de UFC aos 60 dias de incubação, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010

variáveis	60 dias	
	CO ₂ ¹	NOR ²
NOR ²	<0,001	
QUE ³	<0,001	>0,05

¹Atmosfera com 10% de CO₂ ;

²Atmosfera ambiente; ³Algodão queimado.

Tabela 27 – Soma de ranks do número de UFC aos 90 dias de incubação, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010

90dias	Soma dos ranks
CO ₂ ¹	415,5
NOR ²	348,5
QUE ³	340

¹Atmosfera com 10% de CO₂ ;

²Atmosfera ambiente; ³Algodão queimado.

Tabela 28 – Valores de “p” resultantes da comparação do número de UFC aos 90 dias de incubação, segundo as condições de incubação – São Paulo – 2010

90 dias		
variáveis	CO ₂ ¹	NOR ²
NOR	<0,01	
QUE ³	<0,001	>0,05

¹Atmosfera com 10% de CO₂ ;

²Atmosfera ambiente; ³Algodão queimado.

5.3 Meios de cultura e condições de incubação

As proporções de sucesso de isolamento para os meios de cultura e as condições de incubação, e a comparação entre elas nos três momentos de contagem, 30, 60 e 90 dias, são apresentadas nas tabelas 29 a 34.

Tabela 29 – Proporção de sucesso de isolamento de M. bovis aos 30 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010

30 dias	meios de cultura											
	Sto ¹			LJp ²			7H11 ³			B83 ⁴		
	condição de incubação			condição de incubação			condição de incubação			condição de incubação		
	CO ₂ ⁵	NOR ⁶	QUE ⁷	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR	QUE
isolados	27	10	4	20	1	0	4	3	4	25	19	20
total	97	97	97	97	97	97	97	97	97	97	97	97
%	27,84	10,31	4,12	20,62	1,03	0,00	4,12	3,09	4,12	25,77	19,59	20,62

¹Stonebrink; ²Löwenstein-Jensen com piruvato; ³Middlebrook 7H11; ⁴Ágar sangue tuberculose; ⁵Atmosfera com 10% de CO₂; ⁶Atmosfera ambiente; ⁷Algodão queimado.

Tabela 30 – Valores de "p" resultantes das comparações entre as proporções de sucesso no isolamento de M. bovis aos 30 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010

30 dias												
variáveis		meios de cultura										
meios de cultura	condição de incubação	Sto ¹			LJp ²			7H11 ³			B83 ⁴	
		CO ₂ ⁵	NOR ⁶	QUE ⁷	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR
Sto	NOR	0,0034										
	QUE	<0,0001	0,1649									
LJp	CO ₂	0,3144	0,0739	0,0011								
	NOR	<0,0001	0,013	0,3653	<0,0001							
	QUE	<0,0001	0,0035	0,1299	<0,0001	0,9993						
7H11	CO ₂	<0,0001	0,1649	0,7179	0,0011	0,3653	0,1299					
	NOR	<0,0001	0,0847	0,9997	0,0004	0,6139	0,245	0,9997				
	QUE	<0,0001	0,1649	0,7179	0,0011	0,3653	0,1299	0,7179	0,9997			
B83	CO ₂	0,8702	0,009	0,0001	0,4967	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001	0,0001		
	NOR	0,2372	0,1072	0,0019	0,9999	0,0001	<0,0001	0,0019	0,0007	0,0019	0,3918	
	QUE	0,3144	0,0739	0,0011	0,8591	<0,0001	<0,0001	0,0011	0,0004	0,0011	0,4967	0,9999

¹Stonebrink; ²Löwenstein-Jensen com piruvato; ³Middlebrook 7H11; ⁴Ágar sangue tuberculose; ⁵Atmosfera com 10% de CO₂; ⁶Atmosfera ambiente; ⁷Algodão queimado.

Tabela 31 – Proporção de sucesso de isolamento de *M. bovis* aos 60 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010

60 dias	meios de cultura											
	Sto ¹			LJp ²			7H11 ³			B83 ⁴		
	condição de incubação			condição de incubação			condição de incubação			condição de incubação		
	CO ₂ ⁵	NOR ⁶	QUE ⁷	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR	QUE
isolados	28	24	18	24	20	24	9	6	4	29	26	22
total	97	97	97	97	97	97	97	97	97	97	97	97
%	28,87	24,74	18,56	24,74	20,62	24,74	9,28	6,19	4,12	29,90	26,80	22,68

¹Stonebrink; ²Löwenstein-Jensen com piruvato; ³Middlebrook 7H11; ⁴Ágar sangue tuberculose; ⁵Atmosfera com 10% de CO₂; ⁶Atmosfera ambiente; ⁷Algodão queimado.

Tabela 32 – Valores de "p" resultantes das comparações entre as proporções de sucesso no isolamento de *M. bovis* aos 60 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010

60 dias												
variáveis		meios de cultura										
meios de cultura	condição de incubação	Sto ¹			LJp ²			7H11 ³			B83 ⁴	
		CO ₂ ⁵	NOR ⁶	QUE ⁷	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR
Sto	NOR	0,6261										
	QUE	0,1287	0,3839									
LJp	CO ₂	0,6261	0,8679	0,3839								
	NOR	0,244	0,6074	0,8567	0,6074							
	QUE	0,6261	0,8679	0,3839	0,8679	0,6074						
7H11	CO ₂	0,001	0,0075	0,097	0,0075	0,0441	0,0075					
	NOR	0,0001	0,0007	0,0165	0,0007	0,0062	0,0007	0,5914				
	QUE	<0,0001	0,0001	0,0032	0,0001	0,0011	0,0001	0,2501	0,7435			
B83	CO ₂	0,9999	0,5187	0,0938	0,5187	0,1861	0,5187	0,0006	<0,0001	<0,0001		
	NOR	0,8717	0,8698	0,2306	0,8698	0,3991	0,8698	0,0028	0,0002	<0,0001	0,7492	
	QUE	0,4114	0,8662	0,5949	0,8662	0,8619	0,8662	0,0187	0,0022	0,0003	0,3275	0,6181

¹Stonebrink; ²Löwenstein-Jensen com piruvato; ³Middlebrook 7H11; ⁴Ágar sangue tuberculose; ⁵Atmosfera com 10% de CO₂; ⁶Atmosfera ambiente; ⁷Algodão queimado.

Tabela 33 – Proporção de sucesso de isolamento de *M. bovis* aos 90 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010

90 dias	meios de cultura											
	Sto ¹			LJp ²			7H11 ³			B83 ⁴		
	condição de incubação			condição de incubação			condição de incubação			condição de incubação		
	CO ₂ ⁵	NOR ⁶	QUE ⁷	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR	QUE
isolados	29	26	21	25	22	26	11	6	4	29	27	22
total	97	97	97	97	97	97	97	97	97	97	97	97
%	29,90	26,80	21,65	25,77	22,68	26,80	11,34	6,19	4,12	29,90	27,84	22,68

¹Stonebrink; ²Löwenstein-Jensen com piruvato; ³Middlebrook 7H11; ⁴Ágar sangue tuberculose; ⁵Atmosfera com 10% de CO₂; ⁶Atmosfera ambiente; ⁷Algodão queimado.

Tabela 34 – Valores de "p" resultantes das comparações entre as proporções de sucesso no isolamento de *M. bovis* aos 90 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010

90 dias												
variáveis		meios de cultura										
meios de cultura	condição de incubação	Sto ¹			LJp ²			7H11 ³			B83 ⁴	
		CO ₂ ⁵	NOR ⁶	QUE ⁷	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR
Sto	NOR	0,7492										
	QUE	0,2504	0,5032									
LJp	CO ₂	0,6301	0,9999	0,613								
	NOR	0,3275	0,6181	0,9999	0,7379							
	QUE	0,7492	0,8712	0,5032	0,9999	0,6181						
7H11	CO ₂	0,0025	0,0105	0,0817	0,0164	0,056	0,0105					
	NOR	<0,0001	0,0002	0,0037	0,0004	0,0022	0,0002	0,3104				
	QUE	<0,0001	<0,0001	0,0006	0,0001	0,0003	<0,0001	0,1065	0,7435			
B83	CO ₂	0,8754	0,7492	0,2504	0,6301	0,3275	0,7492	0,0025	<0,0001	<0,0001		
	NOR	0,8743	0,9989	0,4051	0,8702	0,5081	0,9989	0,0066	0,0001	<0,0001	0,8743	
	QUE	0,3275	0,6181	0,9999	0,7379	0,8639	0,6181	0,056	0,0022	0,0003	0,3275	0,5081

¹Stonebrink; ²Löwenstein-Jensen com piruvato; ³Middlebrook 7H11; ⁴Ágar sangue tuberculose; ⁵Atmosfera com 10% de CO₂; ⁶Atmosfera ambiente; ⁷Algodão queimado.

As somas de ranks, para os meios de cultura e as condições de incubação, da variável tempo para aparecimento da primeira UFC (dias) e a comparação entre elas são apresentadas nas tabelas 35 e 36 (Apêndice E).

Tabela 35 – Soma de ranks da variável tempo para aparecimento da primeira UFC (dias), segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010

meios de cultura	condição de incubação	Soma dos ranks
Sto ¹	CO ₂ ⁵	176,5
B83 ²	CO ₂	198,5
LJp ³	CO ₂	240,5
B83	NOR ⁶	252
B83	QUE ⁷	267
Sto	NOR	295
LJp	QUE	324,5
Sto	QUE	330
LJp	NOR	343,5
7H11 ⁴	CO ₂	375
7H11	NOR	391,5
7H11	QUE	394

¹Stonebrink; ²Ágar sangue tuberculose; ³Löwenstein-Jensen com piruvato;

⁴Middlebrook 7H11; ⁵Atmosfera com 10% de CO₂; ⁶Atmosfera ambiente;

⁷Algodão queimado.

Tabela 36 – Valores de “p” resultantes da comparação do tempo para aparecimento da primeira UFC (dias), segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010

variáveis		meios de cultura										
		Sto ¹			LJp ²			7H11 ³			B83 ⁴	
meios de cultura	condição de incubação	CO ₂ ⁵	NOR ⁶	QUE ⁷	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR
Sto	NOR	<0,05										
	QUE	<0,001	>0,05									
LJp	CO ₂	>0,05	>0,05	>0,05								
	NOR	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05							
	QUE	<0,01	>0,05	>0,05	>0,05							
7H11	CO ₂	<0,001	>0,05	>0,05	<0,01	>0,05	>0,05					
	NOR	<0,001	>0,05	>0,05	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05				
	QUE	<0,001	>0,05	>0,05	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05			
B83	CO ₂	>0,05	>0,05	<0,01	>0,05	<0,01	<0,05	<0,001	<0,001	<0,001		
	NOR	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05	<0,01	<0,01	>0,05	
	QUE	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05

¹Stonebrink; ²Ágar sangue tuberculose; ³Löwenstein-Jensen com piruvato; ⁴Middlebrook 7H11; ⁵Atmosfera com 10% de CO₂; ⁶Atmosfera ambiente; ⁷Algodão queimado.

As somas de ranks dos números de UFC para os meios de cultura e as condições de incubação, e a comparação entre elas aos 30, 60 e 90 dias são apresentadas nas tabelas 37 a 42 (Apêndices B a D).

Tabela 37 – Soma de ranks do número de UFC aos 30 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010

30dias		
meios de cultura	condição de incubação	Soma dos ranks
Sto ¹	CO ₂ ⁵	405
B83 ²	CO ₂	397
LJp ³	CO ₂	358
B83	QUE ⁶	337,5
B83	NOR ⁷	333
Sto	NOR	281,5
7H11 ⁴	NOR	258
Sto	QUE	254
7H11	QUE	252,5
7H11	CO ₂	250,5
LJp	NOR	230,5
LJp	QUE	230,5

¹Stonebrink; ²Ágar sangue tuberculose; ³Löwenstein-Jensen com piruvato;

⁴Middlebrook 7H11; ⁵Atmosfera com 10% de CO₂; ⁶Algodão queimado;

⁷Atmosfera ambiente.

Tabela 38 – Valores de “p” resultantes da comparação do número de UFC aos 30 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010

30 dias												
variáveis		meios de cultura										
		Sto ¹			LJp ²			7H11 ³			B83 ⁴	
meios de cultura	condição de incubação	CO ₂ ⁵	NOR ⁶	QUE ⁷	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR
Sto	NOR	<0,05										
	QUE	<0,001	>0,05									
LJp	CO ₂	>0,05	>0,05	>0,05								
	NOR	<0,001	>0,05	>0,05	<0,05							
	QUE	<0,001	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05						
7H11	CO ₂	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05					
	NOR	<0,01	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05				
	QUE	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05			
B83	CO ₂	>0,05	>0,05	<0,01	>0,05	<0,001	<0,001	<0,01	<0,01	<0,01		
	NOR	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	
	QUE	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

¹Stonebrink; ²Löwenstein-Jensen com piruvato; ³Middlebrook 7H11; ⁴Ágar sangue tuberculose; ⁵Atmosfera com 10% de CO₂; ⁶Atmosfera ambiente; ⁷Algodão queimado.

Tabela 39 – Soma de ranks do número de UFC aos 60 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010

60dias		
meios de cultura	condição de incubação	Soma dos ranks
B83 ¹	CO ₂ ⁵	387,5
Sto ²	CO ₂	379
LJp ³	CO ₂	362
B83	NOR ⁶	316
LJp	QUE ⁷	315,5
Sto	NOR	308,5
LJp	NOR	297
Sto	QUE	297
B83	QUE	295
7H11 ⁴	CO ₂	216
7H11	NOR	212
7H11	QUE	202,5

¹Ágar sangue tuberculose; ²Stonebrink; ³Löwenstein-Jensen com piruvato;

⁴Middlebrook 7H11; ⁵Atmosfera com 10% de CO₂; ⁶Atmosfera ambiente;

⁷Algodão queimado.

Tabela 40 – Valores de “p” resultantes da comparação do número de UFC aos 60 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010

60 dias												
variáveis		meios de cultura										
		Sto ¹			LJp ²			7H11 ³			B83 ⁴	
meios de cultura	condição de incubação	CO ₂ ⁵	NOR ⁶	QUE ⁷	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR
Sto	NOR	>0,05										
	QUE	>0,05	>0,05									
LJp	CO ₂	>0,05	>0,05	>0,05								
	NOR	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05							
	QUE	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05						
7H11	CO ₂	<0,001	>0,05	>0,05	<0,01	>0,05	>0,05					
	NOR	<0,001	>0,05	>0,05	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05				
	QUE	<0,001	>0,05	>0,05	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05			
B83	CO ₂	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,001	<0,001	<0,001		
	NOR	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	
	QUE	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

¹Stonebrink; ²Löwenstein-Jensen com piruvato; ³Middlebrook 7H11; ⁴Ágar sangue tuberculose; ⁵Atmosfera com 10% de CO₂; ⁶Atmosfera ambiente; ⁷Algodão queimado.

Tabela 41 – Soma de ranks do número de UFC aos 90 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010

90dias		
meios de cultura	condição de incubação	Soma dos ranks
Sto ¹	CO ₂ ⁵	379,5
B83 ²	CO ₂	379
LJp ³	CO ₂	359
LJp	QUE ⁷	318,5
Sto	NOR ⁶	315,5
B83	NOR	311
LJp	NOR	308,5
Sto	QUE	302,5
B83	QUE	290,5
7H11 ⁴	NOR	216
7H11	CO ₂	211,5
7H11	QUE	196,5

¹Stonebrink; ²Ágar sangue tuberculose; ³Löwenstein-Jensen com piruvato;

⁴Middlebrook 7H11; ⁵Atmosfera com 10% de CO₂; ⁶Atmosfera ambiente;

⁷Algodão queimado.

Tabela 42 – Valores de “p” resultantes da comparação do número de UFC aos 90 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação – São Paulo – 2010

90 dias												
variáveis		meios de cultura										
		Sto ¹			LJp ²			7H11 ³			B83 ⁴	
meios de cultura	condição de incubação	CO ₂ ⁵	NOR ⁶	QUE ⁷	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR
Sto	NOR	>0,05										
	QUE	>0,05	>0,05									
LJp	CO ₂	>0,05	>0,05	>0,05								
	NOR	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05							
	QUE	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05						
7H11	CO ₂	<0,001	>0,05	>0,05	<0,01	>0,05	>0,05					
	NOR	<0,001	>0,05	>0,05	<0,01	>0,05	>0,05	>0,05				
	QUE	<0,001	<0,05	>0,05	<0,001	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05			
B83	CO ₂	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,001	<0,001	<0,001		
	NOR	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	QUE	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

¹Stonebrink; ²Löwenstein-Jensen com piruvato; ³Middlebrook 7H11; ⁴Ágar sangue tuberculose; ⁵Atmosfera com 10% de CO₂; ⁶Atmosfera ambiente; ⁷Algodão queimado.

6 DISCUSSÃO

Em relação aos dados consolidados para os meios de cultura, o Ágar Sangue Tuberculose, ou B83, apresentou as maiores proporções de sucesso no isolamento aos 30 dias de incubação, seguido pelo meio de Stonebrink (Tabelas 1 e 2). Porém, aos 60 e 90 dias, não houve diferença estatística entre os meios B83, Stonebrink e Löwenstein-Jensen com piruvato (Tabelas 3 a 6 e Gráfico 1).

Corner e Nicolacopoulos (1988) utilizaram a suspensão de apenas duas cepas de *M. bovis*, uma laboratorial (AN5) e uma isolada de lesão em linfonodo bovino, e obtiveram uma proporção de isolados maior em B83, após 90 dias de incubação, seguido de Löwenstein-Jensen com piruvato, Stonebrink e Middlebrook 7H11 modificado com adição de antibióticos, cujo protocolo foi descrito por Gallagher e Horwill (1977).

Cousins, Francis e Gow (1989) também observaram maior proporção de isolados, após 60 dias de incubação, nos meios B83 e Stonebrink com concentração de verde de malaquita reduzida em três vezes, de 0,066 a 0,021%. Entre esses meios não houve diferença significativa entre as proporções de sucesso no isolamento, não obstante em 20 oportunidades tenha ocorrido crescimento apenas no B83 e em sete apenas no Stonebrink.

A mesma situação foi observada por Birn (1965), entre uma modificação do meio de Tarshis com sangue ovino e Stonebrink, e pelo presente estudo, no qual sete amostras apresentaram crescimento apenas no meio Stonebrink, quatro apenas no B83 e cinco foram detectadas apenas por Löwenstein-Jensen com piruvato.

Em relação ao tempo transcorrido até o aparecimento das primeiras colônias, no presente estudo os melhores resultados foram observados para os meios B83 (média de 30 dias) e Stonebrink (média de 37 dias) (Tabelas 7 e 8). Resultado semelhante foi encontrado por Corner (1994), em estudos com 491 amostras coletadas de bovinos reatores a tuberculina, com a média de tempo do aparecimento da primeira colônia de 27 dias para B83 e 36 dias para Stonebrink.

Vários autores constataram que o aparecimento das primeiras colônias de *M. bovis* foi mais precoce nos meios a base de ágar do que nos meios a base de ovo (BIRN, 1965; GALLAGHER; HORWILL, 1977; CORNER; NICOLACOPOULOS, 1988; COUSINS; FRANCIS; GOW, 1989), com aproximadamente uma semana de diferença (COUSINS; FRANCIS; GOW, 1989)

Em relação ao número de UFC de *M. bovis*, não houve diferença entre os meios B83, Stonebrink e Löwenstein-Jensen com piruvato, que foram superiores ao 7H11 (Tabelas 9 a 14). Resultados semelhantes foram observados por Cousins, Francis e Gow (1989). Porém, Gallagher e Horwill (1977) observaram um crescimento mais abundante em 7H11 adicionado com antibióticos, quando comparado aos meios de Tarshis (ágar sangue precursor do B83), Löwenstein-Jensen com piruvato e Stonebrink.

Em relação aos dados consolidados para as condições de incubação, o presente estudo constatou que o acréscimo de 10% de CO₂ na atmosfera diminuiu o tempo necessário para o aparecimento das primeiras colônias (Tabelas 21 e 22), com médias de 31 dias para incubação em atmosfera de 10% de CO₂, 38 para o fechamento do tubo com algodão queimado e 40 para incubação em estufa normal. Além disso, aumentou o número de UFC isoladas aos 30, 60 e 90 dias de incubação (Tabelas 23 a 28) e a proporção de sucesso no isolamento aos 30 dias, mas não aos 60 e 90 dias de incubação (Tabelas 15 a 20 e Gráfico 2).

Embora o *M. bovis* seja classificado como microaerófilo e ter o aumento da concentração de CO₂ na atmosfera de incubação, preconizado como fator de crescimento, são raros os experimentos que testaram essa hipótese. Curiosamente, a característica microaerófila foi atribuída ao *M. bovis* apenas pela observação do seu crescimento profundo em meio semi-sólido (MARKS, 1972; MARKS, 1976; COLLINS; YATES; GRANGE, 1982). Existem estudos conduzidos com acréscimo de CO₂ (CORNER; NICOLACOPOULOS, 1988; CORNER; TRAJSTMAN; 1988), e outros em atmosfera normal (COUSINS; FRANCIS; GOW, 1989), sempre relatando êxito no isolamento. Apenas Corner (1994), em estudo com 43 amostras, relatou que a inclusão de 5% de CO₂ na atmosfera de incubação não teve efeito na taxa de crescimento ou no número de colônias de *M. bovis* no primo isolamento, e que concentrações acima de 5% inibiram o crescimento.

A análise dos dados não consolidados mostrou que o acréscimo de CO₂ na atmosfera de incubação foi importante para os meios de cultura a base de ovo apenas no seu início, ou seja, aos 30 dias (Tabelas 29 e 30), diminuindo ou mesmo desaparecendo com o evoluir da incubação (Tabelas 29 a 34 e 37 a 42). Esse comportamento não foi observado nos meios a base de ágar, para os quais a incubação em atmosfera de 10% de CO₂ não influenciou nenhum parâmetro estudado (Tabelas 29 a 34 e 37 a 42). Assim, os resultados do presente experimento concordam apenas com a primeira das afirmações de Corner, Lund e Kyrwult¹ (apud

¹CORNER; LUND; KYRWULT. Dados não publicados [s.d.]

CORNER; NICOLACOPOULOS, 1988, p. 203), de que a presença de CO₂ (5%) aumenta o crescimento de *M. bovis* em meios a base de ovo e diminui em meios a base de ágar.

Os meios de cultura Stonebrink, Löwenstein-Jensen com piruvato e B83 apresentaram performances iguais em relação às variáveis estudadas e sempre superiores à do meio Middlebrook 7H11 (Tabelas 31 a 42). Isso pode ser explicado pela presença de glicerol na formulação desse último, que é tóxica para o *M. bovis* (KEATING et al., 2005). Conflitando com esses resultados, Gallagher e Horwill (1977), Corner e Nicolacopoulos (1988) e Corner e Trajstman (1988), reportaram um bom desempenho do 7H11 no primo isolamento de *M. bovis*. Robbe-Austerman, Bravo e Harris (2009) utilizaram variações do 7H11 para o mesmo propósito e verificaram bons resultados.

Assim, é importante ressaltar que o meio Middlebrook 7H11, para os isolados brasileiros de *M. bovis* do presente estudo, apresentou os piores resultados, além de ser o mais caro dos quatro meios de cultura ensaiados (em Janeiro/2009: R\$5,87/tubo, contra R\$0,53/tubo para B83 e R\$0,11/tubo para Stonebrink e Löwenstein-Jensen com piruvato).

Adicionalmente, os melhores resultados dos meios Stonebrink, Löwenstein-Jensen com piruvato e B83 sempre apareceram na incubação com atmosfera de 10% de CO₂ (Tabelas 35, 37, 39 e 41).

Pela análise dos resultados da proporção de sucesso de isolamento para os dados não consolidados (Tabelas 31 e 33), a dilatação do tempo de incubação de 60 para 90 dias levou a um pequeno ganho de sensibilidade, especialmente para os meios a base de ovo.

Corner e Nicolacopoulos (1988) sugeriram o uso de mais de um tipo de meio de cultura para o primo isolamento de *M. bovis*, pois as colônias aparecem mais rápido em meios a base de ágar, mas há maior crescimento em meios a base de ovo. Segundo Cousins, Francis e Gow (1989), dois tubos de B83 e dois tubos de meio a base de ovo são recomendados para o isolamento de rotina, pois o meio ágar sangue é simples e barato, e o fundo vermelho escuro facilita a identificação de colônias. Porém, no presente estudo, as colônias apresentaram-se translúcidas e levemente escurecidas em um fundo de cor marrom do meio B83 (Foto 1), o que, juntamente com os debrís do inóculo, dificultou a observação.

Considerando que os números brutos do presente estudo mostraram melhores resultados sempre para os meios Stonebrink e B83 incubados em atmosfera com CO₂ e que em sete oportunidades houve isolamento de *M. bovis* apenas no meio de Stonebrink e em quatro apenas no B83, a melhor estratégia de primo isolamento de *M. bovis* é a utilização desses dois meios de cultura em paralelo, incubados por 90 dias a 37°C em atmosfera com acréscimo de CO₂.

7 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos, podemos concluir que:

- o acréscimo de CO₂ na atmosfera de incubação foi importante para os meios de cultura a base de ovo apenas no início da incubação (30 dias), diminuindo ou mesmo desaparecendo com o passar do tempo (60 e 90 dias);
- a incubação em atmosfera de 10% de CO₂ não influenciou o isolamento de *M. bovis* em meios a base de ágar;
- os meios de cultura Stonebrink, Löwenstein-Jensen com piruvato e B83 apresentaram performances iguais e sempre superiores à do meio Middlebrook 7H11;
- a dilatação do tempo de incubação de 60 para 90 dias levou a um pequeno ganho de sensibilidade, especialmente para os meios a base de ovo;
- a melhor estratégia de primo isolamento de *M. bovis* é a utilização dos meios Stonebrink e B83 em paralelo, incubados por 90 dias a 37°C em atmosfera com acréscimo de CO₂.

REFERÊNCIAS

- AMBROSIO, S. R.; OLIVEIRA, E. M. D.; RODRIGUEZ, C. A. R.; FERREIRA NETO, J. S.; AMAKU, M. Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 241-244, 2008.
- BEAM, R. E.; KUBICA, G. P. Stimulatory effects of carbon dioxide on the primary isolation of tubercle bacilli on agar-containing medium. **The American Journal of Clinical Pathology**, Baltimore, v. 50, n. 3, p. 395-397, 1968.
- BEMER-MELCHIOR, P.; DRUGEON, H. B. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* for DNA typing analysis. **Journal of Clinical microbiology**, Washington, v. 37, n. 7, p. 2350-2351, 1999.
- BIRN, K. J. Blood medium for the isolation of tubercle bacilli. **British Veterinary Journal**, London, v. 121, n. 9, p. 437-441, 1965.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 101, de 17.08.93. **Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos. 1991/1992** - 2. rev. Brasília: Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, 1993. 136p.
- CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Tuberculosis**. Bacteriologia de la tuberculosis: el cultivo del *Mycobacterium tuberculosis*. Buenos Aires: CPZ, 1985. (Nota técnica, n. 27).
- CHAUHAN, M. M.; SREENIVAS, T. R.; CHAUDHURI, K. Effect of carbon dioxide on the primary isolation of mycobacteria. **Indian Journal of Tuberculosis**, New Delhi, v. 38, n. 2, p. 81-85, 1991.
- COLLINS, C. H.; YATES, M. D.; GRANGE, J. M. Subdivision of *Mycobacterium tuberculosis* into five variants for epidemiological purposes: methods and nomenclature. **The Journal of Hygiene**, London, v. 89, n. 2, p. 235-242, 1982.
- COLLINS, C. H.; GRANGE, J. M. A Review The bovine tubercle bacillus. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 55, n. 1, p. 13-29, 1983.
- CORNER, L. A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 40, n. 1-2, p. 53-63, 1994.

CORNER, L. A.; NICOLACOPOULOS, C. Comparison of media used for the primary isolation of *Mycobacterium bovis* by veterinary and medical diagnostic laboratories. **Australian Veterinary Journal**, Sydney, v. 65, n. 7, p. 202-205, 1988.

CORNER, L. A.; TRAJSTMAN, A. C. An evaluation of 1-Hexadecylpyridinium Chloride as a decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p.127-134, 1988.

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

COUSINS, D. V. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. **Revue Scientifique et Technique (Internacional Office of Epizootics)**, Paris, v.20, n. 1, p.71-85, 2001.

COUSINS, D. V.; FRANCIS, B. R.; GOW, B. L. Advantages of a new agar medium in the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 20, n. 1, p. 89-95, 1989.

DAVIES, R. The effect of carbon dioxide on the growth of the tubercle bacillus. **The British Journal of Experimental Pathology**, London, v. 21, n. 5, p. 243-253, 1940.

GALLAGHER, J.; HORWILL, D. M. A selective oleic acid albumin agar medium for the cultivation of *Mycobacterium bovis*. **The Journal of Hygiene**, London, v. 79, n. 1, p. 155-160, 1977.

GRANGE, J. M.; COLLINS, J. D.; O'REILLY, L. M.; COSTELLO, E.; YATES, M. D. Identification and characteristics of *Mycobacterium bovis* isolated from cattle, badgers and deer in the Republic of Ireland. **Irish Veterinary Journal**, Dublin, v. 43, n. 2, p. 33-35, 1990.

GRANGE, J. M.; YATES, M. D. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 40, n. 1-2, p. 137-151, 1994.

GRUFT, H.; LODER, A. Enhancing effects oh carbon dioxide on the primary isolation of acid-fast bacilli in a modified Lowenstein-Jensen medium. **Applied Microbiology**, Washington, v. 22, n. 5, p. 944-945, 1971.

KARLSON, A. G.; LESSEL, E. F. *Mycobacterium bovis* nom. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 20, n. 3, p. 273-282, 1970.

KEATING, L. A.; WHEELER, P. R.; MANSOOR, H.; INWALD, J. K.; DALE, J.; HEWINSON, R. G.; GORDON, S. V. The pyruvate requirement of some members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is due to an inactive pyruvate kinase: implications for *in vivo* growth. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 56, n. 1, p. 163-174, 2005.

KRASNOW, I.; WAYNE, L. G. Comparison of methods for tuberculosis bacteriology. **Applied Microbiology**, Washington, v. 18, n. 5, p. 915-917, 1969.

KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D.; FROTHINGHAM, R.; HAAS, W. H.; HERMANS P. W. M.; MARTÍN, C.; PALITTAPONGARNPIM, P.; PLIKAYTIS, B. B.; RILEY, L. W.; YAKRUS, M. A.; MUSSER, J. M.; VAN EMBDEN, J. D. A. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 8, p. 2607-2618, 1999.

LAGE, A. P.; ROXO, E.; MÜLLER, E.; POESTER, F.; CAVALLÉRO, J. C. M.; FERREIRA NETO, J. S.; MOTA, P. M. P. C.; GONÇALVES, V. S. P. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Brasília: MAPA, 2006. 184p. (manual técnico).

LESSLIE, I. W. A comparison of biological and some cultural methods for the primary isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Comparative Pathology**, London, v.69, n. 1, p.1-10, 1959.

MARKS, J. Classification of mycobacteria in relation to clinical significance. **Tubercle**, London, v. 53, n. 4, p. 259-264, 1972.

MARKS, J. A system for the examination of tubercle bacilli and other mycobacteria. **Tubercle**, London, v. 57, n. 3, p. 207-225, 1976.

MODA, G.; DABORN, C. J.; GRANGE, J. M.; COSIVI, O. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. **Tubercle and Lung Disease**, Edinburgh, v. 77, n. 2, p. 103-108, 1996.

MORRIS, R. S.; PFEIFFER, D. U.; JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 40, n. 1-2, p. 153-177, 1994.

O'REILLY, L. M.; DABORN, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. **Tubercle and Lung Disease**, Edinburgh, v. 76, p. 1-46, 1995. Supplement 1.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE ANIMAL. OIE. Bovine tuberculosis. In:_____. **Manual of Diagnostics Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 2010. v. 2, pt. 2, sec. 2.4, chap. 2.4.7. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BOVINE_TB.pdf>. Acesso em: 28 fev. 2011.

POLLOCK, J. M.; RODGERS, J. D.; WELSH, M. D.; McNAIR, J. Pathogenesis of bovine tuberculosis: The role of experimental models of infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 112, n. 2-4, p. 141-150, 2006.

ROBBE-AUSTERMAN, S.; BRAVO, D.; HARRIS, B. Tissue processing and culture media evaluation for the detection of *Mycobacterium bovis*. In: CONFERENCE, 5., 2009, Wellington. **Abstract...** New Zealand: Hosted by Animal Health Board, 2009. p. 39.

ROCKWELL, G. E.; HIGHBERGER, J. H. Carbon dioxide as a factor in the growth of the tubercle bacillus and of other acidfast organisms. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 38, n. 1, p. 92-100, 1926.

SAINT-EXUPÉRY, A. **O pequeno príncipe**. 48. ed. Rio de Janeiro: Agir, 2009. 96 p.

SCHAEFER, W. B. Growth requirements of dysgonic and eugonic strains of *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis*. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 96, n. 3, p. 207-219, 1952.

SCHAEFER, W. B.; COHN, M. L.; MIDDLEBROOK, G. The roles of biotin and carbon dioxide in the cultivation of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 69, n. 6, p. 706-712, 1955.

SMITH, T. A comparative study of bovine tubercle bacilli and of human bacilli from sputum. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 3, n. 4-5, p. 451-511, 1898.

SPOLIGOTYPING. A PCR-based method to simultaneously detect and type *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. [200-?]. Disponível em: <<http://www.molecular-tb.org/gb/pdf/protocols/SpoligoManual.pdf>>. Acesso em: 04 abr. 2011.

TARSHIS, M. S. Blood mediums for cultivation of *Mycobacterium tuberculosis*. V. Results with agar-agar basal medium and varying concentrations of blood, glycerine and penicillin. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 23, n. 7, p. 661-670, 1953.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BÖTTGER, E. C.; BODMER, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 2, p. 175-178, 1993.

WHITCOMB, F. C.; FOSTER, M. C.; DUKES, C. D. Increased carbon dioxide tension and the primary isolation of mycobacteria. **The American Review of Respiratory Disease**, Baltimore, v. 86, p. 584-586, 1962

APÊNDICE A

Obtenção de isolado de *Mycobacterium bovis*, segundo os meios de cultura e as condições de incubação.

repetições	meios de cultura											
	Sto ¹			LJp ²			7H11 ³			B83 ⁴		
	condição de incubação			condição de incubação			condição de incubação			condição de incubação		
	CO ₂ ⁵	NOR ⁶	QUE ⁷	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR	QUE
1	P ⁸	- ⁹	-	-	-	P	-	-	-	-	P	-
2	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-
3	P	-	-	P	-	P	-	P	P	-	P	-
4	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-
5	-	P	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	P	P	P	-	P	P	-	-	P	P	-
7	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
9	P	P	P	P	P	P	-	P	P	P	P	P
10	P	-	P	P	P	P	P	-	P	P	P	P
11	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-
12	P	-	-	-	P	-	-	P	-	-	P	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-
14	P	P	-	P	P	P	-	-	-	P	-	-
15	P	-	P	P	-	P	-	-	-	-	-	-
16	-	P	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-
17	P	P	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-
18	-	P	-	P	-	-	-	-	-	P	-	-
19	P	P	P	P	P	P	P	-	-	P	P	-
20	-	P	-	P	P	-	-	-	-	P	P	-
21	P	P	P	-	P	P	-	-	-	P	P	P
22	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-
23	P	-	P	P	-	P	-	-	-	-	-	-
24	P	P	P	P	P	P	P	-	-	P	P	P
25	P	P	P	P	P	P	P	P	-	P	P	P
26	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	-	-
27	P	P	-	P	-	P	-	-	-	P	-	-
28	-	P	P	-	P	P	P	-	-	P	P	P
29	P	P	P	P	P	P	-	-	-	P	P	P
30	P	P	P	P	P	P	-	-	-	P	P	-
31	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	-
33	P	-	P	-	P	P	-	-	-	P	P	P
34	P	P	P	P	P	P	P	P	-	P	P	P
35	P	P	-	-	-	-	-	-	-	P	P	P
36	P	P	P	-	-	-	-	-	-	P	-	P
37	P	P	P	P	P	P	P	-	-	P	P	P
38	-	P	P	P	P	P	-	-	-	P	-	P
39	P	P	P	P	P	P	P	-	-	P	P	P
40	P	P	P	P	P	P	-	-	-	P	P	P
41	P	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	P
42	P	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	P
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	P
44	P	-	-	P	-	-	-	-	-	P	P	P
45	P	P	P	-	-	-	P	-	-	P	P	P
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P

¹Stonebrink; ²Löwenstein-Jensen com piruvato; ³Middlebrook 7H11; ⁴Ágar sangue tuberculose; ⁵Atmosfera com 10% de CO₂; ⁶Atmosfera ambiente;

⁷Algodão queimado; ⁸Positivo; ⁹Negativo

APÊNDICE B

Número de UFC de *Mycobacterium bovis* aos 30 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação.

repetições	meios de cultura											
	Sto ¹			LJp ²			7H11 ³			B83 ⁴		
	condição de incubação			condição de incubação			condição de incubação			condição de incubação		
	CO ₂ ⁵	NOR ⁶	QUE ⁷	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR	QUE
1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1	0	0	2	0	0	0	6	1	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	1	2	0	0	0	2	0	0	1	0	0
7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	4	0	5	1,5	0	0	2	2	2	4	2	1
9	3	0	0	2	0	0	0	3	2	0	2	1
10	2	0	0	2	0	0	1	0	2	4	1	3
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	1	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
14	4	2	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0,5	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	1	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	1,5	0	0	0	0	0	0,5	0	0
19	1	0,5	0	1,5	0	0	0	0	0	1	1	0
20	0	0,5	0	1	0	0	0	0	0	1	0,5	0
21	0,5	0,5	0	0	0	0	0	0	0	1	0,5	0,5
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	1,5	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0
24	42,5	0	0,5	38,5	0	0	2	0	0	34,5	19	13,5
25	2,5	0	0	0,5	0	0	0	0	0	7,5	5	1,5
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	0,5	0	0	1	0	0	0	0	0	0,5	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5	0,5	0,5
29	incont ⁸	0	0	3	0	0	0	0	0	1,5	0,5	1
30	4	0	0	incont	0	0	0	0	0	1	0,5	0
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5	0,5	0
33	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
34	11	0	0	10	0	0	0	0	0	7,5	5,5	4
35	0,5	1	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	1
36	1	0,5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
37	41	1	1	33,5	0	0	0	0	0	16	5,5	5
38	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1,5	0	1,5
39	5,5	0	0	7	0	0	0	0	0	4	2	1,5
40	2,5	0	0	2	0	0	0	0	0	3	0	1
41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2
44	34,5	0	0	0	0	0	0	0	0	130	50,5	100
45	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4,5	1,5	1
46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5

¹Stonebrink; ²Löwenstein-Jensen com piruvato; ³Middlebrook 7H11; ⁴Ágar sangue tuberculose; ⁵Atmosfera com 10% de CO₂; ⁶Atmosfera ambiente;

⁷Algodão queimado; ⁸Incontável.

APÊNDICE C

Número de UFC de *Mycobacterium bovis* aos 60 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação.

repetições	meios de cultura											
	Sto ¹			LJp ²			7H11 ³			B83 ⁴		
	condição de incubação			condição de incubação			condição de incubação			condição de incubação		
	CO ₂ ⁵	NOR ⁶	QUE ⁷	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR	QUE
1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
3	1	0	0	incont ⁸	0	1	0	6	8	0	2	0
4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	1	2	1	0	1	2	0	0	1	1	0
7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	4	3,5	5	5	3	3	3	2	2	14	2,5	1
9	3	1	1	incont	1,5	1,5	0	3	2	3	2	1
10	2,5	0	2	4,5	1	1,5	1	0	2	incont	1	3
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	1	0	0	0	1	0	0	9	0	0	1	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
14	4	3	0	5	incont	1	0	0	0	1	0	0
15	0,5	0	0,5	0,5	0	0,5	0	0	0	0	0	0
16	0	0,5	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0
17	1	0,5	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0
18	0	0,5	0	1,5	0	0	0	0	0	0,5	0	0
19	1	1	2	2	0,5	1	0,5	0	0	1	4	0
20	0	2,5	0	1,5	1,5	0	0	0	0	1	1	0
21	0,5	0,5	0,5	0	0,5	0	0	0	0	1	0,5	1
22	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0
23	2	0	0,5	0,5	0	0,5	0	0	0	0	0	0
24	43,5	24	34	40,5	incont	37,5	7	0	0	35,5	24,5	16
25	3	5	1	2	0,5	0,5	0,5	1,5	0	7,5	6	1,5
26	0	0	0	0,5	0	0,5	0	0	0	0	0	0
27	0,5	1	0	1	0	0,5	0	0	0	0,5	0	0
28	0	1	1,5	0	0	0,5	0,5	0	0	1,5	0,5	1,5
29	incont	1	1	3	2	0,5	0	0	0	1,5	1	1
30	4	0,5	1	incont	0,5	1	0	0	0	1	0,5	0
31	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5	0,5	0
33	1	0	0,5	0	0	0	0	0	0	1	0,5	1
34	12	5,5	7	10	8,5	9	2	1,5	0	7,5	5,5	4
35	0,5	5,5	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0,5	1
36	1	0,5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
37	43,5	17	25,5	34,5	18	29	0,5	0	0	18,5	18	12
38	0	0	1	1	1,5	1	0	0	0	1,5	0	1,5
39	6	2,5	4	7	6	36	0,5	0	0	4	2	1,5
40	2,5	1,5	2,5	2	2	2,5	0	0	0	3	1,5	1
41	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2,5	0	0,5
42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5	0	1
43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,5	1	2
44	52,5	0	0	6,5	0	0	0	0	0	238	103	157
45	1,5	0,5	0	0	0	0	0,5	0	0	4,5	2	2
46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

¹Stonebrink; ²Löwenstein-Jensen com piruvato; ³Middlebrook 7H11; ⁴Ágar sangue tuberculose; ⁵Atmosfera com 10% de CO₂; ⁶Atmosfera ambiente;

⁷Algodão queimado; ⁸Incontável.

APÊNDICE D

Número de UFC de *Mycobacterium bovis* aos 90 dias de incubação, segundo os meios de cultura e as condições de incubação.

repetições	meios de cultura											
	Sto ¹			LJp ²			7H11 ³			B83 ⁴		
	condição de incubação			condição de incubação			condição de incubação			condição de incubação		
	CO ₂ ⁵	NOR ⁶	QUE ⁷	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR	QUE
1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
3	3	0	0	incont ⁸	0	1	0	6	8	0	2	0
4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
5	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	1	2	1	0	1	2	0	0	1	1	0
7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	4	3,5	5	5	3	3	3	2	2	14	2,5	1
9	3	1	1	incont	2	1,5	0	3	2	3	2	1
10	2,5	0	2	4,5	1	1,5	1	0	2	incont	1	3
11	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
12	1	0	0	0	1	0	0	9	0	0	1	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
14	4	3	0	5	incont	1	0	0	0	1	0	0
15	0,5	0	1	0,5	0	0,5	0	0	0	0	0	0
16	0	incont	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0
17	1	0,5	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0
18	0	0,5	0	1,5	0	0	0	0	0	0,5	0	0
19	1	incont	2	2	0,5	1	0,5	0	0	1	4	0
20	0	5	0	1,5	incont	0	0	0	0	1	1	0
21	0,5	0,5	0,5	0	0,5	1	0	0	0	1	0,5	1
22	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0
23	2	0	0,5	0,5	0	0,5	0	0	0	0	0	0
24	43,5	24,5	35	42	incont	39	7	0	0	35,5	27,5	16
25	3	5	1,5	2	0,5	0,5	1	1,5	0	7,5	6	1,5
26	0	0	0	0,5	0	0,5	0	0	0	0	0	0
27	0,5	1	0	1	0	0,5	0	0	0	0,5	0	0
28	0	1	1,5	0	0,5	0,5	0,5	0	0	1,5	0,5	1,5
29	incont	1	1	3	4	0,5	0	0	0	1,5	1	1
30	4	0,5	1	incont	0,5	1,5	0	0	0	1	0,5	0
31	0	incont	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5	0,5	0
33	1	0	1	0	0,5	0,5	0	0	0	1	0,5	1
34	12	5,5	7,5	10	9	9	2	20	0	7,5	5,5	4
35	0,5	14	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0,5	1
36	1	0,5	0,5	0	0	0	0	0	0	1	0	1
37	43,5	19	27	34,5	19,5	30,5	0,5	0	0	18,5	19	12,5
38	0	0,5	1	1	1,5	1	0	0	0	1,5	0	1,5
39	6	3,5	4	7	6	43,5	0,5	0	0	4	2	1,5
40	2,5	1,5	2,5	2	5	2,5	0	0	0	3	1,5	1
41	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,5	0,5
42	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5	0	1
43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,5	1	2
44	60	0	0	12	0	0	0	0	0	240	109	165
45	2	0,5	0,5	0	0	0	1	0	0	4,5	2	2
46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

¹Stonebrink; ²Löwenstein-Jensen com piruvato; ³Middlebrook 7H11; ⁴Ágar sangue tuberculose; ⁵Atmosfera com 10% de CO₂; ⁶Atmosfera ambiente;

⁷Algodão queimado; ⁸Incontável.

APÊNDICE E

Tempo em dias para o aparecimento da primeira colônia de *Mycobacterium bovis*, segundo os meios de cultura e as condições de incubação.

repetições	meios de cultura											
	Sto ¹			LJp ²			7H11 ³			B83 ⁴		
	condição de incubação			condição de incubação			condição de incubação			condição de incubação		
	CO ₂ ⁵	NOR ⁶	QUE ⁷	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR	QUE	CO ₂	NOR	QUE
1	28	– ⁸	–	–	–	52	–	–	–	–	34	–
2	–	–	–	–	31	–	–	–	–	–	–	–
3	29	–	–	29	–	52	–	36	29	–	36	–
4	–	–	–	–	36	–	–	–	–	–	–	–
5	–	90	–	36	–	–	–	–	–	–	–	–
6	–	29	29	50	–	57	29	–	–	29	36	–
7	29	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
8	22	50	29	22	50	43	29	29	29	29	29	29
9	22	57	36	29	57	50	–	29	29	36	29	29
10	22	–	43	29	50	43	29	–	29	29	29	29
11	–	–	–	71	–	–	–	–	–	–	–	–
12	29	–	–	–	57	–	–	29	–	–	57	–
13	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	29	–
14	18	30	–	28	42	49	–	–	–	42	–	–
15	21	–	58	28	–	42	–	–	–	–	–	–
16	–	30	–	–	–	60	–	–	–	–	–	–
17	21	30	–	–	–	45	–	–	–	–	–	–
18	–	45	–	28	–	–	–	–	–	28	–	–
19	21	30	45	28	45	49	60	–	–	21	28	–
20	–	30	–	28	45	–	–	–	–	28	30	–
21	28	30	58	–	45	90	–	–	–	28	28	28
22	–	–	–	–	45	–	–	–	–	–	–	–
23	21	–	49	28	–	49	–	–	–	–	–	–
24	18	35	30	21	42	42	30	–	–	18	28	28
25	21	35	42	30	45	45	60	45	–	18	28	28
26	–	–	–	41	–	44	–	–	–	–	–	–
27	27	44	–	30	–	57	–	–	–	27	–	–
28	–	41	41	–	90	48	57	–	–	27	30	27
29	20	41	41	27	35	44	–	–	–	27	30	30
30	20	41	44	20	48	41	–	–	–	30	30	–
31	–	47	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
32	–	–	–	–	–	–	–	–	–	28	30	–
33	16	–	61	–	90	90	–	–	–	19	44	28
34	19	41	44	28	44	41	41	44	–	19	28	28
35	19	30	–	–	–	–	–	–	–	28	41	28
36	28	30	90	–	–	–	–	–	–	19	–	21
37	16	30	30	21	41	41	34	–	–	21	28	28
38	–	90	44	28	44	44	–	–	–	28	–	28
39	16	41	44	21	41	41	44	–	–	19	28	28
40	16	41	41	28	44	44	–	–	–	19	41	28
41	31	–	–	–	–	–	–	–	–	38	78	42
42	78	–	–	–	–	–	–	–	–	35	–	31
43	–	–	–	–	–	–	–	–	–	27	30	30
44	27	–	–	51	–	–	–	–	–	27	27	27
45	27	58	62	–	–	–	37	–	–	27	34	30
46	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	30

¹Stonebrink; ²Löwenstein-Jensen com piruvato; ³Middlebrook 7H11; ⁴Ágar sangue tuberculose; ⁵Atmosfera com 10% de CO₂; ⁶Atmosfera ambiente;

⁷Algodão queimado; ⁸Não houve crescimento.

ANEXO A

Meio de Stonebrink:

- Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) 3,5 g
- Fosfato dissódico ($\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 2 g
- Piruvato de sódio 6,3 g
- Água destilada 1000 mL
- Ovos inteiros 1000 mL
- Solução de Verde de Malaquita 2% 20 mL

Dissolver os sais na água destilada, esterilizar em autoclave durante 15 minutos a 120°C e deixar esfriar.

Lavar os ovos, que devem ser frescos, com água corrente e sabão, limpá-los com gaze embebida em álcool a 70% e quebrá-los em um recipiente estéril até completar 1 L.

Após bater os ovos com auxílio de um aparelho “mixer”, misturá-los à solução salina e à solução de verde de malaquita a 2%.

Filtrar em gaze estéril, distribuir e coagular em posição inclinada a 80°C por 30 minutos.

Obs: se for usado fosfato dissódico com 12 moléculas de H_2O , usar 4 g.

Fonte: Centro Panamericano de Zoonosis (1985).

ANEXO B

Meio de Löwenstein-Jensen com adição de Piruvato de Sódio:

- Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) 1,5 g
- Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,15 g
- Citrato de magnésio 0,37 g
- L-Asparagina 2,2 g
- Piruvato de sódio 2 g
- Água destilada 370 mL
- Ovos inteiros 617 mL
- Solução de Verde de Malaquita a 2% 12 mL

Dissolver os sais e a asparagina em água destilada aquecida e esterilizar na autoclave a 120°C por 15 minutos.

Lavar os ovos com sabão e água. Deixá-los em álcool a 70% por 30 minutos e secar por evaporação em uma superfície limpa.

Quebrar os ovos em um recipiente estéril e homogeneizar com auxílio de um aparelho “mixer”.

Filtrar em gaze estéril em uma proveta até completar 617 mL e adicionar a solução salina e a solução de verde de malaquita a 2%.

Distribuir e coagular em posição inclinada a 80°C por 30 minutos.

Fonte: Corner e Nicolacopoulos (1988).

ANEXO C

Meio Agar Sangue Tuberculose ou B83:

- Extrato de levedura	2 g
- Proteose peptone nº3	2 g
- Casitone	2 g
- Fosfato dissódico	2,5 g
- Fosfato monopotássico	1 g
- Citrato de sódio.....	1,5 g
- Piruvato de sódio	2 g
- L-Asparagina	2,5 g
- Ágar	15 g
- Água destilada	916 mL
- Sangue bovino (estéril e desfibrinado)	83 mL
- Penicilina (20.000unidades/ml)	1,4 mL

Preparar os reagentes com o ágar e a água destilada aquecendo no vapor por 30 minutos para dissolver e esterilizar na autoclave a 120°C por 20 minutos, em seguida deixar esfriar a 50°C.

Adicionar assepticamente o sangue bovino e a penicilina.

Distribuir e armazenar a 4°C.

Fonte: Corner e Nicolacopoulos (1988).

ANEXO D

Meio de Middlebrook 7H11:

- Ágar Middlebrook 7H11 18 g
- Hidrolisado de caseína (digestão pancreática de caseína) 1 g
- Glicerol (glicerina)..... 5 mL
- Água Destilada..... 900 mL
- Enriquecimento OADC¹ 100 mL

Adicionar o ágar, a caseína e o glicerol à água destilada agitando-os suavemente.

Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos e deixar esfriar a 56°C para adicionar assepticamente o enriquecimento à temperatura ambiente.

Homogeneizar com cuidado para evitar a formação de bolhas e distribuir, armazenando a 4°C.

1) BBLtn Middlebrook OACD Enrichment – 13ecton Dickson Microbiology, Systems

Fonte: Cousins, Francis e Gow (1989).

ANEXO E

Protocolo de extração e purificação de Ácido Desoxirribonucléico (DNA):

- retirar uma alçada da massa bacteriana;
- transferir para um microtubo de 1,5 mL com 400µL de tampão TE (10mM TRIS-HCl e 1mM EDTA com pH 8,0);
- homogeneizar;
- incubar a 80°C por 20 minutos;
- adicionar 50µL de lisozima (10mg/mL);
- homogeneizar;
- incubar a 37°C “overnight”;
- adicionar 5µL de proteinase K (10mg/mL) e 70µL de SDS a 10%;
- homogeneizar;
- incubar a 65°C por 10 minutos;
- adicionar 100µL de 5M NaCl;
- adicionar 100µL de CTAB/NaCl pré-aquecida a 65°C;
- homogeneizar;
- incubar a 65°C por 10 minutos;
- adicionar 750µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1);
- homogeneizar;
- centrifugar a 12.000G por 7 minutos;
- transferir 450µL do sobrenadante para um tubo novo;
- adicionar 450µL de isopropanol (2-propanol);
- manter a -20°C por 30 minutos;
- centrifugar a 12.000G por 15 minutos;
- desprezar sobrenadante;
- adicionar 1000µL de etanol 70% gelado;
- centrifugar a 12.000G por 5 minutos;
- desprezar sobrenadante;
- secar a 56°C por 10 minutos;
- ressuspender com 30µL de tampão TE;
- armazenar a -20°C.

Fonte: adaptação de: Kremer et al. (1999) e Bemer-Melchior e Drugeon (1999).

ANEXO F

Protocolo de PRA (Polymerase Chain Reaction Restriction Analysis):

Para um volume final de 50 μ L, cada reação deve conter:

- 8,0 μ L de dNTP 1,25mM;
- 5,0 μ L de tampão 10x PCR Buffer (KCl 50mM; tris-HCl 10mM pH 8,3-9,0)
- 1,5 μ L de MgCl₂ 50mM;
- 0,3 μ L de Taq DNA polimerase platinum 5U/ μ L;
- 25,2 μ L de água ultra pura;
- 2,5 μ L do primer Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3') 10pmol/ μ L;
- 2,5 μ L do primer Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3') 10pmol/ μ L;
- 5 μ L do DNA extraído.

A amplificação ocorre com 45 ciclos das seguintes temperaturas:

- 94°C por 1 minuto;
- 60°C por 1 minuto;
- 72°C por 1 minuto;
- 1 ciclo de extensão final de 72° C por 10 minutos.

Para a digestão do fragmento amplificado, cada reação tem volume final de 20 μ L:

*Bst*EII

- 0,5 μ L da enzima *Bst*EII (5U);
- 0,2 μ L de BSA (soro albumina bovina);
- 2,0 μ L de D 10x Buffer;
- 7,3 μ L de água ultra pura;
- 10 μ L do produto amplificado;
- 60°C por 90 minutos.

*Hae*II

- 0,5 μ L da enzima *Hae*II (5U);
- 2 μ L de REact 2;

- 7,5 μ L de água ultra pura;
- 10 μ L do produto amplificado;
- 37°C por 60 minutos.

Para visualizar o produto amplificado digerido por eletroforese:

- utilizar uma cuba horizontal com gel de agarose a 3% imerso em tampão Tris-Borato-EDTA (Tris-Borato 0,04M; EDTA 0,5mM);
- homogeneizar 10 μ L de cada amostra com 2 μ L de corante (30% de glicerol : 0,25% de azul bromofenol);
- corar o gel em solução de brometo de etídio a 0,5 μ g/mL;
- visualizar em transluminador ultravioleta (UV);

Pode ser fotografado por um sistema de foto-documentação.

A interpretação do padrão de bandas é realizada através do site:
www.app.chuv.ch/prasite.

Fonte: adaptação de: Telenti et al. (1993).

ANEXO G

Protocolo de Spoligotyping:

Para um volume final de 50µL, cada reação deve conter:

- 8,0µL de dNTP 1,25mM;
- 5,0µL de tampão 10x PCR Buffer (KCl 50mM; tris-HCl 10mM pH 8,3-9,0)
- 2,5µL de MgCl₂ 50mM;
- 0,25µL de Taq DNA polimerase platinum 5U/µL;
- 31,25µL de água ultra pura;
- 1,0µL do primer DRa (5'–GGGTTTGGGTCTGACGAC–3') 10pmol/µL;
- 1,0µL do primer DRb (5'–CCGAGAGGGGACGGAAAC–3') 10pmol/µL;
- 1,0µL do DNA extraído (incluir *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG como controles positivos, e água como controle negativo).

A amplificação ocorre com as seguintes temperaturas:

- desnaturação a 94°C por 3 minutos;
- 30 vezes do ciclo:
- 94°C por 1 minuto;
- 55°C por 1 minuto;
- 72°C por 30 segundos;
- 1 ciclo de extensão final de 72° C por 7 minutos.

Hibridização e detecção:

- preparar as seguintes soluções e pré aquecê-las antes de usar:
 - 2x SSPE/0,1% de SDS a 42°C;
 - 2x SSPE/0,5% de SDS a 60°C;
 - 2x SSPE/0,5% de SDS a 42°C;
 - 2x SSPE a temperatura ambiente.
- adicionar 20µL do produto amplificado a 180µL de 2x SSPE/0,1%SDS;
- desnaturar a 99°C por 15 minutos, em seguida resfriar em gelo imediatamente;
- lavar a membrana em 250 mL de 2x SSPE/0,1% de SDS a 42°C por 5 minutos;

- ajustar a membrana e um suporte acolchoado no miniblatter de modo que as linhas de aplicação das sondas fiquem perpendiculares à aplicação das amostras;
- remover o fluido residual das linhas de aplicação por aspiração;
- preencher as linhas de aplicação com o produto amplificado diluído evitando bolhas de ar e hibridizar a 60°C por 60 minutos em superfície horizontal;
- remover as amostras do miniblatter por aspiração e retirar a membrana com auxílio de pinças;
- lavar duas vezes a membrana em 250 mL de 2x SSPE/0,5% de SDS a 60°C por 5 minutos;
- colocar a membrana em uma bolsa de hibridização e resfriar;
- adicionar 5µL de conjugado estreptovidina-peroxidase (500U/mL) diluída em 14 mL de 2x SSPE/0,5% de SDS e incubar a 4°C por 60 minutos;
- lavar duas vezes a membrana em 250 mL de 2x SSPE/0,5% de SDS a 42°C por 10 minutos;
- enxaguar a membrana duas vezes em 250 mL de 2x SSPE em temperatura ambiente por 5 minutos;
- incubar a membrana por 2 minutos com 16 mL de reagentes de quimioluminescência (ECL® Amersham Pharmacia);
- cobrir a membrana com uma folha plástica transparente e com um filme sensível à luz por 20 minutos.
- revelar o filme com reagentes para radiografia

Regeneração da membrana:

- lavar duas vezes a membrana em solução 1% de SDS a 80°C por 30 minutos;
- lavar a membrana em solução de 20mM de EDTA pH 8,0, a temperatura ambiente por 15 minutos;
- armazenar membrana a 4°C.

Fonte: adaptação de: Spoligotyping ([200-?]).