FLÁVIA MORATO

**Avaliação do Borato de Sódio como conservante de amostra
de tecido com lesão tuberculosa**

São Paulo

2011

FLÁVIA MORATO

**Avaliação do Borato de Sódio como conservante de amostra de tecido com lesão
tuberculosa**

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental 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 Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

2429
FMVZ

Morato, Flávia

Avaliação do Borato de Sódio como conservante de amostra de tecido com lesão
tuberculosa / Flávia Morato. – 2011.

56 f. : il.

Tese (Doutorado) - 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. Borato de sódio. 2. *Mycobacterium bovis*. 3. Tuberculose. 4. Conservante.
5. Bovino I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do borato de sódio como conservante de amostra de tecido com lesão tuberculosa", protocolado sob o nº 1415/2008, utilizando 90 (noventa) hamsters, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 18/06/2008.

We certify that the Research "Evaluation of sodium borat as a conservant to tuberculous tissue samples", protocol number 1415/2008, utilizing 90 (ninety) hamsters, under the responsibility Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/18/2008.

São Paulo, 09 de dezembro de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
Fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FICHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MORATO, Flávia

Título: Avaliação do Borato de Sódio como conservante de amostra de tecido com lesão tuberculosa.

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Julgamento _____

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. José Soares Ferreira Neto, pela orientação e incentivo em todas as etapas deste projeto.

Ao Professor Dr. Marcos Amaku, pela co-orientação e essencial apoio na análise estatística dos resultados.

Ao Dr. Alemar Costa e funcionários do Frigorífico Mantiqueira, pela receptividade e concessão das amostras de bovinos.

À minha família, Ivone, José Petrônio (in memoriam), Lucinha & Luciano, Marina e Carolina pelo apoio, incentivo e companheirismo.

Às tias e primos, Glória, Carol e Bruno, Vanda e Claudio, Maria Helena e Kika, e Lúcia que não estão tão perto geograficamente, mas que de uma forma ou de outra com pequenos gestos e momentos de alegria contribuíram muito para que essa jornada fosse realizada.

À Cássia, pela amizade, pelo incentivo e essencial ajuda em todas as etapas desse projeto nesses quatro anos. Muito obrigada Titica!

À Amane e Vivi, pela amizade e incentivo nessa jornada de seis anos juntas! Mani, tu sempre terás uma família paulista guria! Foram muitos momentos juntas!

A Zenaide e Gisele pela amizade, dedicação durante esses seis anos de LZB e pela constante ajuda. No final, o trabalho torna-se a menor parte de todas as recordações e momentos em que estivemos juntas!

Às amigas Fabi e Fe Cury, Myrna, Ge, Regiane, Carol Sanchez e Dedé que nesses muitos anos de amizade, e nos inúmeros bons momentos juntas, contribuíram para que mais essa etapa de minha vida se concretizasse.

Ao Lincoln pela ajuda na formatação.

À todos os amigos do Laboratório de Zoonoses Bacterianas: FlaviaCarol, Léia, Erika, Vanessa e aos estagiários e residentes que passaram por lá.

Aos amigos do VPS: Sheila, Bispo, Danival, Alexandre, Cristina, Virginia, Sandra, Renatinho, Tânia, Carol, Jucélia pelo companheirismo, apoio e incentivo, e por todos os inúmeros momentos de diversão.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado para a realização desta pesquisa.

Aos funcionários da Biblioteca, em especial à Elza, pelas sugestões e ajuda crucial na conclusão deste trabalho.

RESUMO

MORATO, F. **Avaliação do Borato de Sódio como conservante de amostra de tecido com lesão tuberculosa.** [Evaluation of the Sodium Tetraborate as a preservative of tissue samples with tuberculous lesion]. 2011. 56 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Avaliou-se a atividade conservante do Borato de Sódio para amostras de tecidos com lesão tuberculosa. Inicialmente, foi feito um teste de inoculação experimental em hamsters. A partir dos resultados observados neste estudo, foram selecionadas as variáveis para a segunda etapa do experimento, com lesões de abatedouro de bovinos. Noventa hamsters foram inoculados experimentalmente com *Mycobacterium bovis* e foram eutanasiados 40 dias após a inoculação, quando foi feita a colheita dos baços. Esses órgãos foram, individualmente, armazenados em solução saturada de Borato de Sódio, em quatro períodos de armazenamento distintos (30, 60, 90 e 120 dias após a eutanásia), em duas temperaturas (27°C e 37°C), exceto o grupo controle processado no dia da eutanásia. Na segunda etapa do experimento, 69 lesões de órgãos de bovinos foram colhidas de um abatedouro e armazenadas em solução de borato de sódio em três períodos de armazenamento distintos (30, 60 e 90 dias após a colheita), na temperatura de 27°C, exceto o grupo controle, processado no dia de entrada no laboratório. As análises dos dois experimentos foram feitas separadamente e mostraram-se concordantes. Em relação aos períodos de armazenamento dos órgãos em Borato de Sódio foram consideradas duas variáveis, a proporção de isolados de micobactérias a partir dos órgãos e o número de U.F.C. de micobactérias desses mesmos órgãos. Com base nos resultados observados em ambos os testes, concluiu-se que o armazenamento de tecidos com lesões tuberculosas em solução de Borato de Sódio pode ser feito por até 30 dias em altas temperaturas, 27°C a 37°C. Além disso, observou-se que conforme a temperatura ambiente aumenta, diminui a sensibilidade do isolamento de *M. bovis* a partir de amostras armazenadas em solução saturada de Borato de Sódio.

Palavras-chave: Borato de Sódio. *Mycobacterium bovis*. Tuberculose. Conservante. Bovino.

ABSTRACT

MORATO, F. **Evaluation of the Sodium Tetraborate as a preservative of tissue samples with tuberculous lesion.** [Avaliação do Borato de Sódio como conservante de amostra de tecido com lesão tuberculosa]. 2011. 56 f. Tese. (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The preservative activity of Sodium Tetraborate was evaluated for tissues with tuberculous lesion. Initially, an experimental infection essay was performed in hamsters. Based on the results observed in this essay, the variables for the second experiment, involving samples from a slaughterhouse, were selected. The 90 animals were euthanized 40 days after inoculation when the spleens were collected. These organs were individually stored in saturated Sodium Tetraborate solution, in four distinct storage periods (30, 60, 90 and 120 days after the euthanasia), in two temperatures (27° and 37°C), except for the control group processed on the euthanasia day. On the second part of the experiment, sixty nine samples of bovine organs with tuberculous lesions were collected from a slaughterhouse. The samples were stored in saturated Sodium Tetraborate solution, in three distinct storage periods (30, 60 and 90 days after collection), at the temperature of 27°C, except for the control group processed on the day of entry in the laboratory. The analysis of both experiments were done separately and were concordant. In relation to the storage periods of the organs in Sodium Tetraborate solution, two variables were considered, the proportion of mycobacterial isolates from the organs and the number of mycobacterial C.F.U from the same organs. Based on the results observed on both essays, it was concluded that tissues with tuberculous lesions can be stored in Sodium Tetraborate solution up to 30 days in high temperatures, 27°C a 37°C. Furthermore, it was observed that as the environmental temperature increases the *M. bovis* isolation sensibility from the samples stored in Sodium Tetraborate decreases.

Key-words: Sodium Tetraborate. *Mycobacterium bovis*. Tuberculosis. Preservative. Bovine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Baço de hamster com lesões puntiformes de coloração amarelada na sua superfície - São Paulo – 2011.....	27
Figura 2 -	Baço de hamster inoculado com <i>M.bovis</i> em comparação com baço sadio - São Paulo – 2011.....	27
Figura 3 -	Colônias de <i>M. bovis</i> em garrafas TPP com meio de Stonebrink, com 30 dias de incubação, isoladas a partir de baço de hamster do grupo controle são Paulo – 2011.....	28
Figura 4 -	Eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação realizada com os primers Tb11 e Tb12, caracterizando as amostras como pertencentes ao gênero <i>Mycobacterium</i> – São Paulo – 2011.....	38
Figura 5 -	Frascos plásticos contendo amostras de tecidos bovinos com lesões suspeitas de tuberculose, imersos em solução saturada de Borato de Sódio – São Paulo – 2011.....	38
Figura 6 -	Linfonodo bovino com diversas lesões de formato arredondado e coloração amarelada – São Paulo – 2011.....	39
Figura 7 -	Linfonodo bovino com lesão caseosa – São Paulo – 2011.....	39
Figura 8 -	Pulmão bovino com diversas lesões de formato arredondado e coloração amarelada – São Paulo – 2011.....	40
Figura 9 -	Fígado bovino com diversas lesões de formato arredondado e coloração amarelada – São Paulo – 2011.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número de animais eutanasiados segundo os grupos experimentais – São Paulo – 2011.....	21
Tabela 2 -	Comparação dos períodos de incubação das U.F.C. de <i>M. bovis</i> de baços de hamsters, aos 30, 60 e 90 dias pós-semeadura. Amostras mantidas a 27°C - São Paulo - 2011.....	28
Tabela 3 -	Proporção de isolados de <i>M. bovis</i> AN5 de baços de hamsters, em duas temperaturas de armazenamento em borato de sódio (27 e 37°C), e em três períodos de incubação (30, 60 e 90 dias pós-semeadura) - São Paulo - 2011.....	29
Tabela 4 -	Comparação da proporção de isolados de <i>M. bovis</i> de baços de hamsters entre o grupo controle e os armazenados por 30, 60 e 90 dias em borato de sódio. Amostras mantidas a 27 e 37°C e leituras realizadas aos 90 dias de incubação - São Paulo - 2011.....	30
Tabela 5 -	Média das contagens de U.F.C. de <i>M. bovis</i> AN5 isoladas de baços de hamsters, em duas temperaturas de armazenamento em borato de sódio (27 e 37°C), e em três tempos de incubação (30, 60 e 90 dias pós-semeadura) - São Paulo – 2011.....	32
Tabela 6 -	Comparação de U.F.C. de <i>M. bovis</i> em baço de hamsters entre o grupo controle e os armazenados por 30, 60 e 90 dias em borato de sódio. Amostras mantidas a 27°C e leituras realizadas aos 90 dias de incubação - São Paulo – 2011.....	32

Tabela 7 -	Proporção de isolados de micobactérias de lesões em órgãos de bovinos do grupo controle e dos grupos armazenados por 30, 60 e 90 dias em borato de sódio. Amostras mantidas a 27°C, com leitura aos 90 dias de incubação - São Paulo – 2011.....	35
Tabela 8 -	Comparação da proporção de isolados de lesões em órgãos bovinos do grupo controle e armazenados por 30, 60 e 90 dias em borato de sódio. Amostras mantidas a 27°C, com 90 dias de incubação - São Paulo – 2011	35
Tabela 9 -	Médias das contagens das U.F.C. de micobactérias isoladas de lesões em órgãos de bovinos do grupo controle e dos grupos armazenados por 30, 60 e 90 dias em solução de borato de sódio. Amostras mantidas a 27°C, com leitura aos 90 dias de incubação - São Paulo – 2011.....	36
Tabela 10	Comparação de U.F.C. de micobactérias isoladas de lesões em órgãos de bovinos entre o grupo controle e os armazenados por 30, 60 e 90 dias em solução de borato de sódio. Amostras mantidas a 27°C, com leitura aos 90 dias de incubação - São Paulo – 2011.....	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Proporção de isolados de <i>M. bovis</i> de baços de hamsters armazenados em borato de sódio à 27°C, do grupo controle (0), e dos grupos armazenados por 30, 60, 90 e 120 dias após a eutanásia. Leituras realizadas aos 30, 60 e 90 dias de incubação.....	31
Gráfico 2 -	Proporção de isolados de <i>M. bovis</i> de baços de hamsters armazenados em borato de sódio à 37°C, do grupo controle (0), e dos grupos armazenados por 30, 60, 90 e 120 dias após a eutanásia. Leituras realizadas aos 30, 60 e 90 dias de incubação.....	31
Gráfico 3 -	Média das contagens de U.F.C. de <i>M. bovis</i> isoladas de baços de hamsters armazenados em borato de sódio à 27°C, do grupo controle (0), e dos grupos armazenados por 30, 60, 90 e 120 dias após a eutanásia. Leituras realizadas aos 30, 60 e 90 dias de incubação.....	33
Gráfico 4 -	Média das contagens de U.F.C. de <i>M. bovis</i> isoladas de baços de hamsters armazenados em borato de sódio à 37°C, do grupo controle (0) e dos grupos armazenados por 30, 60, 90 e 120 dias após a eutanásia. Leituras realizadas aos 30, 60 e 90 dias de incubação.....	33
Gráfico 5 -	Proporção de isolados de lesões em órgãos de bovinos, do grupo controle, e dos grupos armazenados por 30, 60 e 90 dias em borato de sódio, na temperatura de 27°C, com leitura aos 90 dias de incubação...	35
Gráfico 6 -	Média das contagens de U.F.C. de micobactérias isoladas de lesões em órgãos de bovinos do grupo controle, e dos grupos armazenados por 30, 60 e 90 dias em borato de sódio, na temperatura de 27°C, com leitura aos 90 dias de incubação.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

%:	Por cento
°C:	Graus Celsius
μL:	Microlitro
FMVZ:	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g:	Grama
HPC	Hexadecylpyridinium Chloride
<i>M. bovis:</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
MIRU-VNTR	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number Tandem Repeat</i>
mL:	Mililitro
P.C.R.:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PRA	<i>PCR Restriction Analysis</i>
PNCBET:	Programa Nacional de Combate e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
r.p.m	Rotações por minuto
U.F.C.:	Unidades Formadoras de Colônias
USP:	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	18
2.1	INFECÇÃO EXPERIMENTAL.....	19
2.1.1	Agente infectante.....	19
2.1.2	Conservante.....	19
2.1.3	Diluyente.....	19
2.1.4	Preparo do inóculo.....	20
2.1.5	Meios de cultura.....	20
2.1.6	Técnica de quantificação das unidades formadoras de colônias (U.F.C.) para leitura do crescimento nas garrafas plásticas contendo meio de stonebrink.....	21
2.1.7	Delineamento da infecção experimental.....	21
2.1.8	Fluxograma da infecção experimental.....	23
2.2	AMOSTRAS PROVENIENTES DE ABATEDOURO BOVINO.....	24
2.2.1	Fluxograma do processamento das amostras colhidas em abatedouro bovino....	25
2.3	TRATAMENTO DOS DADOS.....	26
3	RESULTADOS.....	27
3.1	INFECÇÃO EXPERIMENTAL.....	27
3.1.1	Comparação entre os períodos de incubação (30, 60 e 90 dias pós-semeadura)...	28
3.1.2	Comparação entre os períodos de armazenamento.....	29
3.1.2.1	Comparação entre as proporções de isolados (Teste de comparação de proporções)..	29
3.1.2.2	Comparação entre o número de U.F.C. de <i>M. bovis</i> isoladas de baços de hamsters....	32
3.2	AMOSTRAS PROVENIENTES DE ABATEDOURO BOVINO.....	34
3.2.1	Comparações entre os períodos de armazenamento.....	34
3.2.1.1	Comparação entre as proporções de isolados de micobactérias de lesões em órgãos de bovinos (Teste de comparação de proporções).....	34
3.2.1.2	Comparação entre o número de U.F.C. de micobactérias isoladas de lesões em órgãos de bovinos.....	36
3.2.2	Identificação do gênero dos isolados das lesões em órgãos de bovinos.....	37
4	DISCUSSÃO.....	41

5	CONCLUSÕES.....	44
	REFERÊNCIAS.....	45
	ANEXOS.....	48
	APÊNDICES.....	52

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose animal, além de ser uma zoonose, acarreta prejuízos econômicos para indústria agrícola, perdas na produtividade do rebanho, infecção das crias e condenação dos animais no abate, requerendo altos gastos anuais para o seu controle e erradicação (KREBS et al., 1997).

Apenas uma pequena parte da tuberculose humana é de origem zoonótica e a maioria das infecções humanas pelo *M. bovis* têm caráter ocupacional, acometendo principalmente tratadores, veterinários, laboratoristas e profissionais que lidam diretamente com animais ou seus produtos (COSIVI et al., 1998).

Nos países onde foram executados programas de controle da tuberculose bovina, houve uma drástica redução na frequência da tuberculose zoonótica (KLEEBERG, 1984). No Brasil, a infecção se concentra em bovinos leiteiros, principalmente nos rebanhos com algum grau de tecnificação do modo de produção (BELCHIOR, 2000). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em 11 de janeiro de 2001, instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT). O principal objetivo desse programa é baixar a prevalência da doença e ofertar para os mercados interno e externo produtos de origem animal de baixo risco sanitário (LAGE et al., 2006).

Tradicionalmente, inicia-se o combate à tuberculose bovina com estratégias de controle, que têm como objetivo a diminuição constante do número de focos, o que é feito pela certificação de propriedades livres através de rotinas de testes indiretos sistemáticos com eliminação de positivos. Esse procedimento demanda alto investimento e uma redução importante na prevalência de focos é alcançada no médio e longo prazo (KANTOR; RITACCO, 1994).

Após o que, passa-se para a fase de erradicação, onde o objetivo é a eliminação de todos os focos. Essa transição é feita através da adoção de sistema de vigilância para detecção e saneamento dos poucos focos residuais. Uma boa alternativa é utilizar as informações de abatedouros como base desse sistema. Portanto, as lesões são colhidas em abatedouros, enviadas ao laboratório e, após a confirmação bacteriológica do foco, rastreia-se a

propriedade de origem, que é saneada através de uma rotina de testes tuberculínicos (BROWN; HERNANDEZ DE ANDA, 1998).

Assim sendo, o diagnóstico direto, isto é, a colheita de material suspeito, o envio para o laboratório, o isolamento do agente e a identificação da espécie da micobactéria envolvida são elementos de grande importância para o sistema (AMBROSIO et al., 2008). Atualmente, métodos moleculares têm sido associados à bacteriologia clássica, trazendo eficiência e sofisticação ao diagnóstico direto. O método PRA-PCR significa uma economia de 30 a 60 dias nos procedimentos de identificação (TELENTI et al., 1993) e os métodos *spoligotyping* e MIRU-VNTR permitem a discriminação de isolados de *M. bovis* (HERMANS et al., 1991; SUPPLY et al., 2000).

O sucesso do diagnóstico direto está vinculado às condições em que as amostras são conservadas e transportadas até o laboratório. Se as amostras forem processadas em até 48 horas após a colheita, devem ser conservadas em temperaturas de 4 a 6° C. Se o tempo entre a colheita e o processamento exceder 48 horas, as amostras devem ser congeladas a -20°C (CORNER, 1994). Entretanto, a necessidade de resfriar ou congelar as amostras podem ser considerados complicadores quando se pretende implantar uma operação de colheita em larga escala. Um método simples e que prescindia de frio pode ser mais eficiente, principalmente num ambiente tão heterogêneo em relação ao nível técnico dos abatedouros quanto o brasileiro.

Um método alternativo ao resfriamento ou congelamento é a imersão da amostra em solução saturada de borato de sódio, ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), o bórax, o qual preserva as micobactérias no tecido por até 60 dias no ambiente dos Estados Unidos da América (EUA) (RICHARS; WRIGHT, 1983). Nesse estudo, a temperatura foi referida como sendo de ambiente, não havendo informações sobre variações ou registros dos limites superior e inferior. As amostras foram armazenadas em solução de borato de sódio por até 42 semanas, mas só foi possível isolar micobactérias das amostras conservadas por até 8 semanas. (RICHARS; WRIGHT, 1983).

Embora Hernandez de Handa et al. (1997) tenham afirmado que o borato de sódio elimina a necessidade de descontaminação das amostras suspeitas de tuberculose, Ambrosio et al. (2008) constatou o oposto, registrando uma frequência de 88% de contaminação, em

amostras armazenadas em solução saturada de borato de sódio, que não passaram por processo de descontaminação. Além disso, ao testar três diferentes métodos de descontaminação, os mesmos autores demonstraram que o método HPC foi o mais adequado para a recuperação do *Mycobacterium bovis* a partir de homogenizados de órgãos de bovinos com lesões granulomatosas macroscópicas.

Importante considerar que a taxa de contaminação da amostra pode variar de acordo com o tipo de material, forma como foi coletado e tempo de transporte até o laboratório (CORNER, 1994). A descontaminação da amostra tem por objetivo inativar outras bactérias presentes no material que crescerão mais rapidamente, esgotando os nutrientes do meio e inviabilizando o crescimento do *M. bovis*. (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1972; ROSEMBERG; TARANTINO; PAULA, 1990; DAVID; BRUM; PRIETO, 1994).

Assim, para se organizar uma rotina de colheitas de amostra em abatedouro no âmbito de um sistema de vigilância para tuberculose bovina no Brasil, tendo como forma de transporte um método que prescindia de frio, é necessário conhecer o tempo máximo de armazenamento das amostras para diferentes temperaturas, pois existe grande variação de condições climáticas no País.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o tempo máximo de conservação de amostras de tecido com lesão tuberculosa em solução saturada de borato de sódio, em duas temperaturas distintas (27° e 37°C).

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em duas etapas, a primeira, envolvendo a reprodução da doença em animais de laboratório, para produzir lesões padronizadas, e a segunda, envolvendo material colhido em abatedouro bovino.

Inicialmente foram utilizados modelos biológicos, hamsters, inoculados experimentalmente com *M. bovis*. AN5. Os baços foram os órgãos eleitos para o processamento. A possibilidade de reprodução da tuberculose em modelos biológicos sob condições controladas, como em animais de laboratório de fácil manutenção e manejo, é útil aos estudiosos desta doença. O hamster tem sido empregado como modelo biológico experimental da tuberculose, reproduzindo com facilidade o processo desencadeado pela inoculação do *Mycobacterium bovis* (FERREIRA NETO et al., 1994).

A escolha do baço para os ensaios baseia-se na maior concentração de bacilos nesse órgão após inoculação experimental de micobactérias em hamsters. Em 2002, Oliveira et al., ao inocularem hamsters com diferentes estirpes de *Mycobacterium avium*, compararam as contagens de U.F.C./g e concluíram que essas, quando comparadas, para quatro estirpes, mostraram diferenças entre os órgãos utilizados no experimento (baço, pulmões e fígado), sendo que as quantidades de U.F.C./g foram sempre maiores no baço, seguido em ordem decrescente pelo fígado e pulmão.

A infecção experimental foi uma etapa imprescindível para garantir uniformidade das lesões, em termos de tamanho, tempo de evolução, e quantidade de bacilos, para que fosse possível a comparação entre as temperaturas de incubação e os períodos de armazenamento. Além disso, foram gerados dados para o planejamento da segunda etapa do experimento, com lesões provenientes de um abatedouro de bovinos.

2.1 INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 90 hamsters, machos, com peso entre 70 e 160 gramas, nascidos no biotério da Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia da USP. Durante o experimento os animais receberam ração comercial e água à vontade e eram mantidos sobre cama de maravalha.

2.1.1 Agente infectante

Foi utilizada a estirpe padrão AN5 de *Mycobacterium bovis*.

2.1.2 Conservante

Foi utilizado o borato de sódio como conservante químico na seguinte diluição (RODRIGUEZ et al., 2004).

Solução saturada de borato de sódio:

Borato de sódio.....	140,0 g
Água destilada	1000,0 mL

2.1.3 Diluente

O conservante foi diluído em água destilada, não estéril, em frascos de vidro do tipo Schott®.

2.1.4 Preparo do inóculo

1ª Fase

Passagem da estirpe AN5 em hamsters. Foram pesados 0,02g de colônias de micobactérias e diluídas em 10 mL de solução salina 0,85% estéril. O inóculo foi preparado em frasco estéril contendo pérolas de vidro para facilitar a dispersão das bactérias no veículo de maneira que cada 0,5 mL contenham 1,0g de micobactérias. Foram inoculados dois hamsters com 0,5 mL pela via intra-peritoneal. Após 30 dias os hamsters foram eutanasiados em câmara de CO₂, após o que foi feita colheita não estéril do baço para o processamento com descontaminação por HPC a 1,5% e cultivo em meio de Stonebrink-Leslie. Os cultivos foram mantidos em estufa 37°C, durante 30 dias.

2ª Fase

Pré-Inóculo. A estirpe cultivada em meio de Stonebrink-Leslie foi passada para o meio líquido 7H9 modificado e incubada em shaker a 37°C até obtenção de crescimento satisfatório do pré-inóculo, do qual foi passado 10 µL para 10 mL de 7H9 modificado e incubado a 37°C no shaker até obtenção de um bom crescimento. Em seguida foi adicionada solução salina 0,85% estéril nos tubos até se obter a concentração 10⁹ bactérias/mL da escala de Mac Farland. Em seguida o inóculo obtido da estirpe foi distribuído em eppendorfs e congelado a temperatura - 80°C. Após 10 dias um eppendorf foi descongelado, diluído seriadamente na razão 10 e cada diluição foi semeada em meio de Stonebrink-Leslie para a contagem de unidades formadoras de colônias (U.F.C.), 30 dias após semeadura. A partir das contagens obtidas foi possível estabelecer a estratégia de inoculação, de modo que cada animal do experimento recebeu 3.000 U.F.C. de *Mycobacterium bovis*.

2.1.5 Meios de cultura

Os meios de cultura adotados para o procedimento de isolamento e preparo do inóculo foram o de Stonebrink-Leslie (Anexo A) e o 7H9 modificado (Anexo B). O meio de Stonebrink foi preparado conforme o recomendado pelo Centro Panamericano de Zoonosis (1973) e distribuído em garrafas de plástico, em volume de 9,5 ml/garrafa. Todas as partidas foram submetidas aos testes de esterilidade e crescimento.

2.1.6 Técnica de quantificação das unidades formadoras de colônias (U.F.C.) para leitura do crescimento nas garrafas plásticas contendo meio de stonebrink

Para a contagem das U.F.C. foram adotados os seguintes critérios: a) média aritmética das duas duplicatas de cada amostra b) as contagens de U.F.C. nas placas superiores a 300 foram consideradas incontáveis, foi então adotado para o efeito de cálculo o número 300. Esses critérios foram adaptados de Brasil (1992).

2.1.7 Delineamento da infecção experimental

Foram utilizados dez animais para cada um dos oito grupos experimentais (Tabela 1), cada um contendo 10 hamsters que receberam o agente infectante, além do grupo controle, com 10 animais, destinado ao processamento no dia da eutanásia.

Tabela 1 – Número de animais eutanasiados segundo os grupos experimentais – São Paulo – 2011

<u>Período de armazenamento do baço em solução saturada de borato de sódio</u>				
Grupos	30 dias p.e*	60 dias p.e	90 dias p.e	120 dias p.e
27°C	10	10	10	10
37°C	10	10	10	10

*p.e.: pós-eutanásia

No dia zero o inoculo foi administrado em cada animal pela via intra-peritoneal, no dia 40 pós-inoculação todos os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Foi feita a colheita, não estéril, dos baços, que foram distribuídos em frascos de vidro não estéreis contendo 25 mL de solução de borato de sódio cada, e armazenados em estufas a 27 e 37°C, exceto o grupo controle. A descontaminação pelo método HPC foi feita em cinco tempos experimentais distintos, primeiramente 10 baços no dia da eutanásia dos animais, depois com

trinta dias, depois sessenta, noventa e finalmente cento e vinte dias após a eutanásia. Em cada etapa, seguindo os tempos determinados, os órgãos destinados aos diferentes grupos foram individualmente triturados em *stomacher* com 5,0 mL de solução salina 0,85% estéril. Após a completa homogeneização foi transferido 1 mL de cada solução para tubos *falcon*, com 1 mL de HPC a 1,5% e posteriormente incubados à 37°C, decorridos 20 minutos cada uma das amostras foi centrifugada a 1G por 20 minutos, os sobrenadantes foram desprezados e o sedimento ressuspenso com 1 mL de solução salina à 0,85% estéril. A partir das suspensões homogeneizadas foram semeados 100µL em garrafas plásticas contendo meio de Stonebrink, em duplicatas. Os cultivos foram mantidos em estufa a temperatura de 37°C, foram observados a cada sete dias e a contagem do número de U.F.C. foi realizada 30, 60 e 90 dias após a incubação.

2.1.8 Fluxograma da infecção experimental

2.2 AMOSTRAS PROVENIENTES DE ABATEDOURO BOVINO

Em abatedouro de bovinos, foram colhidas 69 amostras de tecidos de diferentes órgãos com lesões suspeitas de tuberculose. Das 69 amostras, 29 eram lesões em linfonodos, 23 em pulmões, 13 em fígados, 3 em musculatura e 1 em coração. Corner et al. (1990), demonstraram, em bovinos, que as lesões tuberculosas são mais frequentemente encontradas em órgãos ricos em tecido reticuloendotelial, particularmente pulmões e seus linfonodos associados, demais linfonodos e no fígado.

No abatedouro essas amostras foram acondicionadas em frascos plásticos de 0,5 litros, imersas em solução de borato de sódio e enviadas ao laboratório, onde foram armazenadas em estufa a 27°C (Figura 5) e processadas visando o isolamento de micobactérias, conforme já descrito no capítulo 2.1.

A primeira tentativa de isolamento foi realizada no máximo 5 dias após a colheita (grupo controle) e as subsequentes aos 30, 60 e 90 dias após a colheita (Figuras 6 a 9). As colônias isoladas foram submetidas a um protocolo de extração de DNA genômico (Anexo C) e a uma técnica de PCR (Anexo D) para identificação do gênero dos agentes.

2.2.1 Fluxograma do processamento das amostras colhidas em abatedouro bovino

2.3 TRATAMENTO DOS DADOS

A análise dos resultados foi feita com o auxílio dos softwares INSTAT for Windows Release 3.01 (1998), Minitab16 e MedCalc. Os testes utilizados foram: Kruskal-Wallis, Friedman, Dunn e o teste para comparação de proporções.

A comparação entre os períodos de incubação dos isolados de baços de hamsters foi realizada pelo teste de Friedman e de Dunn.

A comparação do número de U.F.C. nos baços de hamsters foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis e de Dunn.

A comparação do número de U.F.C. nas amostras colhidas em abatedouros bovinos foi realizada pelo teste de Friedman e de Dunn.

As proporções de sucesso no isolamento foram comparadas sempre pelo teste de duas proporções.

3 RESULTADOS

3.1 INFECÇÃO EXPERIMENTAL

No momento da necropsia, os sinais observados nos animais infectados experimentalmente foram prostração e pelos eriçados. Os baços apresentaram-se sempre aumentados, com lesões puntiformes de cor amarelada na sua superfície, características de infecção tuberculosa (Figuras 1 e 2). O aspecto das colônias isoladas a partir de baço foi idêntico ao da estirpe AN5, utilizada para confecção do inóculo (Figura 3).

Figura 1 - Baço de hamster com lesões puntiformes de coloração amarelada na sua superfície

Figura 2 - Baço de hamster inoculado com *M.bovis* em comparação com baço sadio

Figura 3 - Colônias de *M. bovis* em garrafas TPP com meio de Stonebrink, com 30 dias de incubação, isoladas a partir de baço de hamster do grupo controle

As contagens das U.F.C. de *M. bovis* de baços de hamsters estão nos apêndices A, B e C. A partir das contagens apresentadas no apêndice A, foram calculadas as médias das U.F.C. encontradas nas 10 repetições, obtendo-se um único valor médio para cada dia de leitura nos diferentes períodos de armazenamento em borato de sódio, essas médias estão relacionadas na tabela 5. Além disso, as proporções de isolados nas garrafas de cultivo estão descritas na tabela 3.

3.1.1 Comparação entre os períodos de incubação (30, 60 e 90 dias pós-semeadura)

A leitura das U.F.C. de *M. bovis* feita aos 90 dias de incubação, mostrou-se a mais apropriada. Embora não tenha sido constatada diferença de número de U.F.C. entre 30 e 60 ou 60 e 90 dias de incubação, houve diferença entre 30 e 90 dias (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação dos períodos de incubação das U.F.C. de *M. bovis* de baços de hamsters, aos 30, 60 e 90 dias pós-semeadura. Amostras mantidas a 27°C - São Paulo - 2011

Período de incubação	Valor de P
leitura aos 30 dias vs. leitura aos 60 dias	P>0.05
leitura aos 30 dias vs. leitura aos 90 dias	P<0.05
leitura aos 60 dias vs. leitura aos 90 dias	P>0.05

3.1.2 Comparações entre os períodos de armazenamento

Em relação aos períodos de armazenamento dos baços em borato de sódio foram consideradas duas variáveis, a proporção de isolados de *M. bovis* a partir de baços e o número de U.F.C de *M. bovis* desses mesmos órgãos.

3.1.2.1 Comparação entre as proporções de isolados de *M. bovis* em baços de hamsters (Teste de comparação de proporções)

Os valores das proporções de isolados são apresentados na tabela 3, e nos gráficos 1 e 2. As comparações dessas proporções foram feitas considerando-se sempre a leitura aos 90 dias de incubação e as duas temperaturas de armazenamento (27 e 37° C). Os resultados constam na tabela 4 e nos gráficos 1 e 2.

Tabela 3 - Proporção de isolados de *M. bovis* AN5 de baços de hamsters, em duas temperaturas de armazenamento em borato de sódio (27 e 37°C), e em três períodos de incubação (30, 60 e 90 dias pós-semeadura) - São Paulo - 2011

Período de incubação	Dias de armazenamento em solução de borato de sódio							
	0 dias da eutanásia	30 dias da eutanásia		60 dias da eutanásia		90 dias da eutanásia		120 dias da eutanásia
	-	27°C	37°C	27°C	37°C	27°C	37°C	27°C 37°C
30 dias	100	90	20	0	0	10	0	10 0
60 dias	100	100	70	40	0	10	0	10 0
90 dias	100	100	70	40	0	10	0	10 0

Tabela 4 - Comparação da proporção de isolados de *M. bovis* de baços de hamsters entre o grupo controle e os armazenados por 30, 60 e 90 dias em borato de sódio. Amostras mantidas a 27 e 37°C e leituras realizadas aos 90 dias de incubação - São Paulo - 2011

Períodos de armazenamento	Valores de P
Temperatura de armazenamento de 27° C	
armazenados por 0 dia vs. armazenados por 30 dias	P>0.05
armazenados por 0 dia vs. armazenados por 60 dias	0,0147
armazenados por 0 dia vs. armazenados por 90 dias	0,0003
armazenados por 30 dias vs. armazenados por 60 dias	0,0147
armazenados por 30 dias vs. armazenados por 90 dias	0,0003
armazenados por 60 dias vs. armazenados por 90 dias	0,3017
Temperatura de armazenameto de 37° C	
armazenados por 0 dia vs. armazenados por 30 dias	0,2104
armazenados por 0 dia vs. armazenados por 60 dias	0,0001
armazenados por 0 dia vs. armazenados por 90 dias	0,0001
armazenados por 30 dias vs. armazenados por 60 dias	0,0049
armazenados por 30 dias vs. armazenados por 90 dias	0,0049
armazenados por 60 dias vs. armazenados por 90 dias	P>0.05
Armazenamento em borato de sódio por 30 dias	
armazenamento a 27° C vs. armazenamento a 37° C	0,2104
Armazenamento em borato de sódio por 60 dias	
armazenamento a 27° C vs. armazenamento a 37° C	0,0935
Armazenamento em borato de sódio por 90 dias	
armazenamento a 27° C vs. armazenamento a 37° C	1

Gráfico 1 - Proporção de isolados de *M. bovis* de baços de hamsters armazenados em borato de sódio à 27°C, do grupo controle (0), e dos grupos armazenados por 30, 60, 90 e 120 dias após a eutanásia. Leituras realizadas aos 30, 60 e 90 dias de incubação

Gráfico 2 - Proporção de isolados de *M. bovis* de baços de hamsters armazenados em borato de sódio à 37°C, do grupo controle (0), e dos grupos armazenados por 30, 60, 90 e 120 dias após a eutanásia. Leituras realizadas aos 30, 60 e 90 dias de incubação

3.1.2.2 Comparação entre o número de U.F.C. de *M. bovis* isoladas de baços de hamsters

As médias das contagens de U.F.C. de *M. bovis* de baços de hamsters nos diferentes períodos de armazenamento em borato de sódio e aos 30, 60 e 90 dias de incubação, nas temperaturas de 27 e 37°C, estão relacionadas na tabela 5 e nos gráficos 3 e 4.

As comparações dos números de U.F.C. de *M. bovis*, nos mesmos órgãos, nos diferentes períodos de armazenamento em borato de sódio, aos 90 dias de incubação, e a temperatura de 27°C, estão relacionadas na tabela 6. O grupo controle (0 dia) apresentou mediana de 300 U.F.C. de *M. bovis*, seguido do grupo armazenado por 30 dias em borato de sódio, a temperatura de 27°C, com mediana de 108,75 U.F.C. de *M. bovis* (Apêndice D) (Gráfico 3).

Tabela 5 - Média das contagens de U.F.C. de *M. bovis* AN5 isoladas de baços de hamsters, em duas temperaturas de armazenamento em borato de sódio (27 e 37°C), e em três tempos de incubação (30, 60 e 90 dias pós-semeadura) - São Paulo – 2011

Período de incubação	Dias de armazenamento em solução de borato de sódio								
	0 dias da eutanásia	30 dias da eutanásia		60 dias da eutanásia		90 dias da eutanásia		120 dias da eutanásia	
	-	27°C	37°C	27°C	37°C	27°C	37°C	27°C	37°C
30 dias	300	92,9	34	0	0	0,5	0	12,75	0
60 dias	300	139,1	47,65	10,65	0	4,15	0	20	0
90 dias	300	147,4	47,75	10,95	0	5	0	20	0

Tabela 6 - Comparação de U.F.C. de *M. bovis* em baço de hamsters entre o grupo controle e os armazenados por 30, 60 e 90 dias em borato de sódio. Amostras mantidas a 27°C e leituras realizadas aos 90 dias de incubação - São Paulo - 2011

Períodos de armazenamento em borato de sódio a 27° C	Valores de P
armazenados por 0 dia vs. armazenados por 30 dias	P>0.05
armazenados por 0 dia vs. armazenados por 60 dias	P<0.001
armazenados por 0 dia vs. armazenados por 90 dias	P<0.001
armazenados por 30 dias vs. armazenados por 60 dias	P<0.05
armazenados por 30 dias vs. armazenados por 90 dias	P<0.01
armazenados por 60 dias vs. armazenados por 90 dias	P>0.05

Gráfico 3 - Média das contagens de U.F.C. de *M. bovis* isoladas de baços de hamsters armazenados em borato de sódio à 27°C, do grupo controle (0), e dos grupos armazenados por 30, 60, 90 e 120 dias após a eutanásia. Leituras realizadas aos 30, 60 e 90 dias de incubação

Gráfico 4 - Média das contagens de U.F.C. de *M. bovis* isoladas de baços de hamsters armazenados em borato de sódio à 37°C, do grupo controle (0) e dos grupos armazenados por 30, 60, 90 e 120 dias após a eutanásia. Leituras realizadas aos 30, 60 e 90 dias de incubação

3.2 AMOSTRAS PROVENIENTES DE ABATEDOURO BOVINO

No momento de entrada no laboratório, as lesões encontravam-se imersas em solução de borato de sódio por um período máximo de 5 dias (Figura 5). Os diferentes órgãos colhidos apresentavam-se quase sempre aumentados, com lesões de formato arredondado e de cor amarelada distribuídas pelos tecidos, compatíveis com lesões suspeitas de infecção tuberculosa (Figuras 6, 8 e 9). Foram observadas também exuberantes lesões caseosas substituindo quase a totalidade dos tecidos do órgão (Figura 7).

As contagens das U.F.C. de micobactérias das lesões de órgãos bovinos estão descritas no apêndice E. A partir das contagens apresentadas no apêndice E, foram calculadas as médias das U.F.C. isoladas das 69 amostras, obtendo-se um único valor médio de leitura nos diferentes períodos de armazenamento em borato de sódio, essas médias estão relacionadas na tabela 9. Além disso, as proporções de isolados nas garrafas de cultivo estão descritas na tabela 7.

3.2.1 Comparações entre os períodos de armazenamento

Em relação aos períodos de armazenamento das lesões de órgãos bovinos em borato de sódio foram consideradas duas variáveis, a proporção de isolados de micobactérias a partir das lesões e o número de U.F.C. de micobactérias dessas mesmas amostras.

3.2.1.1 Comparação entre as proporções de isolados de micobactérias de lesões em órgãos de bovinos (Teste de comparação de proporções)

Os valores das proporções de isolados são apresentados na tabela 7 e no gráfico 5. As comparações dessas proporções foram feitas considerando-se sempre a leitura aos 90 dias de incubação e a temperatura de armazenamento de 27° C. Os resultados das comparações constam na tabela 8.

Tabela 7 – Proporção de isolados de micobactérias de lesões em órgãos de bovinos do grupo controle e dos grupos armazenados por 30, 60 e 90 dias em borato de sódio. Amostras mantidas a 27°C, com leitura aos 90 dias de incubação - São Paulo – 2011

Período de incubação	Dia de entrada no laboratório	Armazenamento por 30 dias	Armazenamento por 60 dias	Armazenamento por 90 dias
90 dias	100	82,60	26,08	2,98

Tabela 8 – Comparação da proporção de isolados de lesões em órgãos bovinos do grupo controle e armazenados por 30, 60 e 90 dias em borato de sódio. Amostras mantidas a 27°C, com 90 dias de incubação - São Paulo – 2011

Períodos de armazenamento em borato de sódio a 27°C	Valores de P
armazenados por 0 dia vs. armazenados por 30 dias	0,0009
armazenados por 0 dia vs. armazenados por 60 dias	P<0.001
armazenados por 0 dia vs. armazenados por 90 dias	P<0.001
armazenados por 30 dia vs. armazenados por 60 dias	P<0.001
armazenados por 30 dia vs. armazenados por 90 dias	P<0.001
armazenados por 60 dia vs. armazenados por 90 dias	0,0003

Gráfico 5 - Proporção de isolados de lesões em órgãos de bovinos, do grupo controle, e dos grupos armazenados por 30, 60 e 90 dias em borato de sódio, na temperatura de 27°C, com leitura aos 90 dias de incubação

3.2.1.2 Comparação entre o número de U.F.C. de micobactérias isoladas de lesões em órgãos de bovinos

As médias das contagens de U.F.C. de micobactérias, de lesões em órgãos de bovinos, nos diferentes períodos de armazenamento em borato de sódio, a temperatura de 27°C, e com 90 dias de incubação, estão relacionadas na tabela 9 e no gráfico 6. As comparações dos números de U.F.C. de micobactérias nos mesmos órgãos estão relacionadas na tabela 10.

O grupo controle (0 dia) apresentou mediana de 115 U.F.C. de micobactérias, seguido do grupo armazenado por 30 dias em borato de sódio, a temperatura de 27°C, com mediana de 8 U.F.C. de micobactérias (Apêndice F) (Gráfico 6).

Tabela 9 - Médias das contagens das U.F.C. de micobactérias isoladas de lesões em órgãos de bovinos do grupo controle e dos grupos armazenados por 30, 60 e 90 dias em solução de borato de sódio. Amostras mantidas a 27°C, com leitura aos 90 dias de incubação - São Paulo – 2011

Período de incubação	Dia de entrada no laboratório	Armazenamento por 30 dias	Armazenamento por 60 dias	Armazenamento por 90 dias
90 dias	136,94	44,91	1,56	0,09

Tabela 10 - Comparação de U.F.C. de micobactérias isoladas de lesões em órgãos de bovinos entre o grupo controle e os armazenados por 30, 60 e 90 dias em solução de borato de sódio. Amostras mantidas a 27°C, com leitura aos 90 dias de incubação - São Paulo – 2011

Períodos de armazenamento em borato de sódio a 27° C	Valores de P
armazenados por 0 dia vs. armazenados por 30 dias	P<0.001
armazenados por 0 dia vs. armazenados por 60 dias	P<0.001
armazenados por 0 dia vs. armazenados por 90 dias	P<0.001
armazenados por 30 dia vs. armazenados por 60 dias	P<0.001
armazenados por 30 dia vs. armazenados por 90 dias	P<0.001
armazenados por 60 dia vs. armazenados por 90 dias	P>0.05

Gráfico 6- Média das contagens de U.F.C. de micobactérias isoladas de lesões em órgãos de bovinos do grupo controle, e dos grupos armazenados por 30, 60 e 90 dias em borato de sódio, na temperatura de 27°C, com leitura aos 90 dias de incubação

3.2.2 Identificação do gênero dos isolados das lesões em órgãos de bovinos

As colônias isoladas das lesões em órgãos de bovinos foram submetidas a um protocolo de extração de DNA genômico (Anexo C) e a uma técnica de PCR (Anexo D) para identificação do gênero dos agentes. Todas as bactérias foram caracterizadas como pertencentes ao Gênero *Mycobacterium*. Com base neste método de identificação de micobactérias descrito por Telenti et al. (1993), os produtos adquiridos da PCR foram de 439 bp (Figura 4), caracterizando como pertencentes ao gênero *Mycobacterium*.

Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação realizada com os *primers* Tb11 e Tb12, caracterizando as amostras como pertencentes ao gênero *Mycobacterium* – São Paulo – 2011

Figura 5 - Frascos plásticos contendo amostras de tecidos bovinos com lesões suspeitas de tuberculose, imersos em solução saturada de borato de sódio – São Paulo – 2011

Figura 6 - Linfonodo bovino com diversas lesões de formato arredondado e coloração amarelada – São Paulo – 2011

Figura 7 - Linfonodo bovino com lesão caseosa – São Paulo – 2011

Figura 8 - Pulmão bovino com diversas lesões de formato arredondado e coloração amarelada – São Paulo – 2011

Figura 9 - Fígado bovino com diversas lesões de formato arredondado e coloração amarelada – São Paulo – 2011

4 DISCUSSÃO

A utilização de modelos biológicos possibilitou a produção de lesões padronizadas, com quantidades de bacilos, tamanho e aspecto uniformes (Figuras 1 e 2).

Em relação ao tempo de incubação, as maiores quantidades de U.F.C. de *M. bovis* e a maior proporção de isolados dos baços foram verificadas na leitura feita aos 90 dias de incubação (Tabela 2, 3 e 5) (Gráficos 1 a 4). A World Organisation for Animal Health (2009), recomenda incubação das culturas de micobactérias por no mínimo 8 semanas, preferencialmente, por até 12 semanas, a temperatura de 37°C. Portanto, as análises subsequentes tiveram como base as leituras feitas aos 90 dias.

Em relação ao período de armazenamento dos baços em borato de sódio, existem duas variáveis a serem consideradas: a proporção de isolados de *M. bovis* a partir de baços e o número de U.F.C de *M. bovis* desses mesmos órgãos.

Em relação à proporção de isolados, verifica-se que não existiu diferença entre o controle e o armazenamento por 30 dias em borato de sódio e que essa proporção diminuiu progressivamente quando o tempo de armazenamento dilatou-se para 60, 90 e 120 dias (Tabelas 3 e 4) (Gráficos 1 e 2). Assim, pode-se concluir que a diminuição significativa da proporção de isolados ocorreu em algum momento entre 30 e 60 dias de armazenamento em borato de sódio. Richards e Wright (1983) obtiveram 100% de isolamento de *M. bovis* de lesões tuberculosas armazenadas em solução de borato de sódio, à temperatura ambiente, por até 60 dias. Enquanto que Millán et al. (2000), obtiveram diagnóstico positivo de tuberculose em lesões armazenadas por até 150 dias em solução de borato de bódio.

Os resultados observados em relação à proporção de isolados nos baços são corroborados pelas análises das contagens de U.F.C. de *M. bovis* nos mesmos órgãos (Tabelas 5 e 6) (Gráficos 3 e 4). Millán et al. (2000), avaliaram o efeito do borato de sódio na sobrevivência do *M. bovis* em amostras teciduais à temperatura ambiente e também constataram diminuição no número de U.F.C. somente a partir de 30 dias de armazenamento. Enquanto que Richards e Wright (1983) ao testarem o efeito do borato de sódio em culturas puras de *M. bovis* verificaram discreta redução no número de U.F.C. da bactéria nos primeiros

sete dias. Futuros estudos, explorando o intervalo entre 30 e 60 dias de armazenamento de lesões tuberculosas em borato de sódio, poderão ser realizados para refinar esses resultados.

Para as duas temperaturas testadas, 27°C e 37°C, com o aumento do tempo de armazenamento em borato de sódio, houve a mesma tendência de queda na proporção de isolados e no número de U.F.C. de *M. bovis* recuperados dos baços (Tabelas 3 e 5) (Gráficos 1 a 4). Todavia, uma queda mais acentuada foi verificada para a temperatura de 37°C, embora não tenha sido constatada diferença estatística entre as proporções de isolados para as duas temperaturas aos 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento (Tabela 4). A influência do aumento da temperatura na diminuição do poder conservante do Borato de sódio também foi observada Corner (1994), que ao transportar lesões em solução de borato de sódio, a temperatura ambiente de 40°C, optou por associar baixas temperaturas ao armazenamento.

Esses dados indicam que o método de armazenamento de lesões tuberculosas em solução saturada de borato de sódio pode ser utilizado em temperaturas ambientes abaixo de 37° C, porém o tempo de armazenamento não deve exceder 30 dias. Importante salientar que existe tendência à diminuição da proporção de isolados de *M. bovis*, conforme a elevação da temperatura de armazenamento, diminuindo, portanto, a sensibilidade do primo isolamento de *M. bovis* quando se projeta essa metodologia como parte de um sistema de vigilância para detecção de focos de tuberculose bovina a partir de lesões colhidas em abatedouro (Tabela 3) (Gráficos 1 e 2).

A partir dos resultados observados no teste de inoculação experimental delimitaram-se as variáveis estudadas no experimento com lesões de abatedouro de bovinos. Nesta etapa foi mantida somente a temperatura de 27°C por até 90 dias de armazenamento em solução de borato de sódio. Além disso, o período de incubação para leitura final das U.F.C de micobactérias foi sempre de 90 dias.

O desempenho do poder conservante do borato de sódio observado no teste com material de abatedouro reproduziu o observado no teste de inoculação experimental. O período máximo de armazenamento das lesões em borato de sódio foi de 30 dias a temperatura de 27°C.

Com base nos resultados observados em ambos os testes concluiu-se que o armazenamento de tecidos com lesões tuberculosas em solução de borato de sódio pode ser feito por até 30 dias em altas temperaturas, 27°C a 37°C.

O borato de sódio já é utilizado no transporte de lesões de abatedouros em estudos epidemiológicos de prevalência de tuberculose em outros países (BROWN; HERNANDEZ DE ANDA, 1998). Uma vez delimitado 30 dias como período máximo de armazenamento de amostras em solução de borato de sódio, em altas temperaturas ambiente (27°C a 37°C), a próxima etapa é elaborar uma metodologia de colheitas nos abatedouros, e transporte para os laboratórios de referência de diagnóstico de tuberculose, que atendam esse limite nas diferentes regiões do território nacional.

5 CONCLUSÕES

1. Os resultados dos dois experimentos foram concordantes, portanto, a utilização de inoculação de animais presta-se para o estudo dessas variáveis.
2. Entre 27°C e 37°C, recomenda-se um tempo máximo de armazenamento em borato de sódio de 30 dias.
3. Conforme a temperatura ambiente aumenta, diminui a sensibilidade do isolamento de *M. bovis* a partir de amostras armazenadas em solução saturada de borato de sódio.

REFERÊNCIAS*

AMBROSIO, S. R.; OLIVEIRA, E. M. D.; ROSALES RODRIGUEZ, C. A.; FERREIRA NETO, J. S.; AMAKU, M. Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 241-244, 2008.

BELCHIOR, A. P. C. **Prevalência, distribuição regional e fatores de risco da tuberculose bovina em Minas Gerais**. 2000. 98 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Animal – LANARA. **Métodos de análise microbiológica para alimentos**. 2. rev., Brasília: LANARA, 1991/1992, 136 p.

BREMER-MELHIOR, P.; DRUGEON, H. B. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* for DNA typing analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2350-2351, 1999.

BROWN, W.; HERNANDEZ DE ANDA, J. Tuberculosis in adult beef cattle of Mexican origin shipped direct-to-slaughter into Texas. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, n. 4, p. 557-559, 1998.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Diagnostico de laboratorio de la tuberculosis animal**. Buenos Aires: CPZ, 1972. 48 p. (Nota Técnica, 6)

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Metodos de laboratorio de micobacteriologia veterinaria para el aislamiento e identificacion de micobacterias**. Buenos Aires: CPZ, 1973. 48 p. (Série de monografias científicas y técnicas, 6).

CORNER, L. A.; MELVILLE, L.; McCUBBIN, K.; SMALL, K. J.; McCORMICKS, B. S.; WOOD, P. R.; ROTH, J. S. Efficiency of inspection procedures for detection of tuberculosis lesions in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 67, n. 11, p. 389-392, 1990.

CORNER, L. A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 53-63, 1994.

* Conforme as diretrizes para a apresentação de dissertações e teses. 4. ed. São Paulo; FMVZ-USP

COSIVI, O.; GRANGE J. M.; DABORN C. J.; RAVIGLIONE M. C.; FUJIKURA T.; COUSINS D.; ROBINSON R. A.; HUCHZERMEYER H. F. A. K.; KANTOR I. DE.; MESLIN F. X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerging infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. 59-69, 1998.

DAVID, H.; BRUM, L.; PRIETO, E. **Manual de micobacteriologia em Saúde Pública. Princípios e Métodos**. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical, 1994.

FERREIRA NETO, J. S.; PINHEIRO, S. R.; MORAIS, Z. M.; SINHORINI, I. L.; ITO, F. H.; VASCONCELLOS, S. A. Avaliação quantitativa da concentração de micobactérias em órgãos e humores de hamsters experimentalmente infectados com *Mycobacterium bovis*, estirpe AN 5. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**. v. 31, n. 2, p. 131-139, 1994.

HERMANS, P. W.; VAN SOOLINGEN, D.; BIK, E. M.; HAAS, P. E. W. de; DALE, J. W.; VAN EMBDEN, J. D. A. The insertion element IS 987 from *M. bovis* BCG is located in a hot spot integration region for insertion elements in *M. tuberculosis* Complex strains. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 2695-705, 1991.

HERNÁNDEZ DE ANDA, J.; EVANGELISTA, T. R.; VALENCIA, G. L.; HODGERS, M. M. An abattoir monitoring system for diagnosis of tuberculosis in cattle in Baja California, Mexico. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 211, n. 6, p. 709-711, 1997.

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

KLEEBOERG, H. H. Tuberculosis humana de origen bovino y salud pública. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**, v. 3, p. 55-76, 1984.

KREBS, J., R. ANDERSON, T.; CLUTTON-BROCK, I.; MORRISON, D.; YOUNG, C. DONNELLY. **Bovine tuberculosis in cattle and badgers**: report to the Rt. Hon. Dr. Jack Cunningham MP. London, UK: MAFF Publications, 1997.

KREMER, K.; VAN SOOLIGEN, D.; FROTHINGHAM, R.; HAAS, W.H.; HERMANS, P. W. M.; MARTIN, 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* strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, 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: (Manual Técnico).** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006, 184p.

MILLÁN, F.; SÁNCHEZ, L. M.; TOLEDO, T.; RAMÍREZ, C.; SANTILLÁN, M. A. Descriptive study of human and bovine tuberculosis in Querétaro, México. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 42, p. 13-19, 2000.

OLIVEIRA, D. M. E.; MORAIS, Z. M.; TABATA, R.; DIAS, R. A.; OLIVEIRA, R. S.; LEÃO, S. C.; MORÉS, N.; GERRA, J. J.; VASCONCELLOS, S. A.; FERREIRA, F.; PINHEIRO, S. R.; BALIAN, S. C.; FERREIRA NETO, J. S. Avaliação da virulência em hamster (*Mesocricetus auratus*) de estirpe de *Mycobacterium avium* presente na população de suínos do sul do Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**. v. 39, n. 4, p. 202-207, 2002.

RICHARDS, W. D.; WRIGHT, H. S. Preservation of tissue specimens during transport to mycobacteriology laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 393-395, 1983.

RODRIGUEZ, C. A. R.; ZUMÁRRAGA, M. J.; OLIVEIRA, E. M. de D.; CATALDI, A. A.; ROMANO, M. I.; OTTO, H. H.; BONAFÉ, V. I.; FERREIRA NETO, J. S. Caracterização molecular de isolados de *Mycobacterium bovis* do Estado de São Paulo Brasil, utilizando a técnica de spoligotyping. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, n. 3, p. 277-282, 2004.

ROSEMBERG, J.; TARANTINO, A. B.; PAULA, A. Tuberculose. In: TARANTINO, A. B. **Doenças pulmonares**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990 p.233- 297.

SUPPLY, P.; MAZARS, E.; LESJEAN, S.; VICENT, V.; GICQUEL, B.; LOCHT, C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 762-771, 2000.

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

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Bovine tuberculosis. **OIE Terrestrial Manual**. NB: Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE: 2009. 16 p.

ANEXO A - Método de preparo do meio de Stonebrink

Base de sais

Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	3,50 g
Fosfato dissódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....	0,00 g
Piruvato de sódio	6,25 g
Água destilada q.s.p. -.....	500,00 mL

OBS: caso se utilize fosfato dissódico com 12 moléculas de H_2O , utilizar 4,0 g. se for o fosfato dissódico anidro, utilizar 1,59 g.

Conteúdo de ≈ 20 ovos (suspensão)	1000,00 mL
Solução aquosa de verde de malaquita a 2%.....	20,00 mL

Dissolver os sais na água destilada e autoclavar a 121°C por 15 minutos. Aguardar esfriar a base e acrescentar os ovos e o verde de malaquita. Homogeneizar em agitador magnético por uma hora. Filtrar em gaze estéril (dobrada em 4) e distribuir nos tubos. Coagular[†] a 80°C por 30 minutos.

[†] Coaguladora vertical ELETROLAB – câmara climática

ANEXO B - Método de preparo do Meio de Middlebrook 7H9 modificado

Middlebrook 7H9 ágar.....	1,00g
Piruvato de sódio.....	0,8g
Água destilada MILIQ.....	200,00 mL
Enriquecimento OADC [‡]	22,00 mL

Misturar no Erlenmeyer o Agar e o piruvato de sódio. Acrescentar a água destilada MILIQ pelas paredes para evitar a formação de espuma. Agitar lentamente. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Aguardar o resfriamento a 56°C e adicionar assepticamente o enriquecimento OADC. O enriquecimento deve ser retirado da geladeira antes, para que esteja na temperatura ambiente na hora de ser adicionado ao meio. Homogeneizar novamente cuidando para evitar a formação de bolhas. Distribuir 10 mL em cada tubo e proceder aos testes de esterilidade por no mínimo 48 horas.

[‡] BBLtn Middlebrook OADC Enrichment - I3ecton Dickson Microbiology, Systems - Sparks, MD 21152

ANEXO C - Extração do DNA genômico

O método CTAB foi utilizado para o isolamento e purificação do DNA das micobactérias, com algumas adaptações (KREMER et al., 1999).

Aproximadamente 50mg de massa bacteriana foram transferidas, com o auxílio de alças descartáveis, para um tubo de microcentrifuga de 1500µL e misturado com 400µL de tampão TE (10mM Tris-HCl + 1mM EDTA pH 8,0). A suspensão foi incubada a 80°C por 30 minutos para a inativação dos bacilos (BREMER-MELHIOR; DRUGEON, 1999). Em seguida, adicionou-se 50µL de lisozima na concentração de 10 mg/mL; a mistura foi agitada e incubada a 37°C por uma hora ou overnight.

Acrescentou-se 75µL de uma solução de proteinase K/SDS [5µL de proteinase K (10mg/mL) e 70µL de SDS (10%)], agitou-se e incubou-se a 65°C por 10 minutos. Foram adicionados 100µL de NaCl a 5M e, em seguida, 100µL de solução CTAB/NaCl (4,1g de NaCl e 10g de CTAB em 100 mL de H₂O), pré-aquecido a 65°C. A mistura foi agitada até o líquido tornar-se branco e incubada novamente por 10 minutos a 65°C.

Acrescentou-se 750µL de clorofórmio: álcool isoamílico (na proporção de 24:1), agitando-se por 10 segundos e, em seguida, centrifugado a 12000G por 7 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrifuga, o DNA foi precipitado com 450µL de isopropanol (2-propanol) e resfriado a -20°C, por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12000G, por 15 minutos e após desprezar a maior parte do sobrenadante os sedimentos foram lavados, centrifugando-os com 1000µL de etanol frio a 70% a 12000G, por 5 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e o sedimento seco foi redissolvido em TE e estocado a -20°C até o uso.

ANEXO D – PCR - (Polymerase Chain Reaction)

Com base no método de identificação de micobactérias descrito por Telenti et. al. (1993), foram feitas reações de 50µL: 50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl (pH 8,3), dNTP's (2,5mM cada), 1,5mM de MgCl₂, 10% de glicerol, 200mM, 20pmol de cada oligonucleotídeo iniciador Tb11 (5' – ACCAACGATGGTGTGTCCAT) e Tb12 (5' – CTTGTCTGAACCGCATACCCT), 1,25 Unidades de TAQ polymerase e 5,0 µL do DNA em estudo e o DNA cromossomal da amostra controle de *M. bovis* AN5.

Utilizou-se o seguinte ciclo de PCR:

- desnaturação inicial: 96°C, por 3 minutos;
- desnaturação do DNA: 94°C por 1 minuto, 45 vezes do ciclo de amplificação;
- anelamento: 60°C por 1 minuto, 45 vezes do ciclo de amplificação;
- extensão: 72°C, por 1 minuto, 45 vezes do ciclo de amplificação;
- extensão final: 72°C, por 10 minutos.

Os produtos adquiridos da PCR foram de 439 bp (Figura 4), caracterizando-os como pertencentes ao gênero *Mycobacterium*.

APÊNDICE A – Médias das contagens de U.F.C. de *M.bovis* isoladas de baços de hamsters dos grupos armazenados por 30, 60, 90 e 120 dias em solução de borato de sódio, a 27°C, em três tempos de leitura após incubação - São Paulo – 2011

Baços	Temperatura de armazenamento	Período de armazenamento	Leitura com 30dias	Leitura com 60dias	Leitura com 90dias
1	27°C	30	85	245	300
2	27°C	30	67,5	120	122,5
3	27°C	30	0	10,5	10,5
4	27°C	30	5,5	22,5	23
5	27°C	30	300	300	300
6	27°C	30	70,5	87,5	87,5
7	27°C	30	36	95	95
8	27°C	30	300	300	300
9	27°C	30	18,5	45,5	45,5
10	27°C	30	46	165	190
1	27°C	60	0	0	0
2	27°C	60	0	0	0
3	27°C	60	0	0	0
4	27°C	60	0	0	0
5	27°C	60	0	0,5	0,5
6	27°C	60	0	100	102,5
7	27°C	60	0	0	0
8	27°C	60	0	5,5	6
9	27°C	60	0	0,5	0,5
10	27°C	60	0	0	0
1	27°C	90	0	0	0
2	27°C	90	0	0	0
3	27°C	90	0	0	0
4	27°C	90	0	0	0
5	27°C	90	5	41,5	50
6	27°C	90	0	0	0
7	27°C	90	0	0	0
8	27°C	90	0	0	0
9	27°C	90	0	0	0
10	27°C	90	0	0	0
1	27°C	120	0	0	0
2	27°C	120	0	0	0
3	27°C	120	127,5	200	200
4	27°C	120	0	0	0
5	27°C	120	0	0	0
6	27°C	120	0	0	0
7	27°C	120	0	0	0
8	27°C	120	0	0	0
9	27°C	120	0	0	0
10	27°C	120	0	0	0

APÊNDICE B – Médias das contagens de U.F.C. de *M. bovis* isoladas de baços de hamsters, dos grupos armazenados por 30, 60, 90 e 120 dias em solução de borato de sódio, a 37°C, em três tempos de leitura após incubação - São Paulo – 2011

Baços	Temperatura de armazenamento	Período de armazenamento	Leitura com 30dias	Leitura com 60dias	Leitura com 90dias
1	37 °C	30	40	165	165
2	37 °C	30	0	1	1
3	37 °C	30	0	0,5	0,5
4	37 °C	30	300	300	300
5	37 °C	30	0	0	0
6	37 °C	30	0	7,5	8
7	37 °C	30	0	0	0
8	37 °C	30	0	2	2,5
9	37 °C	30	0	0,5	0,5
10	37 °C	30	0	0	0
1	37 °C	60	0	0	0
2	37 °C	60	0	0	0
3	37 °C	60	0	0	0
4	37 °C	60	0	0	0
5	37 °C	60	0	0	0
6	37 °C	60	0	0	0
7	37 °C	60	0	0	0
8	37 °C	60	0	0	0
9	37 °C	60	0	0	0
10	37 °C	60	0	0	0
1	37 °C	90	0	0	0
2	37 °C	90	0	0	0
3	37 °C	90	0	0	0
4	37 °C	90	0	0	0
5	37 °C	90	0	0	0
6	37 °C	90	0	0	0
7	37 °C	90	0	0	0
8	37 °C	90	0	0	0
9	37 °C	90	0	0	0
10	37 °C	90	0	0	0
1	37 °C	120	0	0	0
2	37 °C	120	0	0	0
3	37 °C	120	0	0	0
4	37 °C	120	0	0	0
5	37 °C	120	0	0	0
6	37 °C	120	0	0	0
7	37 °C	120	0	0	0
8	37 °C	120	0	0	0
9	37 °C	120	0	0	0
10	37 °C	120	0	0	0

APÊNDICE C – Médias das contagens de U.F.C. de *M.bovis* isoladas de baços de hamsters do grupo controle, em três tempos de leitura após incubação - São Paulo – 2011

Baços	Período de armazenamento em borato de sódio	Leitura 30dias	Leitura 60dias	Leitura 90dias
1	0	300	300	300
2	0	300	300	300
3	0	300	300	300
4	0	300	300	300
5	0	300	300	300
6	0	300	300	300
7	0	300	300	300
8	0	300	300	300
9	0	300	300	300
10	0	300	300	300

APÊNDICE D – Medianas das contagens de U.F.C. de *M.bovis* isoladas de baços de hamsters do grupo controle, e dos grupos armazenados por 30, 60 e 90 dias em solução de borato de bódio, a 27°C - São Paulo – 2011

Período de armazenamento em borato de sódio	Mediana	Valor mínimo	Valor máximo
0 dia	300	300	300
30 dias	108.75	10.5	300
60 dias	0	0	102.5
90 dias	0	0	50

APÊNDICE E – Médias das contagens de U.F.C. de micobactérias isoladas de lesões de órgãos de bovinos, do grupo controle e dos grupos armazenados por 30, 60 e 90 dias em solução de borato de sódio, a 27°C, leitura com 90 dias de incubação - São Paulo – 2011

(continua)

Amostras	Período de armazenamento 0 dia	Período de armazenamento 30 dias	Período de armazenamento 60 dias	Período de armazenamento 90 dias
1	300	300	28	0
2	300	300	0	0
3	300	300	1	0
4	300	300	0	0
5	300	87,5	1	0
6	300	300	31,5	6
7	300	12	0	0
8	140	5,5	0	0
9	14,5	0	0	0
10	2,5	0	0	0
11	15,5	0	0	0
12	137,5	6	0	0
13	117,5	0	0	0
14	75	0,5	0	0
15	87,5	13	0	0
16	95	0,5	0	0
17	56	9	0	0
18	300	6	0	0
19	37,5	3,5	0	0
20	167,5	26,5	0	0
21	57,5	0	0	0
22	300	170	0	0
23	95	4	3	0
24	197,5	28,5	2	0
26	300	8	0	0
27	300	85	0	0
28	51,5	11,5	0,5	0
29	265	110	0	0
30	47	8,5	0	0
31	65	0	0	0
32	235	31	1,5	0
33	36	0	0	0
34	90,5	7	0	0
35	167,5	23	1,5	0
36	115	112,5	10,5	0,5
37	32,5	5	0	0
38	300	20,5	21	0
39	300	177,5	0	0
40	21,5	2	0	0
41	99,5	2	0	0
42	177,5	44	0	0
45	300	192,5	1	0
46	2,5	0	0	0
47	112,5	0	0	0

Amostras	Período de armazenamento 0 dia	Período de armazenamento 30 dias	Período de armazenamento 60 dias	Período de armazenamento 90 dias
48	195	4,5	0	0
49	160	8,5	0	0
50	0,5	0	0	0
51	230	1	0	0
52	135	8	0	0
53	3,5	2,5	0	0
54	180	10,5	0,5	0
55	20,5	10,5	0	0
56	62	22,5	0	0
57	115	0	0	0
59	122,5	21	0	0
60	60	19	1,5	0
61	26,5	11,5	0	0
62	25	0	0	0
63	33	5	0	0
64	187,5	180	1	0
65	58,5	0,5	0	0
66	200	39	0	0
67	120	10,5	1,5	0
68	92,5	14	0	0
69	12,5	1,5	0,5	0
70	62,5	3	0	0
71	105	7,5	0	0
72	117,5	5,5	0	0
73	110	0,5	0,5	0

APÊNDICE F – Medianas das contagens de U.F.C. de micobactérias isoladas de lesões de órgãos de bovinos do grupo controle, e dos grupos armazenados por 30, 60 e 90 dias em solução de borato de sódio, a 27°C - São Paulo – 2011

Período de armazenamento em borato de sódio	Mediana	Valor mínimo	Valor máximo
0 dia	115	0,5	300
30 dias	8	0	300
60 dias	0	0	31,5
90 dias	0	0	6