NICOLÁS CÉSPEDES CÁRDENAS

**Avaliação dos espécimes clínicos preservadas em papel FTA Whatman®,
solução saturada de borato de sódio e refrigerados para o diagnóstico
molecular de *Mycobacterium bovis***

São Paulo

2016

**Evaluación de los especímenes clínicos preservados en FTA elute card
Whatman ®, solución saturada de borato de sodio y refrigeradas para el
diagnostico molecular de *Mycobacterium bovis***

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 Ciência

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área deconcentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto

De acordo: _____
Orientador

São Paulo
2016

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.3396
FMVZ

Céspedes Cárdenas, Nicolás

Evaluación de los especímenes clínicos preservados en FTA elute card Whatman®, solución saturada de borato de sodio y refrigeradas para el diagnóstico molecular de *Mycobacterium bovis*. - 2016.

27 f.

Título traduzido: Avaliação dos espécimes clínicos preservados em papel FTAWhatman®, solução saturada de borato de sódio e refrigerados para o diagnóstico molecular de *Mycobacterium bovis*.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2016.

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

Orientador: Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto.

1. Tuberculose Bovina. 2. Diagnóstico. 3. *Mycobacterium spp.* 4. Extração DNA. 5. PCR. 6. Tuberculosis. 7. Biosegurança. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação das espécimes clínicas preservadas em papel FTA, solução saturada de borato de sódio e refrigeradas para o diagnóstico molecular de *M. bovis*", protocolada sob o CEUA nº 2580031016, sob a responsabilidade de **José Soares Ferreira Neto e equipe; Nicolas Cespedes Cardenas** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 01/11/2016.

We certify that the proposal "Evaluation of clinical specimens preserved in FTA cards, saturated solution of sodium borate and refrigerated for the molecular diagnosis of *M. bovis*", utilizing 150 Bovines (males and females), protocol number CEUA 2580031016, under the responsibility of **José Soares Ferreira Neto and team; Nicolas Cespedes Cardenas** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 11/01/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **04/2016** a **12/2016**

Área: **Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal**

Origem: **Amostras biológicas estocadas**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 10 anos**

N: **150**

Linhagem: **Bos taurus**

Peso: **1 a 1000 kg**

Resumo: A tuberculose Bovina é uma doença causada pelo *Mycobacterium bovis*, uma bactéria que faz parte do Complexo *Mycobacterium Tuberculosis* (MTC), infectando diversos mamíferos, incluído o homem. Aprimorar o diagnóstico desta doença permite a identificar focos e tomar ações de controle. Neste trabalho foram avaliadas a sensibilidade e a especificidade de diferentes protocolos de extração em diferentes meios de transporte, sendo analisadas 4 tipos de amostras a partir da mesma lesão tuberculosa: i. decalque da lesão em papel FTA, ii. Lesão refrigeradas e iii. Lesões armazenadas em solução saturada de borato de sódio durante 30 e iv. 60 dias. Para amostras refrigeradas e preservadas, executaram-se os protocolos de extração de DNA por meio do Kit QIAamp DNA FFPE TISSUE e pelo protocolo descrito por Boom (BOOM et al., 1990). Para os decalques se fez a extração usando o protocolo com CTAB e o protocolo descrito por Boom. Além disso, para cada tipo de espécime clínico fez-se o isolamento em meio de cultura Stonebrink e Löwenstein-Jensen. A partir de cada DNA extraído, fez-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os primers RD4-1: RD4-3, TB11-TB12, INS1-INS2, para identificar o gênero *Mycobacterium*, o complexo *Mycobacterium tuberculosis* e a espécie *M. bovis*. Como resultado obteve-se que a PCR realizada com a amostra refrigerada tem maior sensibilidade e que o melhor método de extração de DNA foi o descrito por Boom. Ainda se obtiveram colônias de *Mycobacterium bovis* a partir do papel FTA. Estas informações contribuem para melhorar o processo de coleta de amostras e o transporte para o sistema de vigilância da tuberculose bovina.

Local do experimento: **LZB-FMVZ-USP**

São Paulo, 02 de novembro de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CÉSPEDES CÁRDENAS, Nicolás

Título: **Avaliação dos espécimes clínicos preservadas em papel FTA Whatman®, solução saturada de borato de sódio e refrigerados para o diagnóstico molecular de *Mycobacterium bovis***

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: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Eu quero agradecer a **Deus** por me permitir chegar até este ponto, agradecimentos profundos para minha mãe **Carmen Teresa** meu maior exemplo de fortaleza e dedicação e quem sempre acreditou em mim.

A meu orientador Jose Soares pela oportunidade, confiança e orientação durante o mestrado. Ao professor Marcos Bryan pela ajuda e orientação no laboratório.

A galera do Laboratório de Zoonoses Bacterianas do VPS (Leia, Cassia, Eleine, Antônio, Juliana, Israel, Oswaldo, Danubia, Alba) pelas dicas, conselhos, ajuda e bons momentos.

Técnicas do LZB e LABMAS (Giselle Oliveira, Sheila, Sueli e Zenaide) pela ajuda e orientação.

Aos Professores, funcionários e Técnicos do VPS que fazem desde lugar ser um dos melhores.

Amigos, professores e colegas do VPS (Jason el solenme, Carlos malagueño, Carito, Alejo, Alex, Raton, Ratona, Claudia, Grisi, Camila, Mariana, Ana, Vanessa, Raul, Renatinho, Ricardo, Thiago, Sebastian, Xico, Gina, Fernanda, Ana Carolina entre outros)

Para toda minha família (Abuelita, Tios, primos) que sempre me mostraram seu apoio e amor.

Para meus amigos que fiz em São Paulo que são minha família aqui (Pablo, Yeison, Andres Ballesteros, Natalia Chamorro, Klass, Luis, Manzananas, Celeste, Cassandra, Larry, Laura Nataly, Rodrigo P, Monise, Andres, Cristofer) amigos intercambistas ou de outras regiões do Brasil que já não estão mais aqui, obrigado pelos momentos companhia e amizade.

Meus Amigos na Colômbia (Dina, Julieth, Mafe, Pablo, Veronica, Hanny, Andres, Juan Manuel, Juliana, Pato, Diego, Stefany, Toka, Indio, Dumar, Jann, Claudia, Sandy, Bohorquez, Peque, Cesar, yesica, Rochi, Mayra)

(Peço desculpas se seu nome não consta aqui, é mais por conta da minha memória ruim, assim que não se sinta excluído)

Agradecimentos à CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMEN

CÉSPEDES CÁRDENAS, N. **Evaluación de los especímenes clínicos preservados en FTA elute card Whatman®, solución saturada de borato de sodio y refrigeradas para el diagnóstico molecular de *Mycobacterium bovis*.** [Evaluation of clinical specimens preserved in FTA elute card Whatman®, saturated solution of sodium borate and refrigerated for molecular diagnosis of *Mycobacterium bovis*]. 2016. 27 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

La tuberculosis bovina es una enfermedad causada por el agente *Mycobacterium bovis*, que es parte del *complejo Mycobacterium tuberculosis* (MTC). Bacterias del MTC infectan una gran variedad de mamíferos, incluyendo al hombre. Mejorar el diagnóstico de esta enfermedad permite identificar brotes y formular acciones de control. El objetivo de este trabajo fue evaluar la sensibilidad y especificidad de dos métodos de extracción en diferentes tipos de preservación, analizando cuatro tipos de muestras de la misma lesión tuberculosa: impresiones de la lesión en FTA elute card Whatman®, ii. Lesiones congeladas y iii. Lesiones almacenadas en borato de sodio durante 30 y 60 días. Para las muestras congeladas, impresiones en tarjetas FTA y preservadas en borato, fue realizada la extracción usando el protocolo descrito por BOOM et al., 1990. Además, para cada tipo de muestra se realizaron aislamientos en los medios de cultivo Stonebrink y Lowenstein-Jensen. Fue realizada la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los primers INS1-INS2 para identificar DNA de bacterias pertenecientes al MTC. Se encontró que las muestras congeladas tienen mejor sensibilidad, Fueron obtenidas colonias de *Mycobacterium bovis* de las tarjetas FTA. Estos resultados ayudan a mejorar el proceso de colecta y transporte de muestras del sistema de vigilancia en tuberculosis bovina.

Palabras-clave: Tuberculosis Bovina. Diagnostico. *Mycobacterium spp.* Extracción DNA. PCR. Tuberculosis. Bioseguridad.

ABSTRACT

CÉSPEDES CÁRDENAS, N. **Evaluation of clinical specimens preserved in FTA elute card Whatman®, saturated solution of sodium borate and refrigerated for molecular diagnosis of *Mycobacterium bovis*.** [Evaluación de los especímenes clínicos preservados en FTA elute card Whatman®, solución saturada de borato de sodio y refrigeradas para el diagnóstico molecular de *Mycobacterium bovis*]. 2016. 27 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Bovine Tuberculosis is a disease Caused by *Mycobacterium bovis*, which is part of the Mycobacterium Tuberculosis Complex (MTC). MTC infects several mammals, including humans. Improving the diagnosis of the disease will permit to identify outbreaks, and formulate control actions. The aim of this work was evaluate the sensitivity and specificity of DNA extraction protocols in diverse methods of preservation, and analyze four types of samples from the same tuberculous lesion: i. impressions of the lesions on FTA elute card Whatman®, ii. Refrigerated lesions and iii. Lesions stored in saturated sodium borate for 30 and iv. 60 days. For samples refrigerated, impressions on FTA cards and preserved in borate, it was executed protocol described by Boom et al., 1990. In addition, for each type of clinical sample, isolation on Stonebrink and Lowenstein-Jensen culture media were made. From each extracted DNA, the polymerase chain reaction (PCR) was performed using the primers INS1-INS2 DNA from bacterias belonging to MTC. As a result, the PCR of refrigerated samples demonstrated a higher sensitivity. *Mycobacterium bovis* colonies were obtained from the FTA cards. These results can help to improve the process of sample collection and transportation to the bovine tuberculosis surveillance system.

Keywords: Bovine tuberculosis. Diagnosis. *Mycobacterium spp.* DNA extraction. PCR. Tuberculosis. Biosecurity.

RESUMO

CÉSPEDES CÁRDENAS, N. **Avaliação dos espécimes clínicos preservadas em papel FTA Whatman®, solução saturada de borato de sódio e refrigerados para o diagnóstico molecular de *Mycobacterium bovis*.** [Evaluation of clinical specimens preserved in FTA elute card Whatman®, saturated solution of sodium borate and refrigerated for molecular diagnosis of *Mycobacterium bovis*]. 2016. 27 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A tuberculose bovina é uma doença causada pelo agente *Mycobacterium bovis*, que é parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC). Bactérias do MTC infectam uma grande variedade de mamíferos, incluindo o homem. Melhorar o diagnóstico desta doença permite identificar surtos e formular ações de controle. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade e especificidade de dois métodos de extração em diferentes tipos de preservação, analisando quatro tipos de amostras da mesma lesão tuberculosa: impressões da lesão em FTA elute card Whatman®, ii. lesões congeladas e iii. lesões armazenadas em borato de sódio durante 30 e 60 dias. Para as amostras congeladas, impressões no papel FTA e preservadas em borato, foi realizada a extração usando o protocolo descrito por BOOM et al., 1990. Além disso, para cada tipo de amostra se realizaram isolamentos nos meios de cultura Stonebrink e Lowenstein-Jensen. Foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os primers INS1-INS2 para identificar DNA de bactérias pertencentes ao MTC. Encontrou-se que as amostras congeladas tem melhor sensibilidade, Foram obtidas colônias de *Mycobacterium bovis* dos papeis FTA. Estes resultados ajudam a melhorar o processo de colheita e transporte de amostras do sistema de vigilância em tuberculosis bovina.

Palabras-chave: Tuberculose Bovina. Diagnostico. *Mycobacterium spp.* Extração DNA. PCR. Tuberculosis. Biossegurança.

SUMÁRIO

1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. MATERIAL Y MÉTODOS	12
2.1. Colección de las muestras	12
2.2. Aislamiento.....	13
2.3. Extracción de DNA de las muestras	13
2.4. Identificación	14
2.4.1. Concentración de los reactivos para la amplificación de DNA por PCR.....	14
2.4.2. Análisis de los productos amplificados	14
2.5. Análisis de datos	15
3. RESULTADOS	16
4. DISCUSIÓN	16
5. CONCLUSIÓN	20
REFERENCIAS	21

1. INTRODUCCIÓN

Mycobacterium bovis es una bacteria gran positiva capaz de causar tuberculosis en una amplia variedad de mamíferos, especialmente en los bovinos. Hace parte del *complejo Mycobacterium tuberculosis* (MTC), que agrupa las mycobacterias de carácter patógeno (ARNOLD, 2007; COLLINS, 2011; YUEN et al., 2013; RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2014).

La importancia de esta enfermedad radica en las pérdidas económicas directas e indirectas que genera, además de ser perjudicial para el bienestar de los animales que la padecen (BERG et al., 2009). Esta enfermedad es considerada una zoonosis importante en salud pública, presente en más de 108 países del mundo (RUGGIERO et al., 2007; PRODINGER et al., 2014). En Brasil en el 2016 se realizó un estudio epidemiológico estimando la prevalencia media nacional de 2.5 % en 13 estados, que corresponde al 75% de la población bovina (NETO et al., 2016), denotando la importancia de desarrollar nuevas estrategias para el control de la tuberculosis bovina.

Por estas razones desde el 2001 fue establecido en Brasil el programa Nacional de Control y Erradicación de la Brucelosis y Tuberculosis (PNCEBT). En el cual se establecen las estrategias para mejorar el diagnóstico de la enfermedad permitiendo tomar acciones de control (LAGE et al., 2006; NETO et al., 2016). En este programa se implementó en la inspección sanitaria de la carne en los sistemas de abate, como parte de la vigilancia epidemiológica en bovinos, detectando animales enfermos a través de la visualización de lesiones sospechosas de tuberculosis (ROSALES RODRIGUEZ, 2005), siendo una parte fundamental para este sistema el transporte y preservación de estas muestras, permitiéndolas mantener en las diferentes condiciones de los estados en Brasil (MORATO, 2011; POISSONNIER; TEISSIER, 2013).

La principal recomendación para un óptimo diagnóstico es realizar un procesamiento rápido, transportando y preservando las muestras bajo 4-5° C con el fin de realizar el diagnóstico por técnicas microbiológicas y moleculares; (ASSEMBLY, 2009; CORNER; GORMLEY; PFEIFFER, 2012) metodología que puede ser difícil para algunos frigoríficos en diversas zonas de Brasil.

Debido a esto, se han implementado diferentes metodologías como sumergir las muestras en una solución saturada de borato de sodio para el diagnóstico mediante el aislamiento

bacteriano, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (MORATO, 2011) y, a través del uso de las tarjetas Whatman FTA ® card (GE Healthcare) que ofrecen una facilidad al poder ser enviadas por el sistema de correos, convirtiéndolas en una herramienta útil para preservar a temperatura ambiente el material de interés para diagnóstico y para la identificación de especies patógenas por PCR (GUIO et al., 2006; RAJENDRAM et al., 2006).

Este estudio fue conducido para evaluar los diferentes métodos de preservación de especímenes clínicos para el transporte y diagnóstico de la tuberculosis bovina en diferentes condiciones, testando la bioseguridad del uso de las tarjetas FTA Whatman ® con material sospechoso de tuberculosis.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Colección de las muestras

Lesiones visibles sugestivas de tuberculosis encontradas durante las rutinas de inspección de carcasas de los frigoríficos provenientes de los estados de Santa Catarina y Mato Grosso, Brasil, fueron colectadas y preservadas de la siguiente forma hasta su procesamiento:

- I. lesiones sumergidas en solución de borato de sodio (134g/L) y almacenadas durante 30 días (n=48).
- II. lesiones sumergidas en solución de borato de sodio (134g/L) y almacenadas durante 60 días (n=48).
- III. lesiones congeladas (n=48).
- IV. Impresiones de las lesiones en su región central con tarjetas FTA elute card Whatman ® (GE Healthcare), (n=48).

Un total de 88 muestras de bovinos positivos al test de tuberculina provenientes del estado de Paraíba, fueron enviadas congeladas como material para diagnóstico. Estas muestras fueron divididas en 3 porciones equivalentes donde la primera de estas porciones fue sumergida en solución saturada de borato de sodio (134g/L) durante 30 días (n=66), la segunda parte fue almacenada en esta misma solución durante 60 días (n= 63), y la última porción de estas muestras se mantuvo congelada hasta su procesamiento, en donde se ejecutaran impresiones sobre las tarjetas FTA elute card Whatman ® (GE Healthcare), (n=88), obteniendo así, los mismos tipos de métodos de preservación de los otros dos estados (Mato Grosso y Santa Catarina).

Los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Zoonosis Bacterianas de Departamento de Medicina Preventiva y Salud Animal (VPS), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de São Paulo (USP).

2.2. Aislamiento

Para las muestras preservadas en solución saturada de borato de sodio (durante 30 y 60 días) junto con las muestras congeladas, fue realizado un proceso de descontaminación homogenizando 1g de la lesión en 5 ml de solución salina (NaCl 0.85%), fue extraído 1 ml de este homogenizado y mezclando con 1 ml de HPC (Cloruro de 1 - hexadecilporidino) al 1.5%. posteriormente las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 20 min y centrifugadas a 2300 RFC durante 20 minutos, el sobrenadante fue descartado y el material restante fue re-suspendido en 1 ml de solución salina (NaCl 0.85%) (CORNER; TRAJSTMAN; LUND, 1995; AMBROSIO et al., 2008).

De las impresiones hechas en las tarjetas FTA fueron retiradas 6mm de papel utilizando un punch para biopsia de piel y re-suspendida en 1 ml de solución salina estéril. A partir productos descontaminados (tanto de las muestras preservadas en borato de sodio como de las congeladas) y de la suspensión con papel del FTA en solución salina, se tomaron 100 μ L y se inocularon en duplicado en los medios de cultivo Stonebrink y Lowenstein-Jensen. Fueron realizados chequeos semanales durante 8 semanas para la detección de colonias en estos medios.

2.3. Extracción de DNA de las muestras

Para las muestras preservadas en borato de sodio y congeladas, la extracción de DNA fue realizada utilizando los siguientes métodos:

- I. Protocolo de extracción descrito por Boom (BOOM et al., 1990), modificado realizando una digestión previa de 30 mg de muestra con 20 μ L de proteinase K y 100 μ L de lisozima, hasta conseguir la lisis total del tejido.
- II. las tarjetas FTA fueron retirados 6mm de papel con ayuda de un punch de biopsia y fue realizado el protocolo de Boom (BOOM et al., 1990), con las modificaciones descritas anteriormente.
- III. las colonias aisladas fueron hervidas a (100°C/5min) y almacenadas a (-20°C/5min) para exponer el DNA.

2.4. Identificación

Para la detección e identificación de micobacterias de las muestras y aislamientos se utilizaron los primers INS1 (5'CGTGAGGGCATCGAGGTGGC3') y INS2 (5'GCGTAGGCGTCGGTGACAAA3') para Identificar el complejo *Mycobacterium Tuberculosis* (MTC), (HERMANS et al., 1990). Para todas las reacciones, se incorporaron controles positivos con *M. bovis* AN5 y negativos con agua ultra pura (CANEVARI CASTELÃO et al., 2014).

2.4.1. Concentración de los reactivos para la amplificación de DNA por PCR

Para implementar la PCR fue utilizada la GoTaq ®Green Master Mix (Promega, USA) usando un volumen de 12.5 µL, mas 9.5 µL de agua ultra pura, 10pmol de cada primer y 2.5 µL de DNA extraído. Los ciclos y condiciones de la PCR son descritos en la tabla 1.

Tabla 1. Primers, ciclos y condiciones de la PCR para la identificación de mycobacterias

cycle PCR								
primer	Pb	Incubation	Denaturation	Alignment	Extension	number cycles	final extension	Reference
INS1 /								
INS2	245	94 ° C / 5min	94 ° C	68 ° C	72 ° C	30 / 1min	72 ° C / 7min	(Hermans et al., 1990).

2.4.2. Análisis de los productos amplificados

Fueron transferidos cinco micro litros del producto amplificado para un gel de agarosa al 1.5% (peso/volumen) adicionando SYBR ® Safe DNA GelStain 1µL / 10ml gel y colocados en una cuba con tampón de corrida TBE 0.5X buffer (0,045M Tris-borato y 1 mM EDTA, pH 8.0) usando un voltaje de 6-7 V/ cm. Las bandas generadas por los diferentes primers fueron visualizadas en un transluminador ultravioleta. Fue utilizado un indicador de peso molecular estándar de 100 pb.

2.5. Análisis de datos

Sensibilidad y especificidad de cada método de preservación con sus intervalos de confianza 95% (IC95%) fueron calculados utilizando como prueba de oro la interpretación de los resultados positivos en paralelo de la identificación molecular de MTC para los aislamientos obtenidos y el DNA extraído a partir de las muestras congeladas.

Fue realizado test de chi cuadrado para muestras para comparar asociaciones entre protocolos de PCR y la prueba de oro. Para analizar la concordancia entre los diferentes métodos se utilizó el índice Kappa de Cohen (LANDIS; KOCH, 1977). Todos los análisis fueron realizados con auxilio del programa R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/> utilizando los paquetes epiR y fmsb.

3. RESULTADOS

En la tabla 2. Se presenta el número total de muestras para cada método de preservación con el número de identificados para MTC en los aislamientos, la PCR y de la prueba de oro, los datos por muestra son presentados en el material anexo.

Tabla 2. Número de muestras y su identificación como MTC.

Método de preservación	Número de muestras	Numero de aislamientos identificados como MTC	Numero de MTC detectados pela PCR	Resultados MTC del aislamiento y PCR en paralelo
Congelado¹	134	50	25	55
B30²	114	16	23	29
B60³	111	1	28	29
FTA⁴	134	1	18	19

Congelado¹: muestras congeladas, B30²: Muestras preservadas en borato de sodio durante 30 días, B60³: Muestras preservadas en borato de sodio durante 60 días, FTA⁴: impresiones en tarjetas FTA elute card Whatman.

Los resultados de la sensibilidad y de la especificidad con sus intervalos de confianza de los diferentes métodos de preservación son presentados en la tabla 3.

Tabla 3. Sensibilidad y especificidad para los diferentes métodos de preservación con IC95%.

método de preservación	Sensibilidad con intervalo de confianza 95%	especificad con intervalo de confianza 95%
FTA ¹	0.29 (0.18, 0.43)	0.97 (0.91, 1.00)
B30 ²	0.45 (0.30, 0.60)	0.97 (0.90, 1.00)
B60 ³	0.49 (0.34, 0.64)	0.92 (0.83, 0.97)

FTA¹: impresiones en tarjetas FTA elute card Whatman, B30²: Muestras preservadas en borato de sodio durante 30 días, B60³: Muestras preservadas en borato de sodio durante 60 días.

Las siguientes tablas de contingencia (tablas 4, 5 y 6) representan resultados positivos (+) y negativos (-) entre los diferentes métodos de preservación y el Prueba de oro (resultados MTC del aislamiento y PCR en paralelo de las muestras congeladas).

Tabla 4. Tabla de contingencia para las muestras preservadas en borato de sodio durante 30 días (B30) y la prueba de oro.

	Prueba de oro +	Prueba de oro -	Total
B30+	21	2	23
B30-	26	65	91
Total	47	67	114

Tabla 5. Tabla de contingencia para las muestras preservadas en borato de sodio durante 60 días (B60) y la prueba de oro.

	Prueba de oro +	Prueba de oro -	Total
B60+	23	5	28
B60-	24	59	83
Total	47	64	111

Tabla 6. Tabla de contingencia para las impresiones en papel FTA (FTA) y la prueba de oro.

	Prueba de oro +	Prueba de oro -	Total
FTA+	16	2	18
FTA-	39	77	116
Total	55	79	134

Las subsiguientes tablas de contingencia (tablas 7, 8 y 9) presentan los resultados entre los diferentes métodos de preservación (impresiones en papel FTA (FTA), muestras preservadas en borato de sodio durante 30 días (B30) y durante 60 días (B60)).

Tabla 7. Tabla de contingencia para las muestras preservadas en borato de sodio durante 30 días (B30) y muestras preservadas en borato de sodio durante 60 días (B60).

	B60+	B60-	Total
B30+	12	16	28
B30-	11	72	83
Total	23	88	111

Tabla 8. Tabla de contingencia para las impresiones en papel FTA (FTA) y muestras preservadas en borato de sodio durante 30 días (B30).

	B30+	B30-	Total
FTA +	5	10	15
FTA -	18	81	99
Total	23	91	114

Tabla 9. Tabla de contingencia para las impresiones en papel FTA (FTA) y muestras preservadas en borato de sodio durante 60 días (B60).

	B60+	B60-	Total
FTA +	7	8	15
FTA -	21	75	96
Total	28	83	111

Fue realizado test de chi cuadrado para los diferentes métodos de preservación y de la prueba de oro, los p-valor son exhibidos en la tabla 10.

Tabla 10. Resultados de P- valor para los diferentes métodos comparados.

Métodos comparados	P – valor
B30 – Prueba de oro	0,00000004743318
B60 – Prueba de oro	0,0000008257771
FTA –Prueba de oro	0,000009205289
B30 – B60	0,000831306
FTA – B60	0,0550238*
FTA – B30	0,1802217*

* utilizando el valor exacto de Fisher

Los índices de concordancia obtenidos entre los diferentes métodos de preservación se muestran en la tabla 11, para todos las concordancias se encontró P-valor<0.5.

Tabla 11. Índice kappa para los diferentes métodos comparados.

Test kappa de concordancia			
Prueba de oro	Método de preservación	índice kappa	Fuerza de la concordancia
Prueba de oro	B30	0.4513579	"Moderada"
Prueba de oro	B60	0.4345688	"Moderada"
Prueba de oro	FTA	0.2958216	"débil"
B30	B60	0.3146581	"débil"

DISCUSIÓN

Con el propósito de evaluar la eficiencia de los sistemas de transporte de muestras sospechosas de tuberculosis bovina para el diagnóstico molecular, se utilizó la sensibilidad y especificidad como métrica. La mejor sensibilidad y concordancia fue encontrada para el material que fue preservado de forma congelada, denotando la importancia de establecer estas condiciones para el almacenamiento y transporte de especímenes sospechosos de tuberculosis para su diagnóstico.

En general las sensibilidades encontradas fueron malas para los otros diferentes métodos de preservación y transporte, por lo cual concluimos que ningún test empleado en este trabajo puede ser un sustituto para el aislamiento a partir de lesiones congeladas.

Durante el proceso de preservación y almacenamiento de los especímenes clínicos por varios días en la solución de borato de sodio, se presenta un mayor grado de lisis del tejido y muerte de bacterias (CORNER et al., 2012), limitando la recuperación de mycobacterias en los medios de cultivo, siendo mucho más notorio en las muestras preservadas durante 60 días, concordando con lo descrito por Morato et al., 2011 (MORATO, 2011).

La sensibilidad y concordancia de las muestras preservadas en Borato durante 30 y 60 días fueron similares y menores respecto al material congelado, sin embargo para lugares donde no se provee una adecuada cadena de frío para preservar muestras, la recomendación es procesar las muestras antes de los 30 días, ya que ofrecería un mayor chance de obtener más aislamientos que en las muestras preservadas durante 60 días.

Las tarjetas FTA son utilizadas en los sistemas de vigilancia de tuberculosis en Brasil enviándolas con impresiones de material sospechoso, a través de los sistemas de correo, hecho que motivo analizar el nivel de bioseguridad y la sensibilidad para el diagnóstico. Estas tarjetas ya habían sido testadas como un protocolo de extracción, mas no como una herramienta útil para el diagnóstico y preservación de material colectado en frigoríficos. Se utilizaran estas tarjetas

debido a sus propiedades que permiten almacenar material genético durante largos periodos de tiempo (RAJENDRAM et al., 2006; MOURA et al., 2016).

Basándose en los resultados obtenidos en este trabajo las tarjetas FTA no son una herramienta recomendada debido a su baja sensibilidad además, se aisló mycobacterias a partir de estas por lo cual, no deben ser consideradas como bioseguras para el transporte a través de sistemas de correo.

4. CONCLUSIÓN

No fue encontrado ningún protocolo de PCR que permita substituir el tradicional aislamiento en medio de cultura para el diagnostico de mycobacterias patógenas.

Las tarjetas FTA, no son recomendables para su uso en condiciones de campo, ya que ofrecen una sensibilidad muy baja y no son bioseguras.

Congelar o refrigerar las muestras es la mejor opción para almacenar espécimenmeles clínicos. El aislamiento y consecuente identificación por técnicas moleculares es la mejor opción para los sistemas vigilancia y control de la tuberculosis.

REFERENCIAS

AMBROSIO, S. R.; OLIVEIRA, E. M. DE D.; RODRIGUEZ, C. A. R.; FERREIRA NETO, J. S.; AMAKU, M. Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation . **Brazilian Journal of Microbiology** , 2008. scielo .

ARNOLD, C. Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 120–128, 2007.

ASSEMBLY, W. Bovine Tuberculosis. **OIE Terrestrial Manual 2009**, n. May, p. 1–16, 2009.

BERG, S.; FIRDESSA, R.; HABTAMU, M.; GADISA, E.; MENGISTU, A.; YAMUAH, L.; AMENI, G.; VORDERMEIER, M.; ROBERTSON, B. D.; SMITH, N. H.; ENGERS, H.; YOUNG, D.; HEWINSON, R. G.; ASEFFA, A.; GORDON, S. V. The burden of mycobacterial disease in Ethiopian cattle: implications for public health. **PLoS One**, v. 4, n. 4, p. e5068, 2009.

BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; NOORDAA, J. VAN DER. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495–503, Mar. 1990.

CANEVARI CASTELÃO, A. B.; NISHIBE, C.; MOURA, A.; ALENCAR, A. P. DE; AZEVEDO ISSA, M. DE; HODON, M. A.; MOTA, P. M. P. C.; SALES, É. B.; FONSECA JÚNIOR, A. A.; ALMEIDA, N. F.; ARAÚJO, F. R. Draft Genome Sequence of *Mycobacterium bovis* Strain AN5, Used for Production of Purified Protein Derivative. **Genome Announcements**, 1752 N St., N.W., Washington, DC, v. 2, n. 2, p. e00277-14, Apr. 2014.

COLLINS, D. M. Advances in molecular diagnostics for *Mycobacterium bovis*. **Veterinary microbiology**, v. 151, n. 1–2, p. 2–7, Jul. 2011.

CORNER, L. A. L.; GORMLEY, E.; PFEIFFER, D. U. Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: Conditions for maximising the number of positive cultures. **Veterinary Microbiology**, v. 156, n. 1–2, p. 162–171, Apr. 2012.

CORNER, L. A.; TRAJSTMAN, A. C.; LUND, K. Determination of the optimum concentration of decontaminants for the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 43, n. 4, p. 129–133, Jan. 1995.

GUIO, H.; OKAYAMA, H.; ASHINO, Y.; SAITOH, H.; XIAO, P.; MIKI, M.; YOSHIHARA, N.; NAKANOWATARI, S.; HATTORI, T. Method for efficient storage and transportation of sputum specimens for molecular testing of tuberculosis. **The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 10, n. 8, p. 906–10, Aug. 2006.

HERMANS, P. W. M.; SOOLINGEN, D. VAN; DALE, J. W.; SCHUITEMA, A. R. J.;

MCADAM, R. A.; CATTY, D.; EMBDEN, J. D. A. VAN; DALE, D. V. S. J. W.; SCHUITEMA, A. R. J.; MCADAM, R. A.; CATTY, D.; EMBDEN, J. D. A. VAN. Insertion Element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a Useful Tool for Diagnosis and Epidemiology of Tuberculosis. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 28, n. 9, p. 2051–2058, 1990.

LAGE, A. P.; ROXO, E.; MULLER, E. E.; POESTER, F. P.; 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 (PNCEBT). , 2006. Brasília, MAPA/SDA/DSA: Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Animal.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159–174, 1977.

MORATO, F. **Avaliação do Borato de Sódio como conservante de amostra de tecido com lesão tuberculosa**. 2011. University of São Paul, 2011.

MOURA, A.; HODON, M. A.; SOARES FILHO, P. M.; ISSA, M. DE A.; OLIVEIRA, A. P. F. DE; FONSECA JÚNIOR, A. A. Comparison of nine DNA extraction methods for the diagnosis of bovine tuberculosis by real time PCR . **Ciência Rural** , 2016. scielo .

NETO, J. S. F.; SILVEIRA, G. B. DA; ROSA, B. M.; GONÇALVES, V. S. P.; GRISI-FILHO, J. H. H.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; HEINEMANN, M. B.; TELLES, E. O.; LAGE, A. P. Analysis of 15 years of the National Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis, Brazil. **sêmima: ciêmcias Agrarias**, v. 33, n. 2, p. 3385–3402, 2016.

POISSONNIER, C.; TEISSIER, M. The role of the OIE in information exchange and the control of animal diseases , including zoonoses The Uruguay Round and an international reference. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 32, n. May 2011, p. 447–457, 2013.

PRODINGER, W. M.; INDRA, A.; KOKSALAN, O. K.; KILICASLAN, Z.; RICHTER, E. *Mycobacterium caprae* infection in humans. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 12, n. 12, p. 1501–1513, 2014.

RAJENDRAM, D.; AYENZA, R.; HOLDER, F. M.; MORAN, B.; LONG, T.; SHAH, H. N. Long-term storage and safe retrieval of DNA from microorganisms for molecular analysis using FTA matrix cards. **Journal of microbiological methods**, v. 67, n. 3, p. 582–92, Dec. 2006.

RODRIGUEZ-CAMPOS, S.; SMITH, N. H.; BONIOTTI, M. B.; ARANAZ, A. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. **Research in Veterinary Science**, v. 97, Supple, n. 0, p. S5–S19, Oct. 2014.

ROSALES RODRIGUEZ, C. A. **Sistema de detecção de focos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo utilizando métodos moleculares e epidemiológicos**. 2005. Universidade de São Paulo, 2005.

RUGGIERO, A. P.; IKUNO, A. A.; FERREIRA, V. C. A.; ROXO, E. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. **Arq. Inst. Biol**, v. 74, p. 55–65, 2007.

YUEN, C. M.; KURBATOVA, E. V; CLICK, E. S.; CAVANAUGH, J. S.; CEGIELSKI, J. P. Association between Mycobacterium tuberculosis complex phylogenetic lineage and acquired drug resistance. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e83006, Jan. 2013.

MATERIAL ANEXO

Tabla con registros de datos por muestra

SAMPLE_ID	Procedencia	Proceso	MTC FTA	MTC PCR	MTC aislamiento	Prueba de oro
17PB	Paraíba	Congelada	1	1	1	1
18PB	Paraíba	Congelada	0	1	1	1
19PB	Paraíba	Congelada	1	1	1	1
20PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
21PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
22PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
23PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
24PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
25PB	Paraíba	Congelada	0	1	1	1
26PB	Paraíba	Congelada	1	1	1	1
27PB	Paraíba	Congelada	0	1	1	1
28PB	Paraíba	Congelada	1	1	1	1
29PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
30PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
31PB	Paraíba	Congelada	0	1	1	1
32PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
33PB	Paraíba	Congelada	0	1	1	1
34PB	Paraíba	Congelada	0	0	1	1
35PB	Paraíba	Congelada	1	0	1	1
36PB	Paraíba	Congelada	0	0	1	1
37PB	Paraíba	Congelada	0	0	1	1
38PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
39PB	Paraíba	Congelada	0	0	1	1
40PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
41PB	Paraíba	Congelada	1	1	1	1
42PB	Paraíba	Congelada	1	1	1	1
43PB	Paraíba	Congelada	0	1	1	1
44PB	Paraíba	Congelada	1	1	1	1
45PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
46PB	Paraíba	Congelada	0	0	1	1
47PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
48PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
49PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
50PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
51PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
52PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
53PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
54PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
55PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
56PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
57PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
58PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
59PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
60PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
61PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
62PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
63PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
64PB	Paraíba	Congelada	0	0	1	1
65PB	Paraíba	Congelada	0	1	1	1
66PB	Paraíba	Congelada	0	1	1	1
67PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
68PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
69PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
70PB	Paraíba	Congelada	0	0	1	1
71PB	Paraíba	Congelada	0	1	0	1
72PB	Paraíba	Congelada	1	0	1	1
73PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
74PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
75PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
76PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
77PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0

78PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
79PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
80PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
81PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
82PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
83PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
84PB	Paraíba	Congelada	0	0	1	1
85PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
86PB	Paraíba	Congelada	1	0	1	1
87PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
88PB	Paraíba	Congelada	0	1	1	1
89PB	Paraíba	Congelada	0	1	1	1
90PB	Paraíba	Congelada	0	0	1	1
91PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
92PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
93PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
94PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
95PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
96PB	Paraíba	Congelada	1	1	1	1
97PB	Paraíba	Congelada	1	0	1	1
98PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
99PB	Paraíba	Congelada	0	0	1	1
100PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
101PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
102PB	Paraíba	Congelada	0	0	0	0
17PB	Paraíba	B30	NA	0	1	1
19PB	Paraíba	B30	NA	1	1	1
22PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
25PB	Paraíba	B30	NA	0	0	1
26PB	Paraíba	B30	NA	1	0	1
27PB	Paraíba	B30	NA	1	1	1
29PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
30PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
31PB	Paraíba	B30	NA	1	1	1
32PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
33PB	Paraíba	B30	NA	0	1	1
34PB	Paraíba	B30	NA	0	0	1
35PB	Paraíba	B30	NA	0	0	1
36PB	Paraíba	B30	NA	1	1	1
37PB	Paraíba	B30	NA	0	0	1
41PB	Paraíba	B30	NA	0	0	1
43PB	Paraíba	B30	NA	0	0	1
48PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
49PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
50PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
51PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
52PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
53PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
54PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
55PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
56PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
57PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
59PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
60PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
61PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
62PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
63PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
64PB	Paraíba	B30	NA	0	0	1
65PB	Paraíba	B30	NA	0	0	1
66PB	Paraíba	B30	NA	0	0	1
72PB	Paraíba	B30	NA	0	1	1
73PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
74PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
75PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
76PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
77PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
78PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
79PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
80PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
81PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
82PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
83PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
84PB	Paraíba	B30	NA	0	0	1
85PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
86PB	Paraíba	B30	NA	0	0	1
87PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
88PB	Paraíba	B30	NA	0	0	1
89PB	Paraíba	B30	NA	0	0	1
90PB	Paraíba	B30	NA	0	0	1
91PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
92PB	Paraíba	B30	NA	1	0	0
93PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
94PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
95PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
96PB	Paraíba	B30	NA	0	0	1
97PB	Paraíba	B30	NA	0	0	1
98PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
99PB	Paraíba	B30	NA	0	0	1

100PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
101PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
102PB	Paraíba	B30	NA	0	0	0
17PB	Paraíba	B60	NA	1	0	1
19PB	Paraíba	B60	NA	1	0	1
22PB	Paraíba	B60	NA	1	0	0
25PB	Paraíba	B60	NA	1	0	1
26PB	Paraíba	B60	NA	0	0	1
27PB	Paraíba	B60	NA	1	0	1
29PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
30PB	Paraíba	B60	NA	1	0	0
31PB	Paraíba	B60	NA	0	0	1
32PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
33PB	Paraíba	B60	NA	0	0	1
34PB	Paraíba	B60	NA	1	0	1
35PB	Paraíba	B60	NA	1	0	1
36PB	Paraíba	B60	NA	1	0	1
37PB	Paraíba	B60	NA	0	0	1
41PB	Paraíba	B60	NA	0	0	1
43PB	Paraíba	B60	NA	0	0	1
48PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
49PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
50PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
51PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
52PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
53PB	Paraíba	B60	NA	1	0	0
54PB	Paraíba	B60	NA	1	0	0
57PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
59PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
60PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
61PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
62PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
63PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
64PB	Paraíba	B60	NA	1	0	1
65PB	Paraíba	B60	NA	1	0	1
66PB	Paraíba	B60	NA	1	0	1
72PB	Paraíba	B60	NA	1	0	1
73PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
74PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
75PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
76PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
77PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
78PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
79PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
80PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
81PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
82PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
83PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
84PB	Paraíba	B60	NA	0	0	1
85PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
86PB	Paraíba	B60	NA	0	0	1
87PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
88PB	Paraíba	B60	NA	0	0	1
89PB	Paraíba	B60	NA	0	0	1
90PB	Paraíba	B60	NA	0	0	1
91PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
92PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
94PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
95PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
96PB	Paraíba	B60	NA	0	0	1
97PB	Paraíba	B60	NA	0	0	1
98PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
99PB	Paraíba	B60	NA	0	0	1
100PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
101PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
102PB	Paraíba	B60	NA	0	0	0
1MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	0	0
2MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	0	0
3MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	1	1
4MT	Mato Grosso	Congelada	0	1	1	1
5MT	Mato Grosso	Congelada	0	1	1	1
6MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	0	0
7MT	Mato Grosso	Congelada	1	1	1	1
8MT	Mato Grosso	Congelada	0	1	0	1
9MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	0	0
10MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	0	0
11MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	0	0
12MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	0	0
13MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	0	0
14MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	0	0
15MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	0	0
16MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	0	0
17MT	Mato Grosso	Congelada	0	1	0	1
18MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	1	1
19MT	Mato Grosso	Congelada	0	1	1	1
20MT	Mato Grosso	Congelada	0	1	1	1
21MT	Mato Grosso	Congelada	0	1	0	1
22MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	0	0

23MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	0	0
24MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	1	1
25MT	Mato Grosso	Congelada	0	1	1	1
26MT	Mato Grosso	Congelada*	0	0	1	1
27MT	Mato Grosso	Congelada	1	1	1	1
28MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	0	0
29MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	0	0
30MT	Mato Grosso	Congelada	1	0	0	0
31MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	0	0
32MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	0	0
33MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	0	0
34MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	0	0
35MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	0	0
36MT	Mato Grosso	Congelada	0	1	1	1
37MT	Mato Grosso	Congelada	1	1	1	1
38MT	Mato Grosso	Congelada	1	1	1	1
39MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	0	0
40MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	0	0
41MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	0	0
42MT	Mato Grosso	Congelada	1	0	0	0
43MT	Mato Grosso	Congelada	0	0	1	1
1SC	Santa Catarina	Congelada	0	0	0	0
2SC	Santa Catarina	Congelada	0	1	1	1
3SC	Santa Catarina	Congelada	0	1	1	1
4SC	Santa Catarina	Congelada	0	1	1	1
5SC	Santa Catarina	Congelada	0	0	1	1
1MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	0
2MT	Mato Grosso	B30	NA	1	1	0
3MT	Mato Grosso	B30	NA	1	1	1
4MT	Mato Grosso	B30	NA	1	1	1
5MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	1
6MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	0
7MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	1
8MT	Mato Grosso	B30	NA	1	1	1
9MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	0
10MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	0
11MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	0
12MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	0
13MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	0
14MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	0
15MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	0
16MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	0
17MT	Mato Grosso	B30	NA	1	0	1
18MT	Mato Grosso	B30	NA	1	0	1
19MT	Mato Grosso	B30	NA	1	0	1
20MT	Mato Grosso	B30	NA	1	0	1
21MT	Mato Grosso	B30	NA	1	0	1
22MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	0
23MT	Mato Grosso	B30	NA	0	1	0
24MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	1
25MT	Mato Grosso	B30	NA	1	0	1
26MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	1
27MT	Mato Grosso	B30	NA	1	0	1
28MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	0
29MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	0
30MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	0
31MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	0
32MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	0
33MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	0
34MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	0
35MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	0
36MT	Mato Grosso	B30	NA	1	0	1
37MT	Mato Grosso	B30	NA	1	0	1
38MT	Mato Grosso	B30	NA	1	0	1
39MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	0
40MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	0
41MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	0
42MT	Mato Grosso	B30	NA	0	0	0
43MT	Mato Grosso	B30	NA	1	0	1
1SC	Santa Catarina	B30	NA	0	0	0
2SC	Santa Catarina	B30	NA	1	1	1
3SC	Santa Catarina	B30	NA	0	1	1
4SC	Santa Catarina	B30	NA	1	1	1
5SC	Santa Catarina	B30	NA	0	1	1
1MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	0
2MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	0
3MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	1
4MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	1
5MT	Mato Grosso	B60	NA	1	0	1
6MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	0
7MT	Mato Grosso	B60	NA	1	0	1
8MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	1
9MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	0
10MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	0
11MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	0
12MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	0
13MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	0
14MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	0

15MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	0
16MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	0
17MT	Mato Grosso	B60	NA	1	0	1
18MT	Mato Grosso	B60	NA	1	0	1
19MT	Mato Grosso	B60	NA	1	0	1
20MT	Mato Grosso	B60	NA	1	0	1
21MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	1
22MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	0
23MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	0
24MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	1
25MT	Mato Grosso	B60	NA	1	0	1
26MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	1
27MT	Mato Grosso	B60	NA	1	0	1
28MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	0
29MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	0
30MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	0
31MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	0
32MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	0
33MT	Mato Grosso	B60	NA	1	0	0
34MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	0
35MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	0
36MT	Mato Grosso	B60	NA	1	0	1
37MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	1
38MT	Mato Grosso	B60	NA	1	0	1
39MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	0
40MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	0
41MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	0
42MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	0
43MT	Mato Grosso	B60	NA	0	0	1
1SC	Santa Catarina	B60	NA	0	0	0
2SC	Santa Catarina	B60	NA	0	1	1
3SC	Santa Catarina	B60	NA	1	0	1
4SC	Santa Catarina	B60	NA	1	0	1
5SC	Santa Catarina	B60	NA	0	0	1

Congelada* presento un aislamiento positivo para MTC partir de las impresiones en papel FTA.