CAMILA NOIA AGUNSO

**Enriquecimento seletivo para pesquisa de *Mycobacterium bovis* em leite e
queijo**

São Paulo

2013

CAMILA NOIA AGUNSO

Enriquecimento seletivo para pesquisa de *Mycobacterium bovis* em leite e queijo

Dissertação/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 Mestre em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2013

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2788
FMVZ

Agunso, Camila Noia
Enriquecimento seletivo para pesquisa de *Mycobacterium bovis* em leite e queijo / Camila Noia Agunso. -- 2013.
43 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2013.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles.

1. *Mycobacterium bovis*. 2. Leite. 3. Queijo. 4. Meios líquidos MGIT. 5. Enriquecimento seletivo. 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 "Enriquecimento seletivo para isolamento de *Mycobacterium bovis* em leite e queijo", protocolado sob o nº 2425/2011, não utilizando animais, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles, 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 13/3/2013.

We certify that the Research "Selective enrichment for isolation of *Mycobacterium bovis* in milk and cheese", protocol number 2425/2011, not using animals, under the responsibility Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles, 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 3/13/2013.

São Paulo, 18 de março de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: AGUNSO, Camila Noia

Título: Enriquecimento seletivo para pesquisa de *Mycobacterium bovis* em leite e queijo

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

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Aos meus pais José e Vilma,
Por todo apoio em toda minha trajetória,
Pela educação que me deram,
Por terem me dado todo amor,
Por serem responsáveis por mais essa conquista, dedico.*

*Ao meu querido marido Victor
Por todo carinho dedicado
Por toda ajuda nos momentos difíceis
Por ser esse homem maravilhoso, dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, luz da minha vida. Por me guiar e me proteger sempre.

Aos meus pais, irmãos e ao Victor, que sempre me apoiaram nas minhas decisões e me ajudaram quando precisei contar com eles. Vocês foram fundamentais para mim.

À professora Dra. Evelise Oliveira Telles pela oportunidade dada desde o primeiro contato e pelo voto de confiança para me orientar. Esse período foi de muito aprendizado e crescimento para mim.

Aos técnicos Bispo e em especial a amiga Sandra Sanches, pela amizade, conversas, ensinamentos, paciência e ajuda durante todo o período do mestrado.

Às parceiras e amigas Cássia, Gisele e Léia por toda a contribuição no projeto. Sem a ajuda de vocês eu não sei como seria.

Aos amigos Vasco, Joana, Larissa, Mariana, Leila e Juliana pelo apoio e incentivo.

Aos meus familiares por todo apoio e incentivo.

À Karina e Eveline pelos momentos que passamos juntas e pela amizade.

Aos professores, colegas e funcionários do VPS. Em especial à professora Dra. Andrea Micke Moreno, por disponibilizar seu laboratório para realizar parte do experimento.

Ao CNPq pela bolsa concedida durante todo o período.

*“Todo saber é vo se no houver trabalho,
e este vio se no houver amor.”*

Dr. Celso Charuri

RESUMO

AGUNSO, C. N. **Enriquecimento seletivo para pesquisa de *Mycobacterium bovis* em leite e queijo**. [Selective enrichment for research of *Mycobacterium bovis* in milk and cheese]. 2013 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O *Mycobacterium bovis* causa a tuberculose bovina, doença zoonótica que propaga, provavelmente com baixa prevalência, em todo o território nacional e pode ser transmitida pelo leite. A adoção sistemática da pasteurização do leite contribuiu para a redução dos casos humanos da doença, mas em alguns países, como o Brasil, é comum o consumo de leite cru e de seus derivados, o que pode contribuir para ocorrência de casos humanos. A participação desse agente nos atuais índices de tuberculose humana, cujo principal agente é o *M. tuberculosis*, é pouco investigada, mas acredita-se que seja maior do que parece. As razões que contribuem para isso incluem o fato do tratamento humano ser o mesmo independentemente do agente, e as dificuldades e alto custo de distinguir as espécies. O método de diagnóstico “gold standard” em laboratório para *Mycobacterium bovis* em amostras clínicas é o isolamento do agente em meios como Stonebrink-Leslie ou similares. A riqueza em nutrientes dos meios, mais o lento metabolismo deste agente e o alto grau de contaminantes das amostras torna imprescindível o uso de descontaminantes que, via de regra, são tóxicos para o agente, dificultando o isolamento em amostras com níveis baixos do patógeno; cenário provável no caso do leite devido à mistura com o leite de animais sadios. Mas, a despeito de constituir-se uma importante zoonose transmitida pelo leite, não existe uma metodologia oficial para detecção desse agente em alimentos lácteos. Esses fatos justificam um estudo para avaliar o desempenho de meios líquidos, já utilizados em caros sistemas automatizados para detecção de micobactérias, como alternativa para um enriquecimento seletivo do *M. bovis* em amostras lácteas. Assim, amostras de leite integral esterilizado e de queijo tipo parmesão foram contaminadas com 10 a 100 UFC/ml ou g de *M. bovis* AN5 e enriquecidas em dois meios líquidos seletivos (MGIT e MGIT modificado), foram analisados nos dias 0, 7, 14, 21, 24, 28 e 32, mantidas em estufa a 37°C. Nessas

datas, uma alíquota foi semeada em meio Stonebrink-Leslie e incubada a 37°C por 60 dias. No leite, houve crescimento exacerbado do *M. bovis* principalmente no MGIT modificado. No queijo, não foi possível isolar *M. bovis* de nenhuma amostra em MGIT modificado, devido à contaminação excessiva que deteriorou o meio de cultura. O MGIT modificado foi mais eficaz como enriquecimento para o *Mycobacterium bovis*, mas foi menos seletivo que o MGIT. Estudos futuros devem concentrar a investigação da curva de crescimento do agente na primeira semana de enriquecimento.

Palavras-chave: *Mycobacterium bovis*. Leite. Queijo. Meios Líquidos MGIT. Enriquecimento seletivo.

ABSTRACT

AGUNSO, C. N. **Selective enrichment for research of *Mycobacterium bovis* in milk and cheese.** [Enriquecimento seletivo para pesquisa de *Mycobacterium bovis* em leite e queijo]. 2013 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Mycobacterium bovis causes bovine tuberculosis, zoonotic disease raging, probably with low prevalence, throughout the national territory and can be transmitted through the milk. The systematic adoption of milk pasteurization helped reduce human cases of the disease, but in some countries, like Brazil, is the common consumption of raw milk and its derivatives, which may contribute to the occurrence of human cases. The participation of this agent in the current rates of human tuberculosis, the principal agent is *M. tuberculosis*, it is not investigated, but it is believed to be larger than it looks, the reasons contributing to this include the fact that human treatment is similar regardless of the agent and the difficulty / cost to distinguish between species. The diagnostic method "gold standard" for *Mycobacterium bovis* in clinical samples is the isolation of the agent means, Leslie as Stonebrink or the like. The species richness in nutrient media, over the slow metabolism this agent and the high degree of contamination of the samples makes indispensable using decontaminant that, as a rule, are toxic to the agent, making isolation in samples with low levels of the pathogen; scenario likely due to the milk mixture with the milk of healthy animals. But, despite constitute an important zoonosis transmitted by milk, there is no official method for detection of this agent in dairy foods. These facts justify a study to evaluate the performance of liquid media, as used in expensive automated systems for detection of mycobacteria, as alternative to a selective enrichment of *M. bovis* in milk samples. Thus, samples of sterilized milk and Parmesan cheese type were infected with 10 to 100 CFU / ml or g of *M. bovis* AN5 and enriched in two selective liquid media (MGIT and modified MGIT) were analyzed on days 0, 7, 14, 21, 24, 28 and 32, maintaining at 37 ° C. On that date, an aliquot was plated on Stonebrink half-Leslie and incubated at 37 ° C for 60 days. In milk, there was overgrowth of *M. bovis* mainly in MGIT modified. Cheese, it was not possible to isolate *M. bovis* no sample in MGIT modified due to excessive contamination it deteriorated the culture medium.

The modified MGIT was more effective as enrichment for *Mycobacterium bovis*, but was less selective than the MGIT. Future studies should focus on investigating the growth curve of the agent in the first week of enrichment.

Keywords: *Mycobacterium bovis*. Milk. Cheese. MGIT Liquid Medium. Selective Enrichment.

LISTA DE FOTOS

Foto 1 - Garrafas 20 mL com meio Stonebrink-Leslie com crescimento incontável – São Paulo – 2013	34
Foto 2 – Tubo 50 ml com meio MGIT após incubação e com contaminação – São Paulo – 2013	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Contagem de <i>M. bovis</i> nas três últimas diluições realizadas do inóculo-mãe	32
Tabela 2 – Contagem de <i>M. bovis</i> no inóculo-mãe, ajustado à densidade ótica 0,200.....	32
Tabela 3 – Resultado das contagens de <i>M. bovis</i> (log UFC/mL ou g) nas amostras de leite e queijo enriquecidas por até 32 dias em dois meios de enriquecimento seletivo	33
Tabela 4 – Número de análises (n=140) em que foi possível a quantificação de <i>M. bovis</i> , em cada meio de enriquecimento (meios 1 e 2)	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Contagem teórica esperada de <i>M. bovis</i> em 1 mililitro do inóculo-mãe (ajustado à densidade ótica de 0,200) em diversas diluições decimais seriadas.....	33
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
DO	Densidade Ótica
FAO	Food and Agriculture Organization
FSAI	Food Safety Authority Ireland
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPI	Equipamento de Proteção Individual
g	Grama
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
log	Logarítmo
LJ	Löwenstein-Jensen
mg	Miligrama
mL	Mililitro
µm	Micrômetro
µL	Micro litro
nm	Nanômetro
<i>M. africanum</i>	<i>Mycobacterium africanum</i>
<i>M. avium</i>	<i>Mycobacterium avium</i>
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. canetti</i>	<i>Mycobacterium canetti</i>
<i>M. caprae</i>	<i>Mycobacterium caprae</i>
<i>M. microti</i>	<i>Mycobacterium microti</i>
<i>M. pinnipedii</i>	<i>Mycobacterium pinnipedii</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MGIT	Mycobacteria Growth Indicator Tube
OIE	Organização Internacional de Epizotia
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Tuberculose
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UHT	Ultra High Temperature
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3	OBJETIVOS	24
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1	MEIOS DE CULTURA	26
4.2	INÓCULO	28
4.3	INOCULAÇÃO DA AMOSTRA.....	30
4.4	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	31
4.5	CONDIÇÕES DE SEGURANÇA DO TRABALHO	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
6	CONCLUSÕES.....	38
	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Mycobacterium* spp. inclui várias espécies de microrganismos causadores de tuberculose em humanos e em animais, o *Mycobacterium bovis*, apesar de acometer principalmente os bovinos, também pode infectar outros animais e inclusive o homem (GRANGE; YATES, 1994; MODA et al., 1996; MICHEL; MÜLLER; HELDEN, 2010). Esse agente possui uma variedade muito ampla de hospedeiros quando comparado com outros patógenos conhecidos (O'REILLY; DABORN, 1995) e, de acordo com a OIE (2009), a transmissão para humanos constitui um problema de saúde pública.

Essa transmissão para os humanos ocorre principalmente pela ingestão de leite cru ou de seus derivados contaminados, mas outras vias podem ser importantes para trabalhadores rurais, como a inalação de aerossóis devido à proximidade com animais infectados (HARDIE; WATSON, 1992; COUSINS; DAWSON, 1999; MICHEL; MÜLLER; HELDEN, 2010).

Dentre as estratégias adotadas por alguns países a fim de reduzir a incidência da doença causada por *Mycobacterium bovis* no rebanho bovino e no homem estão os programas de controle e erradicação da tuberculose bovina e a obrigatoriedade da pasteurização do leite (LOBUE; ENARSON; THOEN, 2010; TENGURIA et al., 2011).

Apesar de obrigatória, a pasteurização do leite não é realizada em boa parte da produção nacional, que conta com aproximadamente 32% de leite não inspecionado, segundo dados divulgados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA (2012).

Mesmo com a importante participação dos produtos lácteos na transmissão da doença para o homem, não há métodos oficiais para a detecção de *Mycobacterium bovis* em alimentos (FOOD SAFETY, 2008; MESSELHÄUSSER; KÄMPF; HÖRMANSDORFER, 2012), mostrando a necessidade de estudos na área.

O método diagnóstico “*gold standard*” para amostras clínicas animais ainda é o isolamento do agente em meios como Stonebrink-Leslie ou similares, que são muito ricos em nutrientes. Esta característica associada ao lento metabolismo do *M. bovis* e ao, geralmente, alto grau de contaminação por microrganismos deteriorantes

na amostra torna necessária sua descontaminação prévia (AMBROSIO et al., 2008), o que causa uma redução do número de bacilos viáveis, já que este processo utiliza substâncias químicas tóxicas (COLLINS; GRANGE, 1983; CORNER; TRAJSTMAN, 1988). Considerando: a prevalência da tuberculose bovina ser baixa no país (BELCHIOR, 2000); apenas parte dos animais apresenta a doença no úbere; a excreção do agente seja intermitente (KAO; GRAVENOR; CHARLESTON, 2007); o metabolismo deste microrganismo ser lento e que o leite eventualmente contaminado será misturado com o leite de outros animais sadios, é razoável se esperar que o nível de contaminação esperado para o leite cru, por *M. bovis*, seja baixo. Assim, uma etapa de descontaminação que use substâncias tóxicas ao *M. bovis* pode causar uma redução da população presente, prejudicando o isolamento do agente.

Desta forma, torna-se necessária a utilização de uma etapa de enriquecimento para facilitar a detecção em amostras em que a população do organismo alvo é baixa, possibilitando a inclusão de antibióticos na inibição de microrganismos competidores, que normalmente se encontram em maior número, além de propiciar a recuperação de células injuriadas por refrigeração ou pela presença de alguma substância que prejudica seu crescimento.

Diante destas informações esse trabalho testou meios de enriquecimento seletivo na pesquisa de *Mycobacterium bovis* em leite ou derivados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Pertencente ao gênero *Mycobacterium* spp, o *Mycobacterium bovis*, que tem como principal espécie hospedeira os bovinos, também infecta outros animais, inclusive silvestres e o homem. É membro do “Complexo *Mycobacterium tuberculosis*” (MTBC) juntamente com as espécies *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canneti*, *M. pinnipedii* e *M. caprae* (BIER, 1978; CORNER, 1994; VAN SOOLINGEN; HOOGENBOEZEM; HAAS, 1997; UNE; MORI, 2007; ROWE; DONAGHY, 2008; TENGURIA et al., 2011).

O bacilo tuberculoso bovino foi considerado uma variante do *Mycobacterium tuberculosis* e denominado *M. tuberculosis* variante *bovis* ou *M. tuberculosis* subespécie *bovis*., quando Karlson e Lessel (1970) propuseram sua classificação atual como *Mycobacterium bovis*.

O *M. bovis* é um bacilo microaerófilo, imóvel, não apresenta esporos ou cápsula, é delgado, medindo 1,5 a 4 μ de comprimento, por 0,2 a 0,6 μ de largura e é álcool-ácido-resistente -BAAR (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1988; CORNER, 1994).

Uma das características de maior destaque das micobactérias e, conseqüentemente, do *M. bovis* é o seu alto teor de lipídeos, cuja concentração atinge até 60% da parede celular (BIER, 1978). O alto teor de lipídeos da parede celular é um dos responsáveis pelo crescimento relativamente lento, tornando-os impermeáveis a vários corantes hidrossolúveis (HADAD, 1994). A combinação de anilina ou fenol ao corante fucsina permite a penetração do corante na parede celular, que interage com lipídeos, e não é removido por soluções álcool-ácidas. Motivo que o torna um bacilo álcool-ácido-resistente ou BAAR (CORNER, 1994; HADAD, 1994).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (1994), a tuberculose é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade humana em muitos países em desenvolvimento. A maioria dos casos é em decorrência do *Mycobacterium tuberculosis*, mas alguns são devido à infecção por *Mycobacterium bovis*. Kleeberg (1984) já havia relatado que o homem é tão sensível ao bacilo bovino quanto ao bacilo humano.

Dados de notificações oficiais de tuberculose bovina indicam uma prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados, no período de 1989 a 1998. Estudo realizado em 1999 no estado de Minas Gerais, que abrangia 1.600 propriedades e 23.000 animais, teve como prevalência 0,8% de animais infectados. No mesmo estudo, 5% das propriedades apresentaram animais reagentes e dentre as propriedades mais tecnificadas, esse valor subiu para 15% (BELCHIOR, 2000). Kantor e Ritacco (2006) citam uma prevalência de animais doentes no Brasil de 0,83%, sendo a região Centro-Oeste a de menor prevalência com 0,37%.

Segundo dados da EMBRAPA (2012), atualmente o Brasil é o quinto maior produtor de leite do mundo, com uma produção de 31 bilhões de litros de leite, sendo o estado de Minas Gerais responsável pela maior produção, contribuindo com 27% do total produzido (IBGE, 2010).

É preocupante o dado que mais de 30% da produção de leite nacional não é inspecionada e, portanto, entra no mercado sem qualquer fiscalização higiênico-sanitária (EMBRAPA, 2012).

Para os humanos, a tuberculose devido ao *M. bovis* é transmissível diretamente pela via aerógena, por inalação do agente, e principalmente, pelo consumo de leite ou derivados lácteos não pasteurizados (KLEEBERG, 1984; HARDIE; WATSON, 1992; GRANGE; YATES, 1994; MODA et al., 1996).

Moda et al. (1996) destacam que, em geral, a incidência de infecção por *M. bovis* em humanos é mais alta em áreas rurais com rebanhos infectados, e apresenta uma variação regional que depende da presença da doença no rebanho, no entanto, Michel, Müller e Helden (2010) enfatizam o consumo de leite cru ser o principal fator de risco.

A ocorrência da doença através da ingestão de leite cru ou derivados contaminados representa um importante papel em regiões onde esta prática ainda existe (MODA et al., 1996; THOEN; LOBUE; KANTOR, 2006; UNE; MORI, 2007). Além disso, os queijos feitos com leite cru são importantes e tradicionais produtos da agricultura familiar tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento (KINDE; MIKOLON; RODRIGUEZ-LAINZ, 2007).

Com a implementação dos programas de controle e erradicação da tuberculose bovina, feita por alguns países, e com a obrigatoriedade da pasteurização do leite, a ocorrência da doença em humanos reduziu

consideravelmente (FOOD SAFETY, 2008). Na Holanda, antes dessas mudanças, a porcentagem de pacientes tuberculosos acometidos pelo *M. bovis* era de 10%, depois passou a ser de 1,5% (MAJOOR et al., 2011).

Além da importância em saúde pública, o *M. bovis* tem significativa importância na saúde animal por causar perdas econômicas, uma vez que afeta a produtividade dos animais de produção e prejudica o comércio de produtos de origem animal de países que a possuem (THOEN; LOBUE; KANTOR, 2006; QAMAR; AZHAR, 2013).

Sabe-se que a notificação da tuberculose zoonótica é falha e, dessa forma, a Organização Mundial da Saúde/World Health Organization – WHO, a Food and Agriculture Organization - FAO e a Organização Internacional de Epizotias - OIE classificaram recentemente a tuberculose humana causada pelo *M. bovis* como uma zoonose negligenciada em países desenvolvidos (MICHEL; MÜLLER; HELDEN, 2010).

No Brasil, esforços para combater a doença nos animais com um melhor planejamento tiveram início em 2001, com o lançamento do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). O programa tem como objetivo diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária nacional (BRASIL, 2006).

Apesar disso, a tuberculose bovina continua sendo uma preocupação mundial e a doença está presente tanto em países desenvolvidos, a exemplo dos Estados Unidos, Reino Unido e Nova Zelândia, onde a infecção persiste em animais silvestres, como em muitos países em desenvolvimento (OIE, 2009).

Na rotina laboratorial, o melhor método para a detecção do *M. bovis* em amostras clínicas é através do cultivo da amostra, previamente descontaminada, em meios sólidos como o Lowenstein-Jensen e Stonebrink-Leslie (WAYNE; KUBICA, 1986). Os descontaminantes comumente utilizados são: cloreto de hexadecilpiridínio (HPC), hidróxido de sódio (NaOH), cloreto de benzalcônio (BC), ácido oxálico (OA), ácido sulfúrico e N-acetil-L-cisteína-NaOH (NALC-NaOH) (ROWE; DONAGHY, 2008).

A etapa de descontaminação tem por objetivo inativar outras bactérias que normalmente estão presentes na amostra (AMBROSIO et al., 2008), no entanto, as substâncias descontaminantes são tóxicas para o *M. bovis* e, portanto, diminuem o

número de microrganismos viáveis (CORNER et al., 2012), o que pode ser um problema na pesquisa desse agente em produtos lácteos, onde se espera um baixo nível de contaminação por este patógeno, devido à mistura de leite contaminado com leite não contaminado.

Neste contexto os estudos realizados por Corner et al. (1995) e por Dundee et al. (2001) podem contribuir com alternativas pois mostraram que o método HPC 0,75% é eficiente com o mínimo de toxicidade para o *M. bovis*. Em estudo realizado para detecção de *Mycobacterium avium* subsp.*paratuberculosis* em leite de vacas infectadas, dois métodos de descontaminação foram testados e o método NALC-NaOH 1,5% (15 minutos) comparado ao HPC, na mesma concentração, teve melhor desempenho para esse tipo de amostra (BRADNER et al., 2012).

Para superar o problema relacionado à toxicidade desses descontaminantes, Rowe e Donaghy (2008) sugerem que, para o isolamento do *Mycobacterium bovis* na presença de outros microrganismos, o meio pode ser suplementado com antibióticos, como o suplemento comercial PANTA™ (Becton Dickinson) que consiste de Polimixina B, Anfotericina B, Ácido nalidíxico, Trimetroprima e Azlocilina.

Métodos moleculares foram desenvolvidos para a detecção direta e identificação de espécies de micobactérias. Em alimentos, a introdução da reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico microbiológico de muitas espécies de bactérias tem sido frequente em vários laboratórios como uma alternativa aos métodos rotineiramente escolhidos (MARIN; LEMOS; FREITAS, 2006).

Porém ainda a cultura para micobactérias permanece indispensável em laboratórios de micobactérias (PFYFFER; WELSCHER; KISSLING, 1997).

Para a detecção e isolamento de espécies do gênero *Mycobacterium* spp., alguns estudos foram realizados em amostras clínicas animais e em leite cru e produtos lácteos. No Brasil, Pardo et al. (2001) isolaram *Mycobacterium* spp do leite de vacas suspeitas ou positivas para tuberculose em 78 amostras (10%) de um total de 780, oriundas de 52 animais, os quais 19 foram positivos. Dentre as espécies identificadas, 5,26% eram *M. avium*, 10,52% eram *M. fortuitum*, 5,26% eram *M. bovis* e 78,95% foram classificadas como pertencentes ao gênero *Mycobacterium* spp. Foi usada a técnica com descontaminação prévia da amostra pelo método NALC-NaOH seguida da inoculação em meios sólidos, como o Stonebrink-Leslie e o Löwenstein-Jensen.

Em outra investigação feita em São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Goiás e Pará por Leite et al. (2003) micobactérias foram isoladas em 15 de 22 (68,2%) amostras clínicas e em 23 de 128 (18%) amostras de leite. Destes achados, as espécies identificadas foram: *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. Kansasii* e *M. gordonae*, sendo que o *M. bovis* foi isolado em 10 amostras clínicas e 1 amostra de leite cru. A técnica escolhida envolveu uma etapa de descontaminação, que utilizou 5% de ácido oxálico e cultivo também em meios Stonebrink-Leslie e Löwenstein-Jensen.

Um total de 203 amostras de queijos do tipo duro, semi-duro e mole de viajantes localizados na fronteira dos Estados Unidos com o México foram submetidas à etapa de descontaminação utilizando o método NALC-NaOH 4% e alíquotas das amostras foram inoculadas nos meios líquidos BACTEC 12B e MGIT 960, suplementados com antibiótico PANTA[®] (Becton Dickinson). O princípio de detecção desses meios é através de um sistema automatizado que detecta por fluorescência a produção de CO₂ decorrente do metabolismo do microrganismo. Como resultado, 10 amostras (4,9%) foram positivas para o gênero *Mycobacterium* spp., sendo 1 isolado identificado como *Mycobacterium bovis* (HARRIS; PAYEUR; BRAVO, 2007).

Na Tunísia, 306 amostras de leite cru coletadas durante a ordenha de 102 animais positivos ao teste de tuberculinização intradérmica foram descontaminadas pelo método de Petroff (NaOH 4%) e inoculadas em meios Lowenstein-Jensen e Coletsos. Dos 102 animais positivos, 5 (4,9%) eliminavam *Mycobacterium bovis* no leite (KAHLA et al., 2011).

3 OBJETIVOS

Geral:

Avaliar o desempenho de dois meios de cultura líquidos como enriquecimento seletivo para a detecção de *Mycobacterium bovis* em produtos lácteos.

Específicos:

Avaliar o desempenho dos meios como enriquecimento para o *M. bovis*.

Avaliar o desempenho dos meios como impediante para o crescimento da microbiota contaminante.

Identificar o tempo mínimo de enriquecimento da amostra.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Vinte amostras de leite UHT integral (previamente autoclavado por 121 °C/15 min.) e vinte amostras de queijo parmesão foram empregadas em teste para avaliação do desempenho de dois meios como enriquecimento seletivo para *Mycobacterium bovis* AN5.

A amostra de leite foi autoclavada por dois motivos: 1) eliminar microbiota competidora para avaliar o crescimento do agente em “condições ótimas” e 2) garantir que as contagens de *M. bovis* encontradas fossem do agente inoculado.

O teste usando queijo parmesão teve por objetivos: 1) verificar o comportamento do *M. bovis* sob condições de competição microbiana e 2) avaliar o poder de seletividade dos meios.

As amostras foram contaminadas com *M. bovis* AN5, simulando uma contaminação do produto com cerca de 10 a 100 UFC/g ou ml, e submetidas a dois meios de enriquecimento seletivo (e incubadas a 37 °C) para análise nos dias: 0, 7, 14, 21, 24, 28 e 32. As amostras foram semeadas em meio Stonebrink-Leslie (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1985), e incubadas a 37 °C por 60 dias.

Foram testados os meios MGIT™ (Becton Dickinson) e uma proposta modificada deste meio: a mesma base 7H9 e com o mesmo suplemento MGIT™ OADC, mas substituindo o glicerol por piruvato de sódio e usando uma mistura de antibióticos que difere do MGIT™ PANTA (BD®) por não ter o antibiótico Azlocilina. O glicerol foi substituído por piruvato de sódio, pois algumas espécies de *Mycobacterium* spp, incluindo o *Mycobacterium bovis*, não aproveitam o glicerol como fonte de carbono e, assim, não crescem. O piruvato é rotineiramente substituído a fim de permitir esse crescimento (KEATING; WHEELER; MANSOOR, 2005). O uso da mistura de antibióticos visa reduzir o custo já que o PANTA™ é muito caro; a mistura utilizada difere da composição deste produto por não ter a Azlocilina, simplesmente porque ela não foi encontrada no mercado.

4.1 MEIOS DE CULTURA

Preparo dos meios de cultura empregados:

- 1) O meio MGIT™ foi preparado segundo as recomendações do fabricante. Pesou-se 4,7 g do meio base (7H9), que foram diluídos em 900 ml de água destilada e, então, adicionado de 2 ml de glicerol. Posteriormente foi esterilizado a 120°C por 15 minutos e após, o meio foi, assepticamente, suplementado com 100 ml de enriquecimento MGIT™ OADC e com 25,7 ml da mistura de antibióticos MGIT™ PANTA™.

O suplemento MGIT™ OADC já vem pronto, em frascos de 20 ml ou 100 ml. O antibiótico MGIT™ PANTA™ deve ser ressuspensionado em água destilada (3 ml para cada ampola) e filtrado antes de ser adicionado ao meio; usou-se o filtro de 0,45µm (MILLEX™) e seringa estéreis.

Composição do Middlebrook 7H9 (por litro de água destilada):

Fosfato monopotássio	2.0 g
Citrato de Ferro.....	0.04 g
Fosfato Dissódico.....	1.5 g
Sulfato de Magnésio	0.05 g
Glutamato Monossódio.....	0.5 g
Sulfato de Zindo.....	0.001 g
Citrato de Sódio.....	0.1 g
Sulfato.....	0.001 g
Sulfato de Amônia	0.5 g
Biotina.....	0.5 mg
Piridoxina.....	0.001 g
Cloreto de Cálcio.....	0.5 mg

Composição do suplemento MGIT™ OADC (proporção para 1L de água destilada ou deionizada):

Albumina bovina.....	50,0 g
Dextrose.....	20,0 g
Catalase.....	0,03 g
Ácido oleico.....	0,6 g

Composição da mistura de antibióticos PANTA™ (fórmula aproximada por ampola):

Polimixina B.....	6000 U
Anfotericina B.....	600 µg
Ácido nalidíxico.....	2400 µg
Trimetoprima.....	600 µg
Azlocilina.....	600 µg

- 2) O segundo meio foi um MGIT modificado: preparado como o anterior, mas com duas alterações: a) o glicerol foi substituído por 2 g de piruvato de sódio; b) o PANTA™ foi substituído por 25,7 ml da mistura de antibióticos (quantidade abaixo) e que difere do PANTA, pela ausência da Azlocilina. No preparo, os antibióticos foram pesados em balança de precisão, diluídos em 30 mL de água destilada e filtrados com filtro 0,45µm (MILLEX™) e seringa estéreis:

Quantidade em gramas de cada antibiótico (para 30 ml de água destilada):

Polimixina B.....	0,038 g
Anfotericina B.....	0,006 g
Ácido Nalidíxico.....	0,024 g
Trimetoprim.....	0,06 g

4.2 INÓCULO

Padronização do inóculo:

Foram utilizadas culturas puras de *M. bovis* AN5 com 10 dias de crescimento em meio Stonebrink-Leslie (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1985) a 37°C, preparadas em garrafas descartáveis de cultivo celular de 20 mL (TPP®), cedidas pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo.

As garrafas contendo a cultura foram pesadas em balança de precisão, e com uma haste de plástico estéril foi retirado 0,300 g de massa, e depois transferida para um cadinho estéril. Adicionou-se 0,5 mL de solução salina 0,85%, contendo 0,05% de Tween 80, que então, foi homogeneizado. O Tween 80 é um detergente indicado para evitar a formação de grumos. Em seguida, foram adicionados 11,5 mL de solução salina 0,85% completando 12 mL de inóculo, denominado inóculo bruto para fins de descrição, que foram transferidos para um frasco de vidro de 50 mL, contendo pérolas de vidro para evitar a formação de grumos (Etapa 1).

Após o preparo do inóculo-bruto, foram feitas diluições decimais e seriadas até 10^{-2} . Para escolha da diluição que mais se aproximasse da turbidez do tubo 0,5 da escala nefelométrica de McFarland, onde se espera um nível de população bacteriana de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ bactérias/mL do agente. Para ajuste da turbidez da suspensão, observada a olho nú, com a turbidez real da escala, alíquotas de 1 mL das diluições 10^{-1} e 10^{-2} foram transferidas para duas cubetas de plástico descartáveis para avaliação da densidade ótica (D.O.) em espectrofotômetro a 600nm (Nanodrop 2000c). Foi escolhida a suspensão que mais se aproximava do valor de absorbância 0,200 (que faz referência à turbidez 0,5 da escala de McFarland com este comprimento de onda), e a partir do resultado de leitura desta suspensão, ela foi ajustada com adição do diluente para a correção do valor para 0,200, e passou a ser denominada de inóculo-mãe (Etapa 2).

Esse inóculo foi então submetido à diluição decimal e seriada até 10^{-6} e uma alíquota de 100 µL de cada diluição foi semeada em duplicata, em meio Stonebrink-Leslie e incubada a 37°C por 30 dias. Esse procedimento foi repetido 4 vezes de modo a obter um valor médio do nível mais preciso de *M. bovis* nessa suspensão

(Etapa 3). O organograma abaixo mostra as etapas referentes à padronização do inóculo.

Etapa 1

Etapa 2

Etapa 3

4.3 INOCULAÇÃO DA AMOSTRA

Inoculação da amostra de leite e queijo:

Uma vez definida a concentração real do inóculo, foi calculado o volume necessário para contaminar as amostras de leite e queijo de forma obter nível de 10 a 100 UFC/g ou ml para o teste.

Porções de 2,5 g de queijo (20 amostras) e de 2,5 mL de leite (20 amostras) foram homogeneizadas com 22,5 mL de cada um dos meios de enriquecimento (MGIT™ e MGIT modificado). A homogeneização da amostra de queijo foi realizada com a ajuda de Stomacher da marca Laboratory Blender STOMACHER 400 em velocidade normal por 60 segundos. Todas as 80 amostras foram mantidas em tubos Falcon 50 ml (BD®) e então contaminadas.

4.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Cada amostra foi analisada nos dias 0, 7, 14, 21, 24, 28 e 32 de incubação em estufa a 37°C. Nestes dias, após a homogeneização vigorosa do meio de enriquecimento, uma alíquota de 0,1mL de cada amostra foi semeada, em duplicata, em meio Stonebrink-Leslie, e incubada a 37°C por 60 dias, quando foi feita a contagem da colônia e o registro dos resultados, expressos em log UFC/ml ou g.

4.5 CONDIÇÕES DE SEGURANÇA DO TRABALHO

A manipulação do material contaminado foi realizada em fluxo laminar (VECO®/Modelo VLFS 18) desinfetado com hipoclorito de sódio seguido de álcool 70% e luz ultravioleta por 15 minutos, antes e após o uso.

Também foram utilizados EPI descartáveis, durante a manipulação do material contaminado, como: avental de mangas compridas, touca, luvas de borracha, óculos e máscara *air safety*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado das contagens das últimas diluições do inóculo (com densidade ótica corrigida para 0,200) está apresentado na tabela 1, e na tabela 2 estão os resultados finais da contagem das UFC/ml (média das placas que apresentavam 10 a 150 colônias, multiplicados pelo inverso da diluição e multiplicado por 10 para correção do volume semeado). Observa-se que, em média, o inóculo assim preparado apresenta $3,8 \times 10^6$ UFC de *M. bovis* por mililitro de suspensão, ou 6,6 log UFC/mL.

Tabela 1 - Contagem de *M. bovis* nas três últimas diluições realizadas do inóculo-mãe (ajustado à D.O. 0,200 medida em comprimento de onda de 600nm)

amostra	UFC por 0,1 ml da diluição					
	0,0001		0,00001		0,000001	
	placa 1	placa 2	placa 1	placa 2	placa 1	placa 2
1	36	54	4	7	0	0
2	44	14	10	10	0	0
3	62	85	9	8	0	0
4	32	50	9	3	0	0

Tabela 2 – Contagem de *M. bovis* no inóculo-mãe, ajustado à densidade ótica 0,200

amostra	UFC/mL de inóculo	log UFC/mL de inóculo
1	4500000	6,7
2	2900000	6,5
3	7350000	6,9
4	4100000	6,6
média	3770000	6,6

Com base no resultado médio das 4 repetições de quantificação da concentração do *M. bovis* no inóculo ajustado à D.O. 0,200 ($3,8 \times 10^5$), fez-se uma projeção teórica do volume necessário deste inóculo ajustado para obtenção da carga contaminante final desejada na amostra (conforme Quadro 1)

Quadro 1 – Contagem teórica esperada de *M. bovis* em 1 mililitro do inóculo-mãe (ajustado à densidade ótica de 0,200) em diversas diluições decimais seriadas.

diluição	UFC esperado/mL
1	3770000
0,1	377000
0,01	37700
0,001	3770
0,0001	377
0,00001	37,7

Observa-se no quadro que a diluição 10^{-4} do inóculo ajustado apresenta 377 UFC/mL. Desta forma, empregou-se 0,1 mL deste inóculo para contaminar as amostras.

Os resultados das análises das amostras de leite e queijo nos dois meios de estudo estão na tabela 3. Observa-se que os resultados da mediana e da média são muito próximos.

Tabela 3 – Resultado das contagens de *M. bovis* (log UFC/mL ou g) nas amostras de leite e queijo enriquecidas por até 32 dias em dois meios de enriquecimento seletivo

valor		tempo de enriquecimento no meio 1							tempo de enriquecimento no meio 2						
		dia 0	dia 7	dia 14	dia 21	dia 24	dia 28	dia 32	dia 0	dia 7	dia 14	dia 21	dia 24	dia 28	dia 32
		n=20*	n=20	n=20	n=20	n=19	n=19	n=18	n=20	n=20	n=20	n=19	n=17	n=13	n=13
leite	mínimo	1,3	0,0**	0,0	0,0	1,2	>3,2***	0,0	1,3	1,6	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0
	média	1,8	1,9	1,8	2,5	2,9	>3,2	3,0	1,8	2,1	2,8	3,0	3,0	2,9	2,6
	desvio padrão	0,2	0,9	0,8	1,1	0,6		0,7	0,2	0,4	0,4	0,7	0,8	0,9	1,2
	mediana	1,8	1,7	1,8	>3,2	>3,2	>3,2	>3,2	1,8	2,0	2,9	>3,2	>3,2	>3,2	>3,2
	máximo	2,3	>3,2	>3,2	>3,2	>3,2	>3,2	>3,2	2,1	>3,2	>3,2	>3,2	>3,2	>3,2	>3,2
		n=15	n=12	n=13	n=15	n=15	n=13	n=13	n=18	n=2	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0
queijo	mínimo	0,0	1,6	>3,2	>3,2	>3,2	>3,2	>3,2	0,0	>3,2					
	média	0,9	1,9	>3,2	>3,2	>3,2	>3,2	>3,2	1,1	>3,2					
	desvio padrão	0,8	0,2						0,6		crescimento exacerbado de contaminantes				
	mediana	1,0	1,8	>3,2	>3,2	>3,2	>3,2	>3,2	1,3	>3,2					
	máximo	1,0	1,9	>3,2	>3,2	>3,2	>3,2	>3,2	1,8	>3,2					

*número de amostras com resultado contável ou incontável do *M. bovis*; n menor que 20 indica amostras perdidas por contaminação

** abaixo do limite de detecção = 0,7 logUFC/mL

*** > 3,2 indica que foi incontável na única diluição realizada

Muitas amostras excederam o limite superior da técnica (3,2 log UFC/ml), ou seja, a contagem resultou “incontável” (Foto 1); nesses casos, para fins de cálculo dos valores de média e mediana, considerou-se o valor pontual 3,2 log UFC/ml.

Foto 1 – Garrafas 20 mL com meio Stonebrink e crescimento incontável – São Paulo – 2013

Fonte: Camila Noia Agunso (2013)

Observa-se também que os resultados da contaminação inicial (dia 0) no queijo foi mais baixa que no leite, o que sugere a maior dificuldade do inóculo em se adaptar ao substrato, aumentando a fase lag, o que poderia ser causado pelo grande número de competidores ou a existência de algum outro fator, como menor pH do homogeneizado (não analisado).

O grande número de resultados incontáveis mostra que o desenho amostral (o intervalo de tempo para as análises e as diluições previstas para contagem), foi inadequado para a observação da curva de crescimento. Indica que, para estudos futuros, deverá ser investigada a capacidade do meio de cultura de “enriquecimento” e de “seleção” na primeira semana de cultivo.

Quanto à capacidade de enriquecimento (promover o crescimento do *M. bovis*), o meio 2 mostrou-se mais eficaz, o que pode ser observado quando o substrato foi o leite, onde havia pouco ou nenhum competidor. Na tabela 3 podemos observar os valores mais elevados da média e mediana nas análises dos dias 7 e 14 no meio 2.

Outro dado que corrobora com essa assertiva pode ser observado na tabela 4: o meio 2 permitiu o crescimento mais rápido do *M. bovis*, que alcançou níveis incontáveis em maior número de análises (considerando todos os tempos de enriquecimento, das 20 amostras de leite ou queijo). Este fato pode ser explicado devido ao *M. bovis* ter dificuldade em se desenvolver em meios glicerinados (CORNER; NICOLACOPOULOS, 1988); a substituição do glicerol pelo piruvato de sódio na rotina laboratorial é frequentemente feita a fim de permitir um melhor

crescimento ao *M. bovis* (CAVANAGH; KEYES, 1968; MARCONDES et al., 2006; SOBRAL; DUARTE; VIEIRA, 2011).

Tabela 4 – Número de análises (n=140) em que foi possível a quantificação de *M. bovis*, em cada meio de enriquecimento (meios 1 e 2)

		contável	níveis incontáveis (crescimento abundante de contaminação)
leite	meio 1	65	75 (4)
	meio 2	54	86 (19)
queijo	meio 1	27*	113 (44)
	meio 2	18**	122 (120)

* contável somente até dia 7

**contável somente no dia 0

No entanto, o meio 1 foi mais seletivo que o meio 2, sendo mais capaz de selecionar o crescimento do agente alvo em detrimento dos contaminantes, o que pode ser observado nas tabelas 2 e 3, pelo maior número de amostras de queijo em que houve sucesso de crescimento do *M. bovis*, mesmo que excessivo, ou seja incontável. O uso do suplemento comercial PANTA™ citado por Rowe e Donaghy (2008) e já utilizado em estudos anteriores (PFYFFER; WELSCHER; KISSLING, 1997; HARRIS; PAYEUR; BRAVO, 2007; SOTO et al., 2009), mostrou-se superior à mistura de antibióticos proposta, o que sugere que a ausência da Azlocilina pode comprometer a eficiência antimicrobiana. Nota-se na tabela 3, que as contagens excederam o limite superior da técnica aos 21 dias de enriquecimento seletivo no leite. No queijo isso ocorreu a partir do dia 14, no meio 1 e a partir já do dia 7 no meio 2.

Algumas amostras tiveram crescimento de contaminantes já no caldo de enriquecimento e nem foram semeadas no meio sólido (Foto 2).

Foto 2 – Tubo 50 ml com meio MGIT após incubação e com contaminação – São Paulo – 2013

Fonte: Camila Noia Agunso (2013)

Em estudo realizado para pesquisa de micobactérias em amostras clínicas de animal os meios MGIT™, MB Redox, Löwenstein-Jensen (LJ) e Middlebrook 7H11 foram comparados quanto ao tempo de detecção das micobactérias e observados através da turbidez e fluorescência emitida. Entre os meios líquidos MGIT e MB Redox não houve diferença significativa (7,2 e 6,9 dias, respectivamente) no tempo para detecção; no entanto, comparados aos meios sólidos a diferença foi grande, com valores de 20,4 dias em meio LJ e 17,6 dias em meio Middlebrook 7H11, (SOMOSKÖVI; MAGYAR, 1999).

Em estudo mais recente para a pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* em amostras clínicas animais, o meio líquido MGIT™ foi comparado ao meio sólido Ogawa. Enquanto no meio líquido (adicionado de um indicador fluorescente sensível ao oxigênio, lido sob luz ultra violeta com comprimento de onda de 365nm) a média no tempo foi de 12,18 dias e no meio sólido foi de 25,74 dias (SOTO et al., 2009).

Para pesquisa de *Mycobacterium bovis* em queijo fresco originário do México, o meio líquido MGIT™, suplementado com PANTA™, foi utilizado com sucesso para a detecção do agente através do acompanhamento da turvação do meio, e confirmada por técnica molecular (HARRIS; PAYEUR; BRAVO, 2007).

Não foram encontrados na literatura trabalhos que tenham sido usados meios de cultura líquidos como proposta de enriquecimento ou enriquecimento seletivo para pesquisa de micobactérias em matriz alimentar para que pudessem ser

comparados a esses resultados. De acordo com Rowe e Donaghy (2008), o meio MGIT™ representa uma alternativa para ser usado em paralelo com meios sólidos para detecção de *M. bovis* em amostras clínicas, veterinárias, de alimentos e ambientais.

Sugere-se outros estudos com meio 1, trocando o glicerol por piruvato de sódio, realizar as análises diariamente na primeira semana, para identificar um meio que possa ser usado como enriquecimento seletivo em matriz láctea, identificar os microrganismos contaminantes e verificar a resistência aos antibióticos para propor eventual alteração de formulação.

Entre os meios líquidos disponíveis para testes dessa natureza, o meio Dubos é pouco difundido e parece ser uma alternativa para o cultivo de micobactérias. Várias formulações desse meio foram feitas e ingredientes como o ácido oléico e a albumina estão presentes (DUBOS; MIDDLEBROOK, 1947). O ácido oléico pode ser utilizado pelo bacilo da tuberculose e desempenha papel importante no metabolismo das micobactérias e a albumina protege o bacilo contra substâncias bactericidas e bacteriostáticas (COSTA; ULSON; POLAK, 1971). Propõe-se, portanto, testar este meio como enriquecimento para pesquisa de micobactérias em leite e derivados suplementado com antibióticos.

Sugere-se também, um estudo paralelo da AN5 com cepas de *M. bovis* circulantes no Brasil.

6 CONCLUSÕES

O meio MGIT modificado foi mais eficaz como enriquecimento para o *Mycobacterium bovis* que o meio MGIT™, mas foi menos seletivo.

Não foi possível quantificar o agente em amostras de queijo submetidas ao enriquecimento seletivo usando o meio 2, devido ao crescimento exacerbado de contaminantes.

Estudos futuros devem concentrar a investigação da curva de crescimento do agente na primeira semana de enriquecimento.

REFERÊNCIAS

- AMBROSIO, S. R.; OLIVEIRA, E. M. D. D.; RODRIGUEZ, C. A. R.; FERREIRA NETO, JOSÉ SOARES; AMAKU, M. Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 241-244, 2008.
- AYELE, W. Y.; NEILL, S. D.; ZINSSTAG, J.; WEISS, M. G.; PAVLIK, I. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. **The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 8, n. 8, p. 924-937, 2004.
- BELCHIOR, A. **Prevalência, distribuição regional e fatores de risco da tuberculose bovina em Minas Gerais**. 2000. 55 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.
- BIER, O. Micobactérias. In:BIER, O. Bacteriologia e imunologia. 19. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1978. p. 585-610.
- CAVANAGH, P.; KEYES, A. B. The use of pyruvate-containing EGG medium in the isolation of sudanese strains of tubercle bacilli. **Tubercle**, v. 49, n. 3, p. 325-327, 1968.
- CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Tuberculosis**. Bacteriologia de la tuberculosis: el cultivo del *Mycobacterium tuberculosis*. Buenos Aires: CPZ, 1985. (Nota técnica, n. 27).
- CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. *Situación de la tuberculosis bovina en América Latina y el Caribe*. Buenos Aires, 1988. (Publicación Especial, 8).
- COLLINS, C. H.; GRANGE, J. M. The bovine tubercle bacillus. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 55, p. 13-29, 1983.
- 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, p. 162-171, 2012.
- CORNER, A.; TRAJSTMAN, A. C. An Evaluation of 1-Hexadecylpyridinium Chloride as a Decontaminant in the Primary Isolation of *Mycobacterium bovis* from Bovine Lesions. **Veterinary Microbiology**, v. 18, p. 127-134, 1988.
- CORNER, L. A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary microbiology**, v. 40, n. 1/2, p. 53-63, 1994.
- CORNER, L. A.; NICOLACOPOULOS, C. Comparison of media used for the primary isolation of *Mycobacterium bovis* by veterinary and medical diagnostic laboratories. **Australian veterinary journal**, v. 65, n. 7, p. 202-5, 1988.

COSIVI, O.; MESLIN, F. X.; DABORN, C. J.; GRANGE, J. M. Epidemiology of Mycobacterium bovis infection in animals and humans, with particular reference to Africa. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 14, n. 3, p. 733-46, 1995.

COSTA, A. C. T., ULSON, C. M., POLAK, M. Pesquisa de micobactérias no líquido ascítico pela cultura em meio líquido de Dubos. **Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v. 13, p. 433-436, 1971.

COUSINS, D. V.; DAWSON, D. J. Tuberculosis due to Mycobacterium bovis in the Australian population: cases recorded during 1970-1994. **The International Journal of Tuberculosis And lung Disease : The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 3, n. 8, p. 715-21, 1999.

DUBOS, R. J, MIDDLEBROOK, G. Media for tubercle bacilli. **American Research Tubercle Disease**, v. 56, p. 334-345, 1947.

EMBRAPA. **Leite Inspeccionado no Brasil. 2000-2011**. 2012. Disponível em: <<http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0231.php>>. Acesso em: 1 out. 2012.

FOOD SAFETY.. **Zoonotic tuberculosis and food safety**. 2nd ed. Dublin: Food Safety, 2008.

GRANGE, J. M.; YATES, M. D. Zoonotic aspects of Mycobacterium bovis infection. **Veterinary microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 137-51, 1994.

HARDIE, R. M.; WATSON, J. M. Mycobacterium bovis in England and Wales: past, present and future. **Epidemiology and infection**, v. 109, n. 1, p. 23-33, ago1992.

HARRIS, N. B.; PAYEUR, J.; BRAVO, D.; OSORIO, R.; STUBER, T. Recovery of Mycobacterium bovis from soft fresh cheese originating in Mexico. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 3, p. 1025-1058, fev2007.

KAHLA, I. B.; BOSCHIROLI, M. L.; SOUISSI, F.; CHERIF, N.; BENZARTI, M. Isolation and molecular characterisation of Mycobacterium bovis from raw milk in Tunisia. **African health sciences**, v. 11, p. S2-5, 2011. Suplement, 1.

KANTOR, I. N. DE; RITACCO, V. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. **Veterinary Microbiology**, v. 112, n. 2/4, p. 111-8, 2006.

KAO, R. R.; GRAVENOR, M. B.; CHARLESTON, B. Mycobacterium bovis shedding patterns from experimentally infected calves and the effect of concurrent infection with bovine viral diarrhoea virus. **Journal of the Royal Society**, v. 4, n. 14, p. 545-51, 2007.

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

KEATING, L. A.; WHEELER, P. R.; MANSOOR, H. The pyruvate requirement of some members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is due to an inactive pyruvate kinase: implications for in vivo growth. **Molecular microbiology**, v. 56, n. 1, p. 163-74, 2005.

KINDE, H.; MIKOLON, A.; RODRIGUEZ-LAINZ, A. Recovery of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and *Mycobacterium bovis* from cheese entering the United States through a noncommercial land port of entry. **Journal of food protection**, v. 70, n. 1, p. 47-52, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Organização de Vera Cecília Ferreira de Figueiredo, José Ricardo Lôbo, Vitor Salvador Picão Gonçalves.** Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006. 184 p.

LEITE, C. Q. F.; ANNO, I. S.; LEITE, S. R. de A.; ROXO, E.; MORLOCK, G. P.; COOKSEY, R. C. Isolation and Identification of *Mycobacteria* from Livestock Specimens and Milk Obtained in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 319-323, 2003.

LOBUE, P. A.; ENARSON, D. A.; THOEN, C. O. Tuberculosis in humans and animals: an overview. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease : the Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 14, n. 9, p. 1075-8, 2010.

MAJOOR, C. J.; MAGIS-ESCURRA, C.; INGEN, J. VAN; BOEREE, M. J.; VAN SOOLINGEN, D. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in humans, The Netherlands, 1993-2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 457-63, 2011.

MALORNY, B.; TASSIOS, P. T.; RÅDSTRÖM, P. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 1, p. 39-48, 25 2003.

MARCONDES, A. G.; SHIKAMA, M. L. M.; VASCONCELLOS, S. A. Comparação entre a técnica de cultivo em camada delgada de ágar Middlebrook 7H11 e meio de Stonebrink para isolamento de *Mycobacterium Bovis* em amostras de campo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and animal Science**, v. 43, n. 3, p. 362-369, 2006.

MARIN, V. A.; LEMOS, A. A. DE; FREITAS, E. I. Detecção de patógenos presentes em alimentos: a falta de padronização e validação de métodos moleculares no Brasil. **Revista Higiene Alimentar**, v. 20, n. 145, p. 46-50, 2006.

MEJIA, G. I.; CASTRILLON, L.; TRUJILLO, H.; ROBLEDO, J. A. Microcolony detection in 7H11 thin layer culture is an alternative for rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease : the Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease** v. 3, n. 2, p. 138-42, 1999.

MESSELHÄUSSER, U.; KÄMPF, P.; HÖRMANSDORFER, S. Culture and molecular method for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and dairy products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 295-7, 2012.

MICHEL, A. L.; MÜLLER, B.; HELDEN, P. D. VAN. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: a problem, or not? **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3/4, p. 371-381, 2010.

MODA, G.; DABORN, C. J.; GRANGE, J. M.; COSIVI, O. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. **Tubercle and Lung Disease: the Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 77, n. 2, p. 103-8, abr 1996.

OIE. **Need more information ? Bovine Tuberculosis Key Facts General Disease Information Sheets General Disease Information Sheets Bovine Tuberculosis General Disease**. 2009. Disponível em: <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/disease-information-summaries/>>. Acesso em 03 set 2012.

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

OPLUSTIL, C. P.; TEIXEIRA, S. R.; OSUGUI, S. K.; MENDES, C. F. Impacto da automação no diagnóstico de infecções por micobactérias. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 3, p. 167-173, 2002.

PARDO, R. B.; LANGONI, H.; MENDONÇA, L. J. P.; CHI, K. D. Isolation of *Mycobacterium* spp. in milk from cows suspected or positive to tuberculosis. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 284-287, 2001.

PFYFFER, G. E. Amplification techniques: hope or ilusion in the direct detection of tuberculosis? **Medical Microbiology**, v. 3, p. 335-347, 1994.

PFYFFER, G. E.; WELSCHER, H. M.; KISSLING, P. Comparison of the *Mycobacteria* Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 364-8, 1997.

QAMAR, M. F.; AZHAR, T. Detection of mycobacterium from bovine milk in lahore, pakistan. Research Report. **Science International, (Lahore)**, v. 25, n. 2, p. 353-357, 2013.

ROWE, M. T.; DONAGHY, J. *Mycobacterium bovis* : the importance of milk and dairy products as a cause of human tuberculosis in the UK. A review of taxonomy and culture methods, with particular reference to artisanal cheeses. **International Journal of Dairy Technology**, v. 61, n. 4, p. 317-326, 2008.

SOBRAL, L. F.; DUARTE, R. S.; VIEIRA, G. B. O. Identificação de *Mycobacterium bovis* em cepas micobacterianas isoladas espécimes clínicos humanos em um complexo hospitalar na cidade do Rio de Janeiro. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 37, n. 5, p. 664-668, 2011.

SOINI, H.; MUSSER, J. M. Molecular diagnosis of mycobacteria. **Clinical Chemistry**, v. 47, n. 5, p. 809-814, 2001.

SOMOSKÖVI, A.; MAGYAR, P. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube with MB Redox , Löwenstein-Jensen and Middlebrook 7H11 media for Recovery of Mycobacteria in Clinical Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1366-1369, 1999.

SOTO, A.; AGAPITO, J.; ACUÑA-VILLAORDUÑA, C. Evaluation of the performance of two liquid-phase culture media for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in a national hospital in Lima, Peru. **International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 40-45, 2009.

TENGURIA, R. K.; KHAN, F. N.; QUERESHI, S.; PANDEY, A. Review article: epidemiological study of zoonotic tuberculosis complex (ZTBC). **World Journal of Science and Technology**, v. 1, n. 3, p. 31-56, 2011.

THOEN, C.; LOBUE, P.; KANTOR, I. DE. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. **Veterinary Microbiology**, v. 112, n. 2/4, p. 339-45, 2006.

UNE, Y.; MORI, T. Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, n. 5-6, p. 415-25, 2007.

VAN SOOLINGEN, D.; HOOGENBOEZEM, T.; HAAS, P. E.; A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 1236-45, 1997.

WAYNE, L. G.; KUBICA, G. The mycobacteria. In: SNEATH, P. H.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual os systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. p. 1435-1457.