

TATIANA REIS DO ROSÁRIO

Associação da técnica de cultivo em camada delgada contendo ágar  
Middlebrook 7H11 modificado com a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)  
para identificação precoce de *Mycobacterium bovis* em órgãos de bovinos e  
bubalinos oriundos de abatedouros comerciais

São Paulo

2010

TATIANA REIS DO ROSÁRIO

**Associação da técnica de cultivo em camada delgada contendo ágar Middlebrook 7H11 Modificado com a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para identificação precoce de *Mycobacterium bovis* em órgãos de bovinos e bubalinos oriundos de abatedouros comerciais**

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

**Departamento:**

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

**Área de Concentração:**

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

**Orientador:**

Prof. Dr. Nilson Roberti Benites

São Paulo

2010

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.2315  
FMVZ

Rosário, Tatiana Reis do

Associação da técnica de cultivo em camada delgada contendo ágar Middlebrook 7H11 modificado com a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para identificação precoce de *Mycobacterium bovis* em órgãos de bovinos e bubalinos oriundos de abatedouros comerciais/ Tatiana Reis do Rosário. -- 2010.

88 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Roberti Benites.

1. Tuberculose. 2. *Mycobacterium bovis*. 3. Camada delgada. 4. Reação em cadeia de polimerase. 5. Órgãos bovinos e bubalinos. I. Título.



*Comissão de Ética no uso de animais*

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto intitulado "Comparação do isolamento de *Mycobacterium bovis* em meio de camada delgada de Ágar Middlebrook 7H11 modificado com os meios de cultivo tradicionais Stönebrink-Lesslie e Petragnani", utilizando 30 amostras de órgãos de bovinos e bubalinos oriundos de matadouros comerciais, protocolado sob o nº 1759/2009, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, 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 26/05/2010.

We certify that the Research "Comparison of *Mycobacterium bovis* isolation into modified thin layer Middlebrook 7H11 Agar to the traditional Stönebrink-Lesslie and Petragnani culture techniques isolation", protocol number 1759/2009, under the responsibility Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, 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 05/26/2010.

São Paulo, 27 de maio de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni  
Presidente

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ROSÁRIO, Tatiana Reis do

Título: Associação da técnica de cultivo em camada delgada contendo ágar Middlebrook 7H11 Modificado com a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para identificação precoce de *Mycobacterium bovis* em órgãos de bovinos e bubalinos oriundos de abatedouros comerciais

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 a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/2010

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

*"All I really need to know about how to live and what to do and how to be, I learned in kindergarten. **Wisdom was not at the top of the graduate school mountain, but there in the sand pile at school.** These are the things I learned:*

- Share everything.
- Play fair.
- Don't hit people.
- Put things back where you found them.
- Clean up your own mess.
- Don't take things that aren't yours.
- Say you're sorry when you hurt somebody.
- Wash your hands before you eat.
- Flush.
- Warm cookies and cold milk are good for you.
- Live a balanced life: learn some and think some and draw and paint and sing and dance and play and work every day some.
- Take a nap every afternoon.
- When you go out in the world, watch out for traffic, hold hands and stick together.
- Be aware of wonder. Remember the little seed in the Styrofoam cup: the roots go down and the plant goes up and nobody really knows how or why, but we are all like that.
- Goldfish and hamsters and white mice and even the little seed in the Styrofoam cup - they all die. So do we.
- And then remember the Dick-and-Jane books and the first word you learned - the biggest word of all - LOOK.

*Everything you need to know is in there somewhere. The Golden Rule and love and basic sanitation. Ecology and politics and equality and sane living.*

*Take any one of those items and extrapolate it into sophisticated adult terms and apply it to your family life or your work or government or your world and it holds true and clear and firm. Think what a better world it would be if we all - the whole world - had cookies and milk at about 3 o'clock in the afternoon and then lay down with our blankies for a nap. Or if all governments had as a basic policy to always put things back where they found them and to clean up their own mess.*

*And it is still true, no matter how old you are, when you go out in the world, it is best to hold hands and stick together."*

**("ALL I REALLY NEED TO KNOW I LEARNED IN KINDERGARTEN": por Robert Fulghum]**

**DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais, Norberto e Norma, cujo amor incondicional, apoio e obstinação tornaram possível que eu chegasse, academicamente, onde eles jamais sonharam para si próprios.*

*À irmã e melhor amiga, Luciana, e ao cunhado e “irmão” Luís Henrique.*

*Aos sobrinhos, Felipe e Rafael, e à afilhada Isabella, crianças amadas que alegam imensamente minha vida.*

*Ao Robson, de novo e eternamente o meu Grande Amor.*

*Aos tios e padrinhos Jorge Michel Dib (“in memoriam”) e Merjur Dib, com todo meu afeto e admiração.*

*e*

*Ao pequenino Lucas, que tanto me ensinou, silenciosa e brevemente.*



**AGRADECIMENTOS**

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Nilson Roberti Benites**, por aceitar-me como orientada após tantos anos afastada da FMVZ-USP, pela orientação, boas conversas sobre assuntos diversos e pelo auxílio à análise estatística deste trabalho. Obrigada por todo o aprendizado nestes 4 anos de convivência.

À Prof<sup>a</sup> Dra. **Sônia Regina Pinheiro**, pela generosidade ao tomar para si este trabalho, cedendo o Laboratório de Zoonoses Bacterianas como local de processamento e cultivo das amostras, pelo acompanhamento de todo experimento e imensa colaboração na correção desta Tese. Obrigada por ser uma estrela guia nesta minha jornada, e por todas as “chibatadas”!

À Dra. **Eliana Roxo**, pela cessão das amostras estudadas, mas principalmente pela generosidade em auxiliar-me neste trabalho, abrindo as portas do Laboratório de Tuberculose do Instituto Biológico para que grande parte do experimento fosse executada, sempre sob sua supervisão, orientação e experiência, e também pelo carinho, amizade, apoio e pela ajuda na correção desta Tese. Obrigada por me guiar pelos caminhos do “mundo da tuberculose”, até então pouco conhecido por mim!

Estendo o agradecimento ao **Laboratório de Tuberculose do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico** (São Paulo-SP), por acolher-me em suas dependências para a execução deste trabalho.

À Médica Veterinária **Cristina Corsi Dib**, do Instituto Biológico e colega de Pós-Graduação no VPS, a qual simplesmente deu-me a mão para que executasse toda a parte experimental, auxiliando desde o processamento das amostras e observação das colônias até a execução da PCR, muitas vezes aos finais de semana. Palavras não podem expressar meu agradecimento pela sua generosidade e dedicação para comigo e com este trabalho, e pela amizade que surgiu entre nós.

À **Zenaide Maria de Moraes, Amane Paldes Gonçalves, Flavia Morato e Cássia Yumi Ikuta**, que me auxiliaram desde o levantamento de custos até a elaboração dos meios de cultura e processamento das amostras no laboratório. Sem a ajuda de vocês este trabalho não teria acontecido, ou teria sido muito mais árduo.

À Dra. **Priscilla Anne Melville**, pelo carinho e preocupação sempre demonstrados ao longo deste trabalho, mas principalmente pelo apoio nos momentos pessoais difíceis. Nunca me esquecerei do “Isso também passa...”.

Ao **Juracy de Souza Neto**, Médico Veterinário do frigorífico Cowpig, pela cessão dos órgãos utilizados como controle negativo neste trabalho, e à Médica Veterinária **Alessandra Figueiredo de Castro Nassar**, do Instituto Biológico, pela indicação do frigorífico e transporte de parte das amostras.

À **CAPES**, pela concessão da bolsa de Doutorado (cota da Pró-Reitoria – demanda social) e pelo financiamento de parte deste trabalho através do Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP). Estendo o agradecimento ao Prof. Dr. **Silvio Arruda Vasconcelos**, que muito auxiliou a todos nós na obtenção destes recursos.

Ao Prof. Dr. **Leonardo José Richtzenhain**, pelo auxílio na interpretação dos dados e na estatística.

Ao Prof. Dr. **Aleksandrs Spers**, por ter plantado, há muitos anos, a sementinha da pesquisa em meu coração: “*To sir, with Love*”.

À equipe de bibliotecárias da FMVZ-USP, por todo o auxílio prestado.

Aos funcionários do VPS: **Gisele, Sheila, Cristina, Virgínia, Danival, Renato, Carol e Bispo**, cada um ajudando em pequenas ou grandes tarefas que tornaram possível a conclusão do meu Doutorado, e pelo ótimo convívio.

Às Dras. **Danielle Herszenhorn** e **Cynthia Guidoni Christovam**, pelo imensurável suporte profissional e emocional fornecido para que eu concluísse este trabalho. Sem vocês eu simplesmente não teria conseguido concluir esta trajetória.

À minha família: **Norberto, Norma, Luciana, Luis Henrique, Felipe e Rafael**, por todo o apoio em todos os níveis e por simplesmente existirem na minha vida.

Ao **Rob**, pela admiração que sempre demonstrou por tudo o que faço, pelo imenso amor que nos une e pela impressão desta Tese.

Às queridas **Débora Tieko Parlato Sakyama** e **Leslie Ávila do Brasil Almeida**, amigas desta e de outras vidas, presentes em todos os momentos dentro e fora da USP. Vocês são luzes em minha vida, contem eternamente comigo.

Aos queridos amigos **Carlos Augusto Scacchetti de Almeida** e **Nilton Fidalgo Peres**, pela amizade e pelas longas conversas, sobre “de tudo um pouco” neste mundo.

Aos queridos amigos **Fabício César Bastos** e **Fernanda Spagnuolo**, pela amizade, incentivo e por todo carinho e admiração sempre demonstrados.

Aos amigos da VET 60 **Tássia, Eva, Nissin, Lara, Ba, Shih, Tango, Si, Annê, Teco, Ca, Jiban, Lu Sender, Pê e Cris** (saber que vocês existem é como voltar pra casa!), e também a **Angela, Ursula, Marilda, Tati, Sabrina, Milena, Re Fachinelli, Flávia, Dani, Beto, Denise, Augusta, Dri Cubas, Hélio, Carlinhos, Cris, Kaká, Dani Gazetti** e **Claudinho**, por serem amigos sempre presentes, de uma forma ou de outra.

Aos colegas da Pós-Graduação **Miguel, Carol Américo, Iara, Thaisa, Gisele, Vanessa, Guacy, Andreas, Cideli e Anna Catharina**, pelo ótimo convívio que tivemos.

Por fim, às “tuberculetes” **Jamili e Elied**, pelo carinho e auxílio, e à nossa padroeira “Nossa Senhora da Tuberculose Bovina”, que tanto nos tem ajudado!

## RESUMO

ROSÁRIO, T. R. **Associação da técnica de cultivo em camada delgada contendo ágar Middlebrook 7H11 modificado com a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para identificação precoce de *Mycobacterium bovis* em órgãos de bovinos e bubalinos oriundos de abatedouros comerciais.** [Association between the modified Middlebrook 7H11 agar thin layer cultivation technique with the Polymerase Chain Reaction (PCR) on the earlier identification of *Mycobacterium bovis* in bovine and buffalo organs deriving from commercial slaughterhouses]. 2010. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A técnica de cultivo em camada delgada contendo ágar Middlebrook 7H11 modificado foi comparada com o cultivo padrão em meio de Stonebrink, visando avaliar a sensibilidade e o tempo de detecção de *Mycobacterium bovis* em órgãos de bovinos e bubalinos oriundos de abatedouros comerciais. Posteriormente, a PCR foi utilizada para a confirmação do crescimento observado nos cultivos, bem como a coloração de Ziehl-Neelsen na pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes. As 49 amostras testadas foram descontaminadas pelo método tradicional de Petroff e trabalhadas em duas etapas. Na primeira, todas foram semeadas nas placas contendo o meio de Middlebrook 7H11 em camada delgada e nos tubos contendo o meio de Stonebrink, e as colônias observadas macroscopicamente em ambos os meios foram submetidas à PCR. Na segunda, 10 amostras cultivadas na primeira etapa foram submetidas a novo cultivo, somente em camada delgada, para observação do crescimento microscópico das colônias e também analisadas pela PCR. Os resultados obtidos demonstraram que: 1) a técnica de cultivo de *Mycobacterium bovis* em camada delgada no meio de Middlebrook 7H11 modificado em amostras de órgãos de bovinos e bubalinos mostrou-se viável quando comparada ao cultivo clássico no meio de Stonebrink, reduzindo o tempo de isolamento e podendo ser utilizada de forma complementar aos métodos tradicionais de diagnóstico da tuberculose bovina; 2) foi possível a identificação precoce do crescimento das micobactérias em camada delgada (entre 12º e 25º dia de crescimento) quando comparadas ao Stonebrink; 3) a PCR mostrou-se uma ferramenta complementar à somatória das técnicas de descontaminação de Petroff, coloração de Ziehl-Neelsen e cultivo em camada delgada na confirmação do diagnóstico de presença

de micobactérias em amostras de órgãos de bovinos e bubalinos.

*Palavras-chave:* Tuberculose. *Mycobacterium bovis*. Camada delgada. Reação em Cadeia de Polimerase. Órgãos bovinos e bubalinos.

## ABSTRACT

ROSÁRIO, T. R. **Association between the modified Middlebrook 7H11 agar thin layer cultivation technique with the Polymerase Chain Reaction (PCR) on the earlier identification of *Mycobacterium bovis* in bovine and buffalo organs deriving from commercial slaughterhouses.** [Associação da técnica de cultivo em camada delgada contendo ágar Middlebrook 7H11 modificado com a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para identificação precoce de *Mycobacterium bovis* em órgãos de bovinos e bubalinos oriundos de abatedouros comerciais]. 2010. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The modified thin layer Middlebrook 7H11 cultivation was compared to the standard culture technique containing Stonebrink media, in order to evaluate the sensitivity and time for the detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and buffalo organs deriving from commercial slaughterhouses. The PCR was applied for confirmation of the growth observed in the cultures, as well as the Ziehl-Neelsen color technique in order to detect acid-fast bacilli. 49 samples were submitted to the classic Petroff's decontamination method, and worked in two stages. In the first one, all of them were sowed in plates containing modified Middlebrook 7H11 agar in thin layer and in tubes containing the Stonebrink media, and the colonies observed macroscopically in both medias were submitted to the PCR. In the second stage, 10 samples from the first stage were submitted to a new culture, only in thin layer, for microscopical growth observation of the colonies and also submitted to the PCR. The results showed that: 1) *Mycobacterium bovis* cultivation in modified thin layer Middlebrook 7H11 for bovine and buffalo samples were viable when compared to the classic culture in Stonebrink, reducing the time of isolation, and can be applied as a complement to the traditional bovine tuberculosis diagnosis methods; 2) earlier identification of mycobacteria growth was found in thin layer (between 12<sup>nd</sup> and 25<sup>th</sup> day of growth) when compared to the Stonebrink; 3) PCR technique showed to be a complementary tool to the sum of techniques including Petroff decontamination, Ziehl-Neelsen color and thin layer cultivation for the diagnosis confirmation of the presence of mycobacteria in bovine and buffalo organs samples .

**Key-words:** Tuberculosis. *Mycobacterium bovis*. Thin layer cultivation. Polymerase

Chain Reaction. Bovine and buffalo organs.



## LISTA DE FIGURAS

**Pág.**

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 – Suspeita de surgimento de colônia após 5 dias de cultivo em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado. Aumento de 100x.....             | 59 |
| Figura 2 – Colônias com 8 dias de cultivo em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado. Aumento de 100x.....                                       | 60 |
| Figura 3 – Colônia com 12 dias de cultivo em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado. Aumento de 100x.....                                       | 60 |
| Figura 4 - Colônia com 15 dias de cultivo em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado. Aumento de 100x.....                                       | 61 |
| Figura 5 – Colônia com 15 dias de cultivo em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado. Aumento de 40x.....  | 61 |
| Figura 6 – Colônia com 21 dias de cultivo em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado. Aumento de 40x.....  | 62 |
| Figura 7 – Colônia com 25 dias de cultivo em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado. Aumento de 40x.....  | 62 |
| Figura 8 – Debris celulares de amostra controle negativo aos 29 dias de cultivo em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado. Aumento de 100x..... | 63 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 9 – Placa de petri contendo colônias aos 37 dias pós-semeadura.....  | 63 |
| Figura 10 – Reação de PCR para amplificação do DNA de micobactérias isoladas em meio de Middlebrook 7H11 modificado em camada delgada, evidenciando bandas de aproximadamente 500 pb. M) marcador de peso molecular de 100 pb, 1) Amostra 12, 2) Amostra 16, 3) Amostra 16B, 4) Amostra 32, 5) Amostra 34, 6) Amostra 36, 7) Amostra 37, 8) Amostra 39, 9) Amostra 44, 10) Amostra 48, 11) Amostra 40, 12) Amostra Negativa 01, 13) Amostra Negativa 02, 14) Controle Negativo água ultra-pura, 15) Controle Positivo <i>M. bovis</i> AN5. Gel de agarose corado com brometo de etídio..... | 64 |
| Figura 11 – Coloração de Ziehl-Neelsen evidenciando microorganismos álcool-ácido resistentes. Aumento 400 x.....  | 66 |
| Figura 12 – Reação de PCR para amplificação do DNA de micobactérias isoladas em meio de Middlebrook 7H11 modificado em camada delgada, evidenciando bandas de aproximadamente 500 pb. M) marcador de peso molecular de 100 pb, 1) Amostra 12-1, 2) Amostra 12-2, 3) Amostra 16-1, 4) Amostra 16-2, 5) Amostra 32-1, 6) Amostra 32-2, 7) Amostra 34-1, 8) Amostra 34-2, 9) Amostra 36-1, 10) Amostra 36-2, 11) Controle Negativo água ultra-pura, 12) Controle Positivo <i>M. bovis</i> AN5. Gel de agarose corado com brometo de etídio.....  | 68 |
| Figura 13 – Colônia de micobactéria com 8 dias de cultivo em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 Modificado. Aumento de 100x.....  | 70 |
| Figura 14 – Colônia de micobactéria com 12 dias de cultivo em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 Modificado. Aumento de 100x.....   | 70 |

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 – Crescimento de colônias nas placas contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado em camada delgada e nos tubos de Stonebrink, com respectivo resultado da PCR, segundo os grupos experimentais. São Paulo – 2010.....53
- Quadro 2 – Crescimento de colônias das amostras consideradas positivas, segundo o método de cultivo adotado e o momento da leitura. São Paulo - 2010.....56
- Quadro 3 – Resultados da observação por microscopia óptica da positividade das amostras semeadas em placas contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado em camada delgada e confirmadas pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). São Paulo – 2010.....67
- Quadro 4 - Proporções de crescimento de micobactérias das amostras consideradas positivas (PCR e placa) sob visualização em microscopia óptica, segundo o momento da leitura. São Paulo – 2010.....69

## LISTA DE TABELA

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 – Resultados do desempenho do cultivo em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado comparado com o Stonebrink (padrão ouro). São Paulo – 2010..... | 54 |
|---|----|

## SUMÁRIO

|  | Pág.      |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....</b>               | <b>23</b> |
| 1.1 HISTÓRICO.....   | 23        |
| 1.2 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA.....                             | 25        |
| 1.3 DOENÇA NOS BOVINOS E BUBALINOS. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA..... | 28        |
| 1.4 DOENÇA NO HOMEM. A TUBERCULOSE COMO ZOONOSE.....           | 31        |
| 1.5 DIAGNÓSTICO. MEIOS DE CULTIVO E PCR.....                   | 34        |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>  | <b>42</b> |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                               | <b>44</b> |
| 3.1 AMOSTRAS.....  | 44        |
| 3.2 MEIOS DE CULTURA.....                                      | 45        |
| 3.3 TÉCNICAS UTILIZADAS.....                                   | 45        |
| 3.3.1 Método de Coloração de Ziehl-Neelsen.....                | 45        |
| 3.3.2 Descontaminação.....                                     | 46        |
| 3.3.3 Leitura das colônias isoladas nas placas.....            | 46        |
| 3.3.4 Leitura das colônias isoladas nos tubos.....             | 47        |
| 3.3.5 Identificação molecular das micobactérias.....           | 47        |
| 3.3.5.1 Extração do material genético.....                     | 47        |
| 3.3.5.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....              | 48        |
| 3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....                             | 48        |

|          |                                     |    |
|----------|-------------------------------------|----|
| 3.4.1    | <b>Primeira Etapa</b> .....         | 48 |
| 3.4.2    | <b>Segunda Etapa</b> .....          | 50 |
| 3.5      | TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....         | 50 |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> ..... | 52 |
| 4.1      | PRIMEIRA ETAPA.....                 | 52 |
| 4.1      | SEGUNDA ETAPA.....                  | 67 |
| <b>5</b> | <b>CONCLUSÕES</b> .....             | 73 |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....            | 75 |
|          | <b>APÊNDICE</b> .....               | 84 |
|          | <b>ANEXOS</b> .....                 | 86 |



## 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 HISTÓRICO

A tuberculose é uma doença bacteriana crônica, que acomete os homens e os animais há milênios. Na Grécia Antiga, Hipócrates e Aristóteles descreveram a doença, bem como os Hindus mencionaram em seus escritos lesões pulmonares sugestivas de tuberculose. Os judeus antigos sacrificavam animais doentes e proibiam o consumo da carne bovina de animais que apresentassem tais lesões, sinalizando uma preocupação primitiva com o potencial zoonótico da doença (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

A confirmação de tais achados históricos, nos tempos modernos, foi efetuada por diversos pesquisadores, utilizando-se dos métodos diagnósticos disponíveis e da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para confirmação. Zink et al. (2003) encontraram *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) e *Mycobacterium africanum* em 25 de 83 amostras de tecidos moles e ossos de múmias datando entre 2050 e 500 anos A.C. Salo et al. (1994) isolaram e identificaram pela PCR *M. tuberculosis* de múmia peruana da Era Pré-Colombiana (cerca de 1.000 anos de idade), evidenciando a ocorrência de tuberculose também no Novo Mundo.

As descobertas científicas sobre a doença, contudo, foram proeminentes somente do século XIX em diante. Carmichael<sup>1</sup> (apud GRANGE, 2001, p. 71), em 1810, associou o consumo de leite bovino com a ocorrência da escrofulose, tuberculose nos linfonodos cervicais que gera uma linfadenopatia principalmente em crianças. Em 1868, Villemin<sup>2</sup> (1868 apud GRANGE, 2001, p. 71; ROXO, 1996) publicou uma série de

---

<sup>1</sup> CARMICHAEL, R. **Essay on the nature of scrofula with evidence of its origin from disorders of the digestive organs**. London: Callow, 1810.

<sup>2</sup> VILLEMIN, J. A. **Études Experimentales et Cliniques sur Tuberculose**. Paris; Bailliere et Fils, 1868.



investigações comprovando a transmissão, em coelhos, tanto da tuberculose bovina como da humana. Finalmente, em 24 de Março de 1882, Robert Koch realizou uma apresentação oral à Sociedade Fisiológica de Berlim (Alemanha), comunicando suas descobertas sobre o bacilo da tuberculose. Apenas três semanas depois, publicava “Sobre a Etiologia da Tuberculose” em um periódico de Berlim (KAUFMANN; WINAU, 2005). Estes achados científicos levaram aos primeiros movimentos pela eliminação da doença nos bovinos e no homem (GRANGE, 2001).

Inicialmente, pensava-se que os bacilos bovino e humano eram espécie-específicos, e o próprio Robert Koch afirmou que humanos eram tão resistentes à tuberculose bovina que não havia necessidade de se combater os riscos de infecção nos bovinos (Report: Transactions of the British Congress on Tuberculosis<sup>3</sup>, 1902 apud GRANGE, 2001, p. 72). Atendendo a apelos de veterinários, que não concordavam com as afirmações de Koch, a “British Royal Comission”, criada no início do século XX em Londres (Inglaterra), foi estabelecida pelo Governo Britânico para pesquisar o tema, e após 10 anos de trabalho seus pesquisadores concluíram que a população humana era, de fato, suscetível à tuberculose de origem bovina. A partir de então, estabeleceram as bases para as políticas de teste e eutanásia dos animais infectados, associados à campanha pela pasteurização do leite, visando à erradicação da doença (Report: Royal Comission on Tuberculosis<sup>4</sup> 1911 apud GRANGE, 2001, p. 72). Um dos resultados imediatos observados pela Comissão foi a queda na ocorrência de casos de escrofulose infantil.

No Brasil do início do século XX, após a divulgação das descobertas de Robert Koch e de suas repercussões pelo mundo, existia uma polêmica a respeito do potencial de transmissão da tuberculose pelo leite da vaca. No município de São Paulo, as discussões envolveram importantes médicos paulistanos e o serviço de saúde pública e de inspeção sanitária. Parte da classe médica julgava inócuo o consumo do leite de

---

<sup>3</sup> Report. **Transactions of the British Congress on Tuberculosis**, 1901. Vol. 1-3. London: Cowes, 1902.

<sup>4</sup> Report. **Royal Comission on Tuberculosis. Final Report**. London: HMSO, 1911.

vacas tuberculosas e, por conseqüência, desnecessário o emprego de tuberculina para o diagnóstico em rebanhos, com separação dos animais positivos e suspeitos. Alguns médicos eram também pecuaristas, o que podia reforçar o interesse em evitar a associação do consumo do leite à transmissão da tuberculose, atribuindo os casos humanos unicamente ao contato homem-homem. Somente após um extenso debate foram esclarecidos alguns aspectos sobre a transmissão da tuberculose bovina via leite, culminando em um novo entendimento sobre a importância do papel do controle sanitário e estabelecendo quatro conclusões, válidas à luz da ciência na época: 1) a tuberculina era a ferramenta capaz de reconhecer a tuberculose bovina; 2) não se podia afirmar que a tuberculose humana e animal eram idênticas; 3) os achados do “bacilo de Koch” no leite indicavam seu poder infectante, recomendando fervura antes do consumo, e 4) recomendava-se a segregação do gado tuberculoso (ANTUNES et al., 2002).

## 1.2 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA

Os agentes causadores da tuberculose em animais e no homem pertencem à Família *Mycobacteriaceae*, Gênero *Mycobacterium*. São bacilos curtos, aeróbicos, imóveis, não capsulados e não flagelados, apresentando aspecto granular quando corados, medindo de 0,5 a 0,7 µm de comprimento por 0,3 µm de largura, sendo a álcool-ácido resistência sua propriedade mais característica (CORRÊA; CORRÊA, 1992; TRABULSI, 1999).

O chamado Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, o qual engloba os agentes causais da tuberculose em humanos e várias espécies animais, é formado pelos membros *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* e *M. bovis* BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), considerados muito próximos entre si sob o ponto de vista taxonômico, o que permitiu o termo genérico que dá nome ao complexo (ARANAZ et al., 2003; ERLER et al., 2004). *M. tuberculosis* e *M. bovis*, particularmente, são

espécies fortemente relacionadas, com algumas diferenças bioquímicas, mas com homologia nucleotídica que alcança 99,95% (ABALOS; RETAMAL, 2004).

As diferenças entre elas correspondem a deleções ocorridas no genoma de *M. bovis* e a polimorfismos nucleotídicos únicos em genes que codificam para proteínas secretadas e de parede celular, sugerindo que a *M. bovis* evoluiu como espécie a partir de *M. tuberculosis* (ABALOS; RETAMAL, 2004). Estas características ampliaram o espectro de patogenicidade do *M. bovis* para várias espécies, incluindo ruminantes, aves e o homem, o qual pode contrair a doença destes animais e igualmente transmiti-lhes a infecção (ABRAHÃO; NOGUEIRA; MALUCELLI, 2005).

As principais medidas para o controle da tuberculose em bovinos residem na detecção acurada e remoção dos animais infectados com o *M. bovis*, o membro do Complexo *M. tuberculosis* responsável pela doença na espécie, que pode manter-se por longo período na forma subclínica, sem qualquer exibição de sinais clínicos ou lesões típicas. Mesmo se presentes, os sinais clínicos não são patognomônicos (RUA-DOMENECH et al., 2006), dificultando qualquer diagnóstico pelo simples exame físico do animal.

Os reservatórios da tuberculose são os animais domésticos doentes, mas também os animais silvestres, em algumas situações. As fontes de infecção mais comuns são água, alimento, comedouros, bebedouros e fômites contaminados. A participação do ambiente, portanto, deve ser considerada, uma vez que o microorganismo pode sobreviver de seis meses a quatro anos em pastos, aviários, material orgânico em putrefação (fezes e camas) e em locais onde se enterram carcaças de animais tuberculosos (BERR, 1998). Sendo a transmissão preferencialmente aerógena, os microorganismos são veiculados através do muco pulmonar e passados à água de bebida dos animais. Em 1984, Vera contaminou água corrente com uma suspensão bacteriana de *M. bovis* de  $10^9$  células/mL, encontrando sobrevivência de *M. bovis* até 237 dias no verão e até 295 dias no inverno, sugerindo que os bebedouros devem ser limpos e desinfetados com a maior frequência possível,

como parte de um programa de controle da tuberculose nos rebanhos.

Kantor e Ritacco (1994 e 2006) vêm avaliando há muitos anos os programas de prevalência e controle da tuberculose bovina em países da América Latina e Caribe. Em 1994, estimaram que, das aproximadamente 300 milhões de cabeças de gado alojadas nos países da América Latina e Caribe, 220 milhões encontravam-se em áreas de moderada a alta prevalência de infecção. Na Argentina e no Brasil, países com alta população bovina e prevalência estimada maior de 1%, estimava-se à época um total de 3,5 milhões de bovinos infectados. As informações acerca do impacto do *M. bovis* na saúde humana na Região, contudo, eram muito escassas e não incluíam dados de infecção em crianças. Na Argentina, estimava-se que a tuberculose humana de origem era mais relacionada à doença ocupacional, transmitida via aerossóis. Afirmaram também que o controle ou até mesmo a erradicação, em alguns países da Região, foram obtidos com tuberculinização e eutanásia dos reagentes, mas sugeriram, à época, métodos diagnósticos baseados na avaliação *in vitro* das respostas imune celular e humoral, como ferramenta complementar às campanhas de erradicação e controle promovidas na Região.

Em 2006, Kantor e Ritacco atualizaram seus dados de avaliação e apontaram que, dos cerca de 374 milhões de bovinos alojados na América Latina e Caribe àquele ano, 70% encontravam-se em áreas onde as taxas de infecção pelo *M. bovis* eram maiores que 1%. Verificaram que as medidas para controle da doença eram aplicadas parcial ou extensivamente na maioria dos países da Região estudada, baseadas em testes tuberculínicos, abate dos animais positivos, notificação, inspeção *post-mortem* e vigilância em abatedouros. Considerando dados da Argentina, estimaram que o *M. bovis* fosse responsável por 2% do total de casos humanos de tuberculose na Região, com maiores taxas de infecção dos trabalhadores de abatedouros e granjas leiteiras, ocorrendo principalmente via trato respiratório. Por fim, apontaram os métodos moleculares como ferramentas de suporte aos programas de erradicação e controle da tuberculose nos Países da América Latina e Caribe.

### 1.3 DOENÇA NOS BOVINOS E BUBALINOS. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A tuberculose bovina é causada por um patógeno intracelular, bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) da espécie *M. bovis*, resultando numa doença crônica que compromete o bem-estar e a produtividade dos animais, gerando prejuízos econômicos significativos em alguns países (NEILL et al., 1994; POLLOCK; WELSH; McNAIR, 2005). Caracteriza-se pelo desenvolvimento progressivo de granulomas nos órgãos, e raramente se torna aparente ou sintomática antes de atingir estágios muito avançados, de forma que em alguns animais o diagnóstico ocorre somente após o abate (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

Em bovinos e bubalinos, aproximadamente 90% das infecções pelo *M. bovis* ocorrem pela via respiratória por meio da inalação de aerossóis contaminados com o microorganismo, caracterizando a transmissão por esta via como a mais freqüente; contudo, a rota de transmissão oral é mais importante quando se considera bezerros que mamam em vacas tuberculosas. Uma vez infectados, já são capazes de transmitir a doença mesmo antes de desenvolver lesões nos órgãos e tecidos (NEILL et al., 1994). Portanto, a ocorrência de tuberculose faz da espécie bovina uma das principais fontes de infecção para humanos, considerando também que as micobactérias disseminam-se sistemicamente via circulação sanguínea e podem ser secretadas no leite de animais em lactação (BERR, 1998).

A resposta imune à infecção por *M. bovis* em bovinos é predominantemente mediada por células, notadamente pelos linfócitos T, ocorrendo posterior estimulação macrofágica que fagocita o bacilo (RITACCO et al., 1991; POLLOCK; WELSH; McNAIR, 2005). O processo infeccioso pulmonar culmina com a formação de granulomas, e os bacilos da lesão tuberculosa do parênquima pulmonar propagam-se ao linfonodo satélite, onde desencadeiam a formação de novo granuloma, constituindo, assim, o complexo primário (CORRÊA; CORRÊA, 1992; BERR, 1998). Os grandes nódulos são caseosos, às vezes calcificados, às vezes com fusão, apresentando-se como

abscessos de pus espesso. Essas formações encontram-se principalmente nos pulmões, linfonodos mediastínicos, serosas, fígado, linfonodos mesentéricos e com menor frequência no baço, rins, mama, linfonodos mamários e outros (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

Em razão do aumento de sua ocorrência nas populações bovina e humana, a doença é motivo de preocupação para os profissionais da saúde, sendo considerada uma zoonose de grande importância sócio-econômica (PINHEIRO, 2000). O tratamento dos bovinos com drogas como a isoniazida, embora testado e discutido no passado (LANGENEGGER; LANGENEGGER; OLIVEIRA, 1981; PINHEIRO, 2000), não é permitido por não eliminar todos os animais portadores do bacilo no rebanho, mantendo assim a fonte de infecção e perpetuando a doença (ROXO, 1996). Portanto, medidas efetivas de controle passam, necessariamente, pelo abate dos animais afetados (BRASIL, 2001), gerando consideráveis prejuízos à pecuária.

Por suas características, a tuberculose gera consequências econômicas graves quando animais doentes são introduzidos em um rebanho sadio. Pode-se observar queda no ganho de peso, maior intervalo entre partos, produção de crias debilitadas, diminuição na produção de leite e carne, maior taxa de reposição no rebanho, eliminação de animais de alto valor zootécnico, desvalorização comercial por rejeição de carcaças, morte de animais e perda de credibilidade e valor comercial da unidade de criação (BRASIL, 2001; ABRAHÃO; NOGUEIRA; MALUCELLI, 2005).

A enfermidade é considerada um dos principais entraves à criação de bovinos, possuindo grande significância nos rebanhos leiteiros, tanto pelo caráter zoonótico do consumo do leite cru como pelos efeitos negativos sobre a produção animal (BERR, 1998). Kantor e Ritacco (1994) relataram queda na produção de leite de vacas tuberculosas no rebanho argentino de até 18%, devido ao atraso da primeira lactação e da redução do número e duração das lactações, em comparação a animais saudáveis. Do ponto de vista zoonótico, embora a obrigatoriedade da pasteurização do leite no Brasil tenha se estabelecido nos anos 50 (BRANDÃO, 1994), estima-se que o consumo

e elaboração de queijos a partir de leite não tratado termicamente seja ainda comum em alguns lugares do Brasil e do mundo, o que pode aumentar o risco de infecção humana pelo *M. bovis*. (BRANDÃO, 1994; LEITE et al., 2003).

A frequência de infecção no gado leiteiro parece ser maior que nos bovinos de corte em virtude da criação intensiva mais freqüente, bem como de sua maior aglomeração ao encontrar-se para a ordenha. Quanto maior o contato entre os animais, maior a chance de transmissão da doença por via aerógena e compartilhamento de alimento e água (BERR, 1998). Baptista (1999) atribuiu achados de maior prevalência de tuberculose em bovinos da Região Sudeste, em diagnóstico *post mortem*, à maior aptidão leiteira característica, em comparação a rebanhos do Centro-Oeste, onde as criações de bovinos são extensivas.

O conceito de que bubalinos são naturalmente resistentes a várias doenças que acometem bovinos leva alguns criadores a associarem os búfalos à rusticidade, criando-os muitas vezes sem os cuidados sanitários adequados (LAU<sup>5</sup> 1990 apud LOPES et al., 2006, p. 188). Porém, estes animais são tão sensíveis à tuberculose quanto os bovinos (PORTUGAL<sup>6</sup> 1971 apud LOPES et al., 2006, p. 188). Na região Norte do Brasil, a exploração de búfalos sempre ocorreu de forma extensiva em grandes propriedades, porém há um grande adensamento de animais principalmente na época das chuvas, em consequência das enchentes que ocorrem na região, e também da intensificação da exploração leiteira para a espécie (LOPES et al., 2006).

Mota et al. (2002) encontraram alta frequência de animais positivos à prova tuberculínica no Norte do Brasil, com maior acometimento à necropsia de linfonodos do trato respiratório, sugerindo a via respiratória como mais importante que a via oral na transmissão da doença em búfalos, à semelhança do que ocorre nos bovinos.

---

<sup>5</sup> LAU, H. D. Common buffalo diseases in Amazonian Brazil. **Buffalo Bulletin**, v. 9, p.75-77, 1990.

<sup>6</sup> PORTUGAL, M. A. S. C.; GIORGI, W.; SIQUEIRA, P. A. Ocorrência de tuberculose em rebanho bubalino (*Bubalus bubalis*) var (*Bubalis Linneus*, 1758) no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 38, p. 231-238, 1971.

#### 1.4 DOENÇA NO HOMEM. A TUBERCULOSE COMO ZOONOSE

A tuberculose humana é considerada a principal causa de morte por um agente infeccioso isolado, sendo ainda um grave problema de saúde pública nos países em desenvolvimento (SNIDER; MONTAGNE, 1994; CAMPOS, 1999). Dawson<sup>7</sup> (1990 apud COUSINS et al., 1991, p. 255) apontou existirem 20 milhões de casos humanos com tuberculose clínica no mundo, com 5.000 pessoas morrendo diariamente pela doença. Em meados da década de 90, estimava-se que a doença atingia 1/3 da população mundial, com oito milhões de novos casos por ano (SUNDRE; DAM; KOCHI, 1992; COSIVI et al., 1998).

O impacto da doença sobre a população foi reduzido pelas melhorias nas condições de vida a partir de meados do século XIX, e tornou-se ainda menor pela obrigatoriedade na pasteurização do leite (O'REILLY; DABORN, 1995; ABRAHÃO; NOGUEIRA; MALUCELLI, 2005), maior rigor na inspeção sanitária de carcaças nos abatedouros, identificação de animais doentes ou positivos aos exames de tuberculinização e/ou primo-isolamento (COSIVI et al., 1998) e à implementação da quimioterapia na década de 1950 (CAMPOS, 1999). Em 1973, os médicos Roswurm e Ranney apontavam que colegas do meio médico e proprietários rurais dos Estados Unidos já consideravam a tuberculose uma doença rara, de importância apenas histórica e desconhecida da maioria dos cidadãos. Em 1974, Corrêa e Corrêa relataram casos de tuberculose por *M. bovis* em crianças. Dentre 200 estirpes isoladas de pacientes com diagnóstico clínico de TB, sete (3,5%) foram classificadas como *M. bovis*, sendo cinco delas isoladas de tuberculose pulmonar e duas de tuberculose renal.

A partir da década de 1980, com o maior relaxamento das autoridades no tocante ao controle da doença, a disseminação da infecção pelo vírus HIV (causador da

---

<sup>7</sup> DAWSON, D. J. Tuberculosis in Australia: an unfinished fight. **Med. J. Aust.**, V. 154, p. 75-76, 1990.



Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - AIDS), os níveis crescentes de pauperização, o uso de drogas e outros fatores que podem levar à imunossupressão, a tuberculose retorna como importante questão de saúde pública nos países desenvolvidos também da América do Norte e Europa (COSIVI et al., 1998; CAMPOS, 1999).

A AIDS, particularmente, possui papel significativo como agravante da história da tuberculose, uma vez que destrói o sistema celular de defesa (células T), principal arma imunológica do organismo contra o *M. tuberculosis* (ROSEMBERG, 2001). A manifestação da tuberculose está ligada à resposta imune individual do hospedeiro o que, na maioria dos casos, pode garantir uma coexistência com o bacilo, gerando uma infecção dormente que será ativada em condições imunossupressivas, causando o aparecimento de uma tuberculose ativa (RUGGIERO et al., 2007). Outras situações envolvem pacientes adultos de idade avançada, oriundos de Países desenvolvidos com programas de erradicação e que tenham manifestado a tuberculose há décadas, nos quais subitamente o foco primário é reativado, ocorrendo a infecção endógena (KANTOR, 1988).

Em função disso, desde abril de 1993 a Organização Mundial da Saúde (OMS) vem considerando a tuberculose uma emergência global, incentivando medidas de controle da doença em todo o mundo. No Brasil, a OMS estimou que o *M. bovis* fosse o agente causal de cerca de 4.000 dos 80.000 casos de tuberculose registrados por ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1993). Recentemente, a tuberculose foi novamente incluída como um problema prioritário para o Ministério da Saúde brasileiro, que juntamente com outros 21 países em desenvolvimento albergam 80% dos casos da doença no mundo (BRASIL, 2002). Estima-se que ocorram 129.000 novos casos por ano no País, dos quais cerca de 90.000 são notificados; em 1998, ocorreu um coeficiente de mortalidade de 3,5 por 100.000 habitantes, mas esta realidade pode não estar bem representada, já que parte dos doentes não é diagnosticada nem registrada oficialmente (BRASIL, 2002).

Em humanos, o principal agente infeccioso da tuberculose é o *M. tuberculosis*,

manifestando-se principalmente na forma pulmonar e sendo transmitido por via respiratória a partir do convívio e contato entre seres humanos sadios com indivíduos doentes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1993). A tuberculose zoonótica pode ser transmitida ao homem por ingestão de alimentos oriundos dos animais acometidos, inalação ou contato com mucosas ou pele lesada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1993; NEILL et al., 1994; RUA-DOMENECH, 2006). É provocada mais freqüentemente pelo *M. bovis*, causando nos seres humanos a tuberculose extra-pulmonar, transmitida por alimentos crus contaminados, e principalmente a tuberculose pulmonar, transmitida por aerossóis e que assume um caráter de doença ocupacional, atingindo freqüentemente grupos de maior exposição à doença, como proprietários e tratadores de rebanho, veterinários e magarefes, em contato com animais ou carcaças infectadas (O'REILLY; DABORN, 1995; ROXO, 2008).

A inalação de aerossóis é uma das principais vias de transmissão do bacilo da tuberculose bovina ao homem e para outros animais, assumindo um caráter de doença ocupacional, atingindo fazendeiros, veterinários, tratadores e magarefes (NEILL et al., 1994). Contudo, em centros urbanos, o leite contaminado assume o papel de principal veículo de transmissão da tuberculose bovina, quando é consumido cru ou na forma de subprodutos não submetidos à pasteurização. Muitos países latino-americanos são semelhantes aos países desenvolvidos no tocante à produção de alimentos, como por exemplo, o consumo de subprodutos lácteos preparados a partir do leite cru, a produção doméstica destes e problemas com a educação sanitária da população (PARDO, 2007), que muitas vezes privilegia esta prática como sendo mais natural e saudável.

A tuberculose pode ser transmitida tanto do bovino para o homem como do homem para o bovino (GRANGE, 2001). O *M. tuberculosis* não causa um quadro evolutivo de doença nos bovinos, mas a infecção dos bovinos por tal agente pode determinar positividade aos testes de tuberculinização e permanecer vivo por certo tempo em órgãos e tecidos, sendo eventualmente excretado pelo leite sem que o úbere apresente sinais de infecção ou inflamação (CORRÊA; CORRÊA, 1992). *M. bovis*

isolados de espécies de animais de produção, incluindo linfonodos de bovinos, búfalos e suínos, bem como do leite, foram encontrados por Leite et al. (2003), confirmando o risco de ingestão de leite cru não pasteurizado e também de carnes cruas ou insatisfatoriamente cozidas.

O *M. bovis*, por outro lado, pode provocar no homem desde uma tuberculose primária abdominal até tuberculose óssea e nas articulações. No passado, chegou a se associar a tuberculose como uma doença infantil, provavelmente pelo alto consumo de leite oriundo de vacas doentes pelas crianças (O'REILLY; DABORN, 1995; COSIVI et al., 1998). Uma das manifestações clínicas comum em crianças no passado é conhecida como escrofulose, caracterizada pelo aumento dos gânglios do pescoço, em função da descarga de micobactérias nos linfonodos cervicais (O'REILLY; DABORN, 1995).

O Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) foi criado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e preconiza o teste de tuberculina (intradérmico) como ferramenta principal no diagnóstico da infecção em bovinos, seguida do isolamento e tipificação em laboratório das cepas ocorrentes nos rebanhos afetados (BRASIL, 2001). O diagnóstico clínico, associado à tuberculinização, pode ajudar na identificação de animais com tuberculose em estágio avançado, que normalmente possuem baixa ou nenhuma resposta (anergia) à tuberculina (NEILL et al., 1994). Os animais considerados positivos ao teste de tuberculina devem ser marcados a ferro candente com a letra "P" no lado direito da face e destinados ao abate sanitário (BRASIL, 2001).

## 1.5 DIAGNÓSTICO. MEIOS DE CULTIVO E PCR

O teste intradérmico é considerado internacionalmente como padrão para o diagnóstico *ante-mortem* da tuberculose bovina, e tem como base provocar uma

hipersensibilidade do tipo tardia à injeção intradérmica de tuberculina, um extrato protéico oriundo de sobrenadantes de culturas micobacterianas (RUA-DOMENECH, 2006). A reação ao teste ocorre na forma de edema pronunciado, resultado de uma manifestação de resposta mediada por linfócitos T previamente sensibilizados, a qual é deflagrada em indivíduos previamente expostos ao bacilo (NEILL et al., 1994; ROXO, 1996).

A execução do teste, somada à eutanásia dos bovinos positivos, têm sido o esteio dos principais programas de erradicação ao redor do mundo há anos. Novas ferramentas, incluindo novos métodos diagnósticos e até mesmo vacinas, são requeridas nos países nos quais o teste intradérmico seguido de abate não gera resultados satisfatórios no sentido da erradicação do problema (POLLOCK; WELSH; McNAIR, 2005). Em situações de infecção recente ou muito avançada, final de gestação, desnutrição e outros pode ocorrer anergia ao teste tuberculínico, resultando em falsos negativos (NEILL et al., 1994). Por outro lado, para determinar o significado de reações tuberculínicas positivas em animais que não possuem lesões visíveis ao abate, faz-se necessário o exame microbiológico das amostras em laboratório, principalmente linfonodos colhidos assepticamente e enviados congelados ao laboratório (ROXO, 1996). Estas situações reforçam a importância da associação com o histórico do rebanho, repetição dos testes e métodos de cultivo e identificação do bacilo (NEILL et al., 1994).

Há que se considerar a união entre profissionais de saúde humana e veterinária nos sucessos dos diagnósticos, uma vez que o *M. bovis*, por não crescer em meios glicerinados, é difícil de ser isolado se não houver uma solicitação específica do médico ao laboratório de análise (PINHEIRO, 2000). Além da tuberculose causada por *M. bovis* ser clinicamente indistinguível daquela causada por *M. tuberculosis*, a baciloscopia do escarro, empregada largamente para o diagnóstico da tuberculose humana, é ineficaz para distinguir o bacilo humano do bovino (RUGGIERO et al., 2007). Esta discriminação em laboratório somente é possível pelo cultivo no meio de Stonebrink, isento de glicerol e favorável ao crescimento do *M. bovis*, em paralelo com o cultivo em meio de

Löwenstein-Jensen, mais adequado ao *M. tuberculosis* (KANTOR; RITACCO, 1994; O'REILLY; DABORN, 1995).

Simpson e Reed (1958) numeraram algumas características do que seria um meio de cultura ideal para detecção de micobactérias: oferecer condições para seu rápido crescimento, permitir diferenciação entre micobactérias patogênicas e não patogênicas pelas características morfológicas das colônias, inibir o crescimento de contaminantes e ser preparado a partir de ingredientes prontamente disponíveis para garantir sua reprodutibilidade. A maioria dos meios usados tradicionalmente no isolamento de micobactérias não satisfazem a maioria destas características, pois possuem em sua composição materiais orgânicos complexos, tais como soro animal, gema de ovos ou extrato de batatas, que não garantem reprodutibilidade de um lote para outro.

A cultura de *M. bovis* no meio convencional de Stonebrink permanece como padrão ouro para detecção de bactérias do Complexo *M. tuberculosis* em amostras clínicas de tecidos bovinos, muco nasal, leite, sangue e amostras ambientais (RUADOMENECH et al., 2006). O *M. bovis*, particularmente, tem dificuldade em se desenvolver em meios glicerizados, desenvolvendo-se melhor no Stonebrink, meio de cultura à base de ovos onde o glicerol é substituído pelo piruvato de sódio (O'REILLY; DABORN, 1995; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Ainda assim, seu crescimento pode levar de 24 a 40 dias em média, dificultando o diagnóstico da doença (KONEMAN et al., 2001).

Middlebrook e Cohn desenvolveram, em 1958, um meio de base ágar transparente, o Middlebrook 7H10, composto por uma variedade de sais inorgânicos que provêm as substâncias de que a micobactéria necessita. À formulação básica adicionou-se o enriquecimento OADC, contendo ácido oléico (ácido graxo de cadeia longa que participa do metabolismo das micobactérias), albumina bovina (confere proteção dos bacilos contra agentes tóxicos e favorece o primo-isolamento), dextrose (fonte de energia), cloreto de sódio (mantém o equilíbrio osmótico), e catalase (destrói

peróxidos que possam estar presentes no meio). Na época, os autores descreveram igual sensibilidade deste meio em comparação ao Löwenstein-Jensen (L-J) quanto aos números de culturas positivas das amostras semeadas. O meio de Middlebrook 7H11 diferencia-se do 7H10 pela presença do hidrolisado de caseína, que facilita o crescimento das micobactérias fastidiosas e resistentes à isoniazida (KONEMAN et al., 2001) sendo modificado pela presença do piruvato de sódio em substituição ao glicerol para possibilitar o crescimento de *M. bovis* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Na tentativa de se aperfeiçoar o método microbiológico tradicional, alguns grupos de pesquisadores vêm testando há alguns anos a eficácia dos meios transparentes dispostos finamente em placas (camada delgada) para o diagnóstico precoce de micobactérias, por permitir sua visualização em estágios iniciais de crescimento e permitir uma identificação preliminar das micobactérias pelas características morfológicas das colônias (MEJIA et al., 1999; ROBLEDO et al., 2006; SILVA et al., 2007). Assim sendo, a transparência e a capacidade de ser reproduzido em laboratório, graças à disponibilidade de ingredientes sintéticos, apresentam-se como vantagens que corroboram com as características que Simpson e Reed (1958) desejavam para um meio de cultura.

Liu et al. (1973) testaram o meio de Middlebrook 7H10 e não encontraram vantagens para seu uso em comparação ao L-J, porém avaliaram somente o número de colônias que cresceu nos meios, e não o tempo em que estas foram visualizadas. Os autores, contudo, não consideraram a utilização do meio em camada delgada, nem aplicaram condições de microaerofilia aos cultivos. Já Mejia et al. (1999) compararam a sensibilidade e o tempo de detecção de colônias entre o meio de Middlebrook 7H11 e o de L-J, encontrando, no primeiro, crescimento de colônias aos três dias pós-semeadura e reconhecendo como positivas 80% das amostras em duas semanas de experimento, enquanto para o L-J menos de 20% dos cultivos apresentaram crescimento no mesmo período de tempo. O grupo destaca as vantagens de se utilizar um meio transparente na redução do tempo de visualização das colônias, técnica que não exige equipamento de alto custo, mas que necessita de acurácia do observador na detecção das colônias,

podendo aumentar a demanda de trabalho no laboratório.

Visando testar a performance global do cultivo em camada delgada em comparação ao L-J, Robledo et al. (2006) avaliaram conjuntamente seis laboratórios na América Latina que aplicaram estas técnicas para estudo de micobactérias em amostras humanas. Concluíram que, além de terem obtido menor tempo de visualização de colônias (entre 7 a 11,5 dias, na dependência das amostras), as diferenças nas características dos diferentes laboratórios, prevalência da doença e tipo de espécimes processados não afetaram a performance global do cultivo em camada delgada.

Silva et al. (2007), testando amostras clínicas pulmonares e extra-pulmonares de humanos, obteve tempo médio para observação de resultados positivos em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 de nove dias pós semeadura, enquanto que para o meio de Ogawa foram observados resultados positivos somente aos 21 dias pós-semeadura. Os autores ressaltam a importância de um rápido diagnóstico em amostras suspeitas de tuberculose em humanos na aplicação imediata do tratamento pós-isolamento e identificação, o que é crucial para a quebra da cadeia de transmissão da tuberculose.

Seguindo esta linha, pesquisadores ligados ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo desejaram trabalhar com a técnica de camada delgada para isolamento e identificação precoces de micobactérias de interesse veterinário. Marcondes et al. (2006) compararam a viabilidade desta nova técnica com o cultivo nos meios tradicionais de Stonebrink e Petragnani, identificando abundante crescimento já a partir do 3º dia de cultivo, com fator corda mais evidente aos 5º e 6º dias de cultivo em camada delgada em placas, permitindo também diferenciar morfológicamente as cepas padrão de *M. bovis* (AN5) e de *M. tuberculosis* (H37Rv). Dib et al. (2006), trabalhando com amostras de leite experimentalmente inoculadas com *M. bovis*, identificaram colônias a partir do 11º dia até o 21º dia pós semeadura.

Pinheiro et al. (1992), testando a eficácia de desinfetantes micobactericidas, ressaltaram a dificuldade em relação ao fator tempo, já que a visualização tardia de colônias em meios de cultura tradicionais limitam a recomendação dos testes que avaliam a atividade micobactericida de desinfetantes químicos. Tendo isto em vista, Morato et al. (2009) também testaram a eficácia de micobactericidas químicos, porém realizando o cultivo prévio do *M. bovis* em camada delgada, observando colônias já aos 5 dias pós-semeadura, acelerando os procedimentos de testes dos desinfetantes no laboratório.

Para a confirmação dos isolamentos obtidos em meios de cultura em geral, torna-se interessante o uso de métodos moleculares, principalmente pelas limitações quanto à sensibilidade e especificidade do teste de reação cutânea e da coloração de Ziehl-Neelsen, e pelo longo período para a confirmação da presença do agente pelos métodos bacteriológicos de rotina (RORING et al., 2000; ZANINI et al., 2001). Assim, podem ser úteis na confirmação de diagnóstico e identificação da estirpe isolada no meio de cultura, acelerando a tomada de decisões para o controle da doença no homem e nos animais, identificação dos fatores de risco e possibilitando intervenção imediata no rebanho.

A reação em cadeia de polimerase (PCR) é uma técnica molecular que vem sendo utilizada como alternativa de alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico rápido de doenças infecciosas (OGUSKU; SALEM, 2004). A PCR vem sendo empregada no diagnóstico da tuberculose tanto para a detecção do agente em isolados de culturas como também em amostras clínicas (VITALE et al., 1998; SAKAMOTO et al., 1999). Consiste na identificação e amplificação *in vitro* de uma seqüência-alvo de DNA (segmentos de genes) por meio de uma reação em cadeia da enzima taq-polimerase, permitindo o estudo da expressão gênica e o diagnóstico de doenças infecciosas em poucos dias ou até horas (ANDRADE, 1993; RUGGIERO et al., 2007). Entretanto, a escolha do DNA alvo e definição dos *primers* dentro da seqüência de DNA são fatores determinantes para sua acuidade (VITALE et al., 1998; OGUSKU; SALEM, 2004).



A favor da PCR, pode-se atribuir os dizeres de Cousins et al. (1991). Os autores argumentaram que, apesar da aceitação do cultivo como ferramenta definitiva para o diagnóstico da tuberculose, algumas espécies positivas ao exame microscópico das lesões não se replicam em meio de cultura, por fatores que vão desde o árduo tratamento de descontaminação empregado, até a contaminação com outras bactérias ou presença de micobactérias não viáveis. Além disso, quando crescem, o tempo de espera pode ser de até 10 semanas, retardando muito o diagnóstico.

Desta maneira a PCR parecia ser a ferramenta ideal para se antecipar aos resultados do cultivo, a partir de amostras clínicas. Roring et al. (2000), porém, destacam baixa sensibilidade da PCR executada diretamente dos tecidos em função da pequena quantidade de bacilos existentes nas lesões. Garg et al. (2003) ressaltaram as dificuldades nos resultados da PCR em função da presença de inibidores e da contaminação por DNA de outras espécies de microorganismos e do hospedeiro, havendo ainda a dificuldade de se realizar o procedimento sem o cultivo e isolamento prévios (COLLINS et al., 1994; ROXO et al., 2002).

Diante da importância do tema, da precariedade de trabalhos sobre métodos diagnósticos rápidos para isolamento de micobactérias de amostras clínicas e dando continuidade a uma linha de pesquisa já implantada no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, em parceria com pesquisadores do Instituto Biológico, este trabalho foi delineado pretendendo-se associar a técnica de cultivo em camada delgada contendo ágar Middlebrook 7H11 modificado com a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para identificação precoce de *Mycobacterium bovis* em órgãos de bovinos e bubalinos oriundos de abatedouros comerciais.



## 2 OBJETIVOS

- Padronizar a técnica de cultivo de micobactérias em camada delgada no meio de Middlebrook 7H11 modificado, a partir de amostras de órgãos de bovinos e bubalinos, tendo como referência os resultados obtidos no cultivo clássico no meio de Stonebrink.
- Identificar as colônias de micobactérias na camada delgada, acompanhando os dias de crescimento, e avaliar a sensibilidade da técnica em comparação ao cultivo no Stonebrink.
- Associar a técnica de PCR como forma de confirmação dos resultados observados no cultivo em camada delgada.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas de cultivo das amostras nos meios foram realizadas nas dependências do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VPS-FMVZ-USP). O preparo do meio de Middlebrook 7H11 modificado, a descontaminação de Petroff e semeadura das amostras foram realizados no Laboratório de Zoonoses Bacterianas, enquanto o acondicionamento em estufa e observações macro e microscópicas das placas para verificação periódica de isolamento ou crescimento foram realizados no Laboratório de Doenças Infecciosas.

A fase de suspensão das colônias isoladas, para extração do DNA e realização da PCR, bem como a segunda etapa do experimento, de novo cultivo das amostras positivas em camada delgada para verificação precoce de colônias e nova confirmação pela PCR, foram realizadas no Laboratório de Tuberculose do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico (São Paulo-SP).

A metodologia empregada para a realização de todas as etapas do experimento está descrita nos itens a seguir.

#### 3.1 AMOSTRAS

Foram analisadas 49 amostras de órgãos de bovinos e bubalinos oriundos de abatedouros comerciais, sendo 10 amostras de animais aprovados na inspeção sanitária do Frigorífico Cowpig (Boituva – SP), utilizadas como controles negativos. Das 39 amostras de animais que apresentavam lesões sugestivas de tuberculose, 38 foram cedidas pelo Instituto Biológico e 01 cedida pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da FMVZ-USP.

Como controles negativos, foram utilizados 10 linfonodos mediastínicos, e para as amostras-teste foram utilizados: 01 linfonodo mediastínico, 01 linfonodo pré-escapular, 01 útero, 01 baço, 01 rim, 02 fígados, 03 pulmões, 19 linfonodos não identificados e 10 órgãos não identificados.

A origem das amostras, bem como as espécies a que pertenciam e sua identificação, encontram-se no apêndice A.

### 3.2 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados para o procedimento de isolamento foram o meio de Stonebrink (Anexo A) e o meio de Middlebrook 7H11 modificado (Anexo B), segundo o recomendado pela Universidad de las Naciones Unidas (1998).

O meio de Stonebrink foi distribuído em tubos de vidro (18 x 180 mm) com tampa de algodão hidrofóbico, em volume de 7,0 mL por tubo, que após o cultivo foram flambados e tampados com rolha de cortiça. O meio de Middlebrook 7H11 modificado foi elaborado com piruvato de sódio como fonte de carbono, em substituição ao glicerol, e distribuído em placas de Petri de plástico (tamanho 60 X 16 mm) em volume de 10 mL por unidade.

### 3.3 TÉCNICAS UTILIZADAS

#### 3.3.1 Método de coloração de Ziehl-Neelsen

Empregou-se o método de coloração de Ziehl-Neelsen, segundo o recomendado

pelo Centro Panamericano de Zoonosis (KANTOR, 1988) para observação microscópica das colônias isoladas nos tubos de meio de Stonebrink e nas placas de Middlebrook 7H11 modificado em camada delgada.

### **3.3.2 Descontaminação**

A técnica empregada para descontaminação das amostras clínicas foi o método clássico de Petroff (KANTOR, 1988).

### **3.3.3 Leitura das colônias isoladas nas placas**

As placas foram lidas nos dias 5, 8, 12, 15, 18, 21, 29 e 36 após a semeadura. Desde o primeiro dia de observação, foram definidos apenas pontos de observação nas placas que pudessem ser identificados na leitura seguinte, identificados nas placas como norte (N), sul (S), leste (L) e oeste (O).

O crescimento das colônias nas placas foi acompanhado de forma a observar a evolução de cada uma delas por dia de observação, e aquelas consideradas “suspeitas” ou com as colônias já observadas foram fotografadas para acompanhamento dos diferentes estágios de crescimento, até a conclusão da leitura. Em seus estágios iniciais, consideradas ainda como “suspeitas”, as colônias eram circundadas com caneta de marcação em vidro, de forma a serem observadas no próximo dia para verificação de sua evolução.

Foram consideradas positivas as placas que apresentaram crescimento micro e macroscópico característico assumido pelas colônias de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) neste meio de cultura (aspecto rugoso, bordas irregulares, cor acastanhada e

fator corda). Por sua vez, foram consideradas negativas as placas nas quais não se observou crescimento de colônias.

### **3.3.4 Leitura das colônias isoladas nos tubos**

As leituras de colônias nos tubos, contendo o meio de Stonebrink, foram semanais e encerraram-se na 12<sup>a</sup> semana pós-semeadura. A positividade foi confirmada com a observação visual do crescimento de colônias isoladas, obedecendo ao critério qualitativo de ausência ou presença de crescimento.

### **3.3.5 Identificação molecular das micobactérias**

As colônias de BAAR isoladas foram identificadas pelo método da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) utilizando-se os *primers* JB21 e JB22 descritos por Rodriguez et al. (1995) e o protocolo modificado por Roxo et al. (comunicação pessoal), como segue:

#### **3.3.5.1 Extração do Material Genético**

Foram colhidas colônias isoladas nos tubos contendo meio de Stonebrink e nas placas contendo ágar Middlebrook 7H11 modificado em camada delgada, ressuspensas em água Ultra Pura estéril em microtubos de 1,5 mL. A inativação do bacilo foi efetuada por fervura das amostras a 100° C por 5 minutos e submetidas ao congelamento a -20°C na seqüência (BEMER-MELCHIOR; DRUGEON, 1999).



### 3.3.5.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

As amostras descongeladas foram, então, submetidas à PCR, utilizando-se os *primers* JB-21 (5' TCGTCCGCTGATGCAAGTGC 3') e JB-22 (5' CGTCCGCTGACCTCAAGAAG 3'), descritos por Rodriguez et al. (1995) para identificação do *Mycobacterium bovis*, gerando produto final de 500 pares de bases.

As amplificações para os *primers* JB-21 e JB-22 foram realizadas em termociclador, submetendo-se as amostras ao tratamento inicial de 94° C por dois minutos. Seguiram-se, então, 35 ciclos de três temperaturas: desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização a 64°C por 30 segundos e extensão e anelamento a 72°C por 60 segundos. Depois do último ciclo as amostras foram mantidas a 72° por cinco minutos e o produto amplificado foi analisado na seqüência por eletroforese em cuba horizontal (ROXO, comunicação pessoal).

Os géis de agarose a 1,5% contendo 0,01% de brometo de etídio foram visualizados sob luz ultravioleta. e fotografados com auxílio de fotodocumentador.

## 3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As amostras de órgãos foram analisadas conforme descrição nos itens a seguir.

### 3.4.1 Primeira Etapa

As 49 amostras de órgãos foram descontaminadas pela técnica de Petroff e semeadas em duas placas de Petri contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado em

camada delgada e dois tubos de Stonebrink por amostra, totalizando 98 placas e 98 tubos. Deles, 39 amostras eram suspeitas e 10 amostras eram controle negativo, totalizando 78 placas e tubos suspeitos e 20 placas e tubos controles negativos.

As placas foram posteriormente identificadas e vedadas com esparadrapo tipo Micropore®<sup>9</sup>, para evitar emissão de aerossóis e reduzir a dessecação do meio, e dispostas em cubas de plástico, nas quais se criou um ambiente de microaerofilia (Anexo C); em seguida foram vedadas com tampas e envolvidas por plástico flexível do tipo Parafilm®<sup>10</sup> para prevenir a entrada adicional de oxigênio da estufa para o interior da cuba, e acondicionadas em estufa controlada a 37° C. As placas foram observadas nos dias: 5°, 8°, 12°, 15°, 21°, 25°, 29° e 36° pós-semeadura (p.s.) com auxílio de microscópio óptico comum [100 vezes (x) de aumento].

Os tubos foram identificados, e o ambiente de microaerofilia foi criado com o recurso da queima das rolhas e do algodão hidrofóbico utilizados na vedação de cada tubo. Na sequência, foram acondicionados em cuba plástica rasa, ligeiramente inclinados e mantidos em estufa sob temperatura de 37° C por 90 dias, sendo que as leituras para verificação do crescimento de micobactérias ocorreram semanalmente até a 12ª semana p.s. (90 dias).

Após o 36° dia de crescimento das colônias em ágar Middlebrook 7H11 modificado em camada delgada e da conclusão das leituras dos tubos de Stonebrink (90° dia), foi efetuada a identificação das micobactérias usando-se a técnica de PCR.

---

<sup>9</sup> Micropore®: 3M

<sup>10</sup> Parafilm ® M: American National Can™ - Chicago, IL 60631

### 3.4.2 Segunda Etapa

Na segunda etapa foi efetuado um novo cultivo de 10 amostras do grupo com resultado positivo na primeira etapa. O material foi semeado apenas em placas, em duplicata, totalizando 20 placas. Foi verificado se haveria a percepção mais precoce das colônias e se seria possível a identificação destas pela PCR, independentemente de ter havido ou não crescimento macroscópico das colônias.

O material foi processado à semelhança do procedimento descrito anteriormente, exceto pelos dias de leitura das placas que ocorreram nos dias 5º, 8º e 12º (p.s). No 13º dia, as placas foram retiradas da estufa e foi efetuada a suspensão das colônias para identificação das micobactérias por meio da técnica de PCR.

## 3.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A análise estatística foi realizada utilizando-se o “Teste de Fisher” do *software* GRAPHPAD INSTAT 1990-93.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão das duas etapas são apresentados a seguir.

### 4.1 PRIMEIRA ETAPA

No quadro 1 estão os resultados referentes aos dias de observação em relação à presença ou não de crescimento de colônias de micobactérias nas placas contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado em camada delgada.

(continua)

| GRUPOS | AMOSTRAS | PLACAS |   |        |     | TUBOS |   |        |     |
|--------|----------|--------|---|--------|-----|-------|---|--------|-----|
|        |          | A      | B | Status | PCR | A     | B | Status | PCR |
| CN     | 1        | -      | - | NEG    | **  | -     | - | NEG    | **  |
| CN     | 2        | -      | - | NEG    | **  | -     | - | NEG    | **  |
| CN     | 3        | -      | - | NEG    | **  | -     | - | NEG    | **  |
| CN     | 4        | -      | - | NEG    | **  | -     | - | NEG    | **  |
| CN     | 5        | -      | - | NEG    | **  | -     | - | NEG    | **  |
| CN     | 6        | -      | - | NEG    | **  | -     | - | NEG    | **  |
| CN     | 7        | -      | - | NEG    | **  | -     | - | NEG    | **  |
| CN     | 8        | -      | - | NEG    | **  | -     | - | NEG    | **  |
| CN     | 9        | -      | - | NEG    | **  | -     | - | NEG    | **  |
| CN     | 10       | -      | - | NEG    | **  | -     | - | NEG    | **  |
| T      | 11       | -      | - | NEG    | **  | -     | - | NEG    | **  |
| T      | 12       | +      | - | POS    | POS | +     | + | POS    | POS |
| T      | 13       | +      | + | POS    | POS | -     | + | POS    | POS |
| T      | 14       | -      | - | NEG    | **  | +     | - | POS    | POS |
| T      | 15       | -      | - | NEG    | **  | -     | - | NEG    | **  |
| T      | 16       | +      | + | POS    | POS | +     | + | POS    | POS |
| T      | 17       | -      | - | NEG    | **  | -     | - | NEG    | **  |
| T      | 18       | -      | - | NEG    | **  | -     | - | NEG    | **  |
| T      | 19       | -      | - | NEG    | **  | -     | - | NEG    | **  |
| T      | 20       | -      | - | NEG    | **  | -     | - | NEG    | **  |
| T      | 21       | -      | - | NEG    | NEG | -     | - | NEG    | **  |
| T      | 22       | -      | - | NEG    | NEG | -     | - | NEG    | **  |

(conclusão)

| GRUPOS             | AMOSTRAS  | PLACAS |   |           |           | TUBOS |   |           |           |
|--------------------|-----------|--------|---|-----------|-----------|-------|---|-----------|-----------|
|                    |           | A      | B | Status    | PCR       | A     | B | Status    | PCR       |
| T                  | 23        | -      | - | NEG       | **        | -     | - | NEG       | **        |
| T                  | 24        | -      | - | NEG       | **        | +     | - | POS       | NEG       |
| T                  | 25        | -      | - | NEG       | **        | -     | - | NEG       | **        |
| T                  | 26        | -      | - | NEG       | **        | -     | - | NEG       | **        |
| T                  | 27        | -      | - | NEG       | **        | -     | - | NEG       | **        |
| T                  | 28        | +      | + | POS       | POS       | -     | - | NEG       | **        |
| T                  | 29        | -      | - | NEG       | **        | -     | - | NEG       | **        |
| T                  | 30        | -      | - | NEG       | **        | -     | - | NEG       | **        |
| T                  | 31        | -      | - | NEG       | **        | -     | - | NEG       | **        |
| T                  | 32        | +      | + | POS       | POS       | +     | + | POS       | POS       |
| T                  | 33        | -      | - | NEG       | **        | +     | + | POS       | POS       |
| T                  | 34        | +      | + | POS       | POS       | +     | + | POS       | POS       |
| T                  | 35        | +      | + | POS       | POS       | +     | + | POS       | POS       |
| T                  | 36        | -      | + | POS       | POS       | +     | + | POS       | POS       |
| T                  | 37        | +      | + | POS       | POS       | +     | + | POS       | POS       |
| T                  | 38        | +      | + | POS       | POS       | -     | - | NEG       | **        |
| T                  | 39        | +      | - | POS       | POS       | +     | + | POS       | POS       |
| T                  | 40        | +      | + | POS       | POS       | +     | - | POS       | POS       |
| T                  | 41        | -      | - | NEG       | POS       | -     | + | POS       | POS       |
| T                  | 42        | +      | + | POS       | POS       | +     | + | POS       | POS       |
| T                  | 43        | +      | + | POS       | POS       | -     | - | NEG       | **        |
| T                  | 44        | -      | + | POS       | POS       | -     | - | NEG       | **        |
| T                  | 45        | +      | + | POS       | POS       | +     | + | POS       | POS       |
| T                  | 46        | -      | - | NEG       | POS       | +     | - | POS       | POS       |
| T                  | 47        | -      | - | NEG       | **        | -     | - | NEG       | NEG       |
| T                  | 48        | +      | - | POS       | POS       | +     | + | POS       | POS       |
| T                  | 49        | -      | - | NEG       | POS       | -     | - | NEG       | NEG       |
| <b>TOTAL (POS)</b> | <b>49</b> |        |   | <b>17</b> | <b>19</b> |       |   | <b>18</b> | <b>17</b> |

## LEGENDA:

A placa ou tubo A  
 B placa ou tubo B  
 CN grupo controle negativo  
 T grupo teste  
 + presença de colônias na placa ou tubo  
 - ausência de colônias na placa ou tubo

POS amostra positiva  
 NEG amostra negativa  
 PCR Reação em Cadeia de Polimerase  
 Status Resultado da amostra na placa, tubo ou PCR  
 \*\* Não executado

Quadro 1 – Crescimento de colônias nas placas contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado em camada delgada e nos tubos de Stonebrink, com respectivo resultado da PCR, segundo os grupos experimentais - São Paulo – 2010

O grupo controle não apresentou crescimento de colônias em qualquer uma das placas ou tubos, confirmando as amostras como negativas. Houve 100% de concordância da negatividade das placas em relação aos tubos não havendo necessidade da PCR.

Avaliando-se o grupo das amostras-teste, em relação aos resultados das placas, foram consideradas positivas 17 das 39 amostras (43,59%), sendo que em 5 delas (12,82%) houve crescimento em apenas uma das placas (A ou B). Tomando por base os resultados dos tubos, foram consideradas positivas 18 das 39 amostras (46,15%), sendo que em 6 delas (15,38%) houve crescimento em apenas um tubo (A ou B).

Avaliando conjuntamente o grupo controle negativo com o grupo das amostras-teste (49 amostras), na comparação do desempenho do cultivo em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado com o cultivo no meio de Stonebrink, 13 amostras (23,56%) resultaram positivas e 27 (55,1%) negativas para ambos os testes, mostrando uma concordância kappa de 0,816327 (considerada “ótima”). Por outro lado, quatro amostras negativas no Stonebrink foram positivas na camada delgada, enquanto cinco positivas no Stonebrink foram negativas na camada delgada, conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1 - Resultados do desempenho do cultivo em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado comparado com o Stonebrink (padrão ouro) - São Paulo – 2010

| <b>CAMADA DELGADA<br/>(Teste)</b> | <b>STONEBRINK (Padrão Ouro)</b> |                 |
|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------|
|                                   | <b>Positivo</b>                 | <b>Negativo</b> |
| <b>Positivo</b>                   | <b>13</b>                       | <b>4</b>        |
| <b>Negativo</b>                   | <b>5</b>                        | <b>27</b>       |
| <b>TOTAL</b>                      | <b>18</b>                       | <b>31</b>       |

Sensibilidade Relativa:  $13/18 = 72,22\%$

Especificidade Relativa:  $27/31 = 87,09\%$

A análise estatística mostrou que o cultivo em camada delgada contendo meio

de Middlebrook 7H11 modificado, em comparação ao cultivo em Stonebrink, apresentou uma Sensibilidade Relativa de 72,22%, e uma Especificidade Relativa de 87,09%.

O meio de Middlebrook 7H11 modificado possui a vantagem de ser transparente, permitindo a observação direta das placas ao microscópio. Seu uso na forma de camada delgada em placas contribui para a visualização de crescimento precoce das micobactérias. Durmaz, Durmaz e Gürel (1985); Idigoras et al. (1995) e Mejia et al. (1999), trabalhando com diagnóstico de micobactérias do Complexo *M. tuberculosis*, encontraram vantagens na antecipação dos resultados pela visualização precoce de microcolônias no meio de Middlebrook 7H11. Marcondes (2002) ressaltou que o meio de Middlebrook 7H11 não acelerava o crescimento das colônias, mas sim, por sua transparência, apenas permitia a observação das placas diretamente ao microscópio, possibilitando a visualização em seus estágios iniciais de crescimento.

Em 1958, Simpson e Reed já sugeriam o uso de meios sintéticos, mas de fácil reprodução em laboratório, por meio de ingredientes disponíveis comercialmente em lugar daqueles contendo materiais orgânicos complexos, tais como soro animal, gema de ovos ou extrato de batatas. Robledo et al. (2006) compararam os dados obtidos em seis diferentes laboratórios na América Latina com o uso de camada delgada em relação ao meio de Löwenstein-Jensen (L-J), de forma a testar a eficácia do isolamento, mas também a reprodutibilidade entre laboratórios. Mesmo quando consideradas as diferentes características dos laboratórios participantes, a prevalência da tuberculose humana e o número e tipo de espécimes processados em cada região onde se localizavam os laboratórios, os pesquisadores concluíram que tais fatores não afetaram a performance global da camada delgada em comparação ao L-J, confirmando a robustez do método de camada delgada e sua viabilidade em diferentes ambientes laboratoriais. Ressaltam, contudo, que o meio é mais caro e menos sensível em comparação às técnicas tradicionais, porém requer menos tempo para observação de isolamento e não exige equipamentos laboratoriais especiais, recomendando o isolamento em camada delgada como método complementar a laboratórios que desejem reduzir o tempo de detecção de micobactérias em cultivos.



Marcondes et al. (2006), trabalhando com volume de 5 mL de meio de Middlebrook 7H11 em placas de Petri de vidro, observaram uma viabilidade do meio de apenas duas semanas, enquanto Dib et al. (2006), trabalhando com o mesmo volume mas com placas descartáveis (que permitiram melhor encaixe entre as partes inferior e superior), obtiveram viabilidade do meio por três semanas. No intuito de se conseguir observar colônias por até 36 dias, preconizou-se para este estudo a adição de 10 mL de meio de Middlebrook por placa, o que evitou qualquer ressecamento durante o período. Da mesma forma que observado por Marcondes et al. (2006); Dib et al. (2006) e Morato et al. (2009), algumas das placas apresentaram contaminações, mas nenhuma afetou sua observação ao microscópio ou o crescimento das colônias.

Houve dificuldade inicial na visualização dos primeiros estágios de colônias em crescimento em meio aos debris celulares e restos tissulares, oriundos do processo de descontaminação, assim como observado por Marcondes (2002). Desta forma, a adoção da semeadura de amostras negativas foi importante, uma vez que era possível identificar nelas somente estes artefatos de técnica, e assim possibilitar sua diferenciação dos estágios iniciais de crescimento de colônias nas placas semeadas com amostras-teste.

No quadro 2 são apresentados os resultados referentes aos dias de observação em relação à presença ou não de crescimento de colônias de micobactérias nas placas contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado em camada delgada.

| 17 PLACAS POSITIVAS        |                    |   |    |    |    |    |    |    | 18 TUBOS POSITIVOS            |                       |    |    |    |    |    |    |    |
|----------------------------|--------------------|---|----|----|----|----|----|----|-------------------------------|-----------------------|----|----|----|----|----|----|----|
|                            | DIAS PÓS-SEMEADURA |   |    |    |    |    |    |    |                               | SEMANAS PÓS-SEMEADURA |    |    |    |    |    |    |    |
|                            | 5                  | 8 | 12 | 15 | 21 | 25 | 29 | 36 |                               | 6                     | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 |
| <b>Novas positivas/dia</b> | 0                  | 0 | 4  | 5  | 5  | 3  | 0  | 0  | <b>Novos positivos/semana</b> | 7                     | 3  | 2  | 2  | 0  | 2  | 1  | 1  |
| <b>Acumulado</b>           | 0                  | 0 | 4  | 9  | 14 | 17 | 0  | 0  | <b>Acumulado</b>              | 7                     | 10 | 12 | 14 | 14 | 16 | 17 | 18 |

Quadro 2 – Crescimento de colônias das amostras consideradas positivas, segundo o método de cultivo adotado e o momento da leitura - São Paulo - 2010

Das 17 amostras consideradas positivas pelos resultados obtidos nas placas contendo Middlebrook 7H11 modificado em camada delgada, 4 (23,52%) estavam positivas no 12º dia p.s., 9 (52,94%) no 15º, 14 (82,35%) no 21º e 17 (100%) no 25º dia p.s. Portanto, mais de 50% da positividade das amostras foi obtida no 15º dia p.s., e a partir do 25º não se observou novos crescimentos. Do 25º ao 36º p.s., foram observadas placas nas quais o crescimento das colônias era tão pronunciado que dificultava sua visualização ao microscópio com aumento de 100x, adotando-se também o aumento de 40x para registro fotográfico das colônias.

No meio de camada delgada, considerando-se um nível de significância  $p < 0,05$ , os quatro resultados positivos obtidos aos 12 dias p.s. já foram considerados significativos ( $p = 0,0455$ ) em comparação ao meio de Stonebrink. Conseqüentemente, os resultados positivos acumulados nos dias 15 ( $p = 0,001$ ), 21 ( $p = 0,0001$ ) e 25 ( $p = 0,0001$ ) p.s. também foram significativos em comparação ao Stonebrink.

O cultivo em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado permitiu a observação precoce do crescimento de colônias oriundas de amostras clínicas, a partir do 12º dia, enquanto no meio de Stonebrink só foi possível visualizar colônias a partir da 6ª semana (42º dia em diante). Estes resultados corroboram com os encontrados por alguns autores. Durmaz, Durmaz e Gürel (1985), trabalhando com meio de Middlebrook 7H11 em camada delgada para isolamento de *M. tuberculosis*, visualizaram colônias aos 10 dias p.s., e neste período nenhum isolamento foi observado no meio de Löweinstein-Jensen (L-J), enquanto Idigoras et al. (1995) obtiveram isolamento médio no meio de Middlebrook 7H11 em camada delgada de 12 dias p.s., comparado a 23 dias em média para o aparecimento de colônias no L-J. Mejia et al. (1999) também compararam o meio de Middlebrook 7H11 com o L-J e detectaram, dentro das amostras positivas, que 60% delas cresceram aos 10 dias p.s., quando não havia ainda crescimento no L-J, e que 80% delas haviam crescido após duas semanas, enquanto somente 10% no L-J.

Aos 5º e 8º dias p.s., leves evidências de crescimento já podiam ser notadas,

mas não se observava ainda a presença do fator corda. Aos cinco dias p.s., Marcondes (2002) e Morato (2007) já observavam esta característica em seus estudos, porém utilizando cepa padrão em diluições de suspensões de micobactérias.

No quadro 2 também se observa que, das 18 amostras consideradas positivas pelos resultados obtidos nos tubos contendo meio de Stonebrink, 7 (38,89%) estavam positivas na 6ª semana p.s., 10 (55,55%) na 7ª, 12 (66,67%) na 8ª, 14 (77,78%) na 9ª e 10ª semanas, 16 (88,89%) na 11ª, 17 (94,44%) na 12ª e 18 (100%) na 13ª semana p.s. Portanto, mais de 50% da positividade das amostras foi obtida na 7ª semana p.s., observando-se crescimento até o 89º dia (13ª semana). Não se observou crescimento até a 5ª semana (35 dias) e nenhum novo na 10ª semana (70 dias).

Comparando-se as 18 amostras positivas totais (em tubos ou placas), quatro foram positivas somente nas placas, enquanto cinco foram positivas somente nos tubos. Nestes casos, uma explicação possível para a positividade em apenas um e não no outro meio é a de que, durante a semeadura simultânea, o inóculo contendo microorganismos viáveis tenha se direcionado somente para um dos meios. Liu et al. (1973) encontraram menor taxa de isolamento de micobactérias no meio de Middlebrook 7H10 em comparação com outros meios, mas atribuíram parte deste insucesso à não utilização de ambiente de microaerofilia nos estudos.

Embora a visualização das colônias no meio de Stonebrink tenha se iniciado somente a partir da 6ª semana, enquanto a observação das placas já havia se encerrado aos 36 dias p.s., o cultivo no meio de Stonebrink permanece como padrão-ouro para o isolamento de micobactérias de amostras clínicas (KANTOR, 1988). Portanto, a utilização de métodos rápidos deve ser pesquisada para suporte em situações em que seja necessária a tomada de decisão mais rápida em relação a um surto num rebanho ou a achados na inspeção sanitária, mantendo-se sempre, porém, o padrão-ouro em paralelo para a posterior confirmação do diagnóstico.

Apesar da técnica de cultivo em camada delgada contendo o meio de

Middlebrook 7H11 modificado ter apresentado um alto custo neste estudo (aproximadamente R\$ 20,00 por amostra), sua utilização pode gerar um resultado mais precoce, permitindo ao interessado a adoção de medidas prévias, tais como o isolamento preventivo da propriedade ou o embargo comercial das carcaças. O PNCEBT (BRASIL, 2007) já preconiza o isolamento e identificação do *M. bovis* para confirmação de lesões sugestivas ao abate em bovinos e bubalinos, portanto a associação de um método rápido de isolamento com a PCR pode ser uma ferramenta de antecipação de resultados, enquanto se espera o cultivo em paralelo das amostras no meio de Stonebrink.

Nas figuras 1 a 8 pode-se observar o evolução das imagens referentes aos dias de crescimento de colônias nas placas contendo meio de Middlebrook 7H11 em camada delgada.

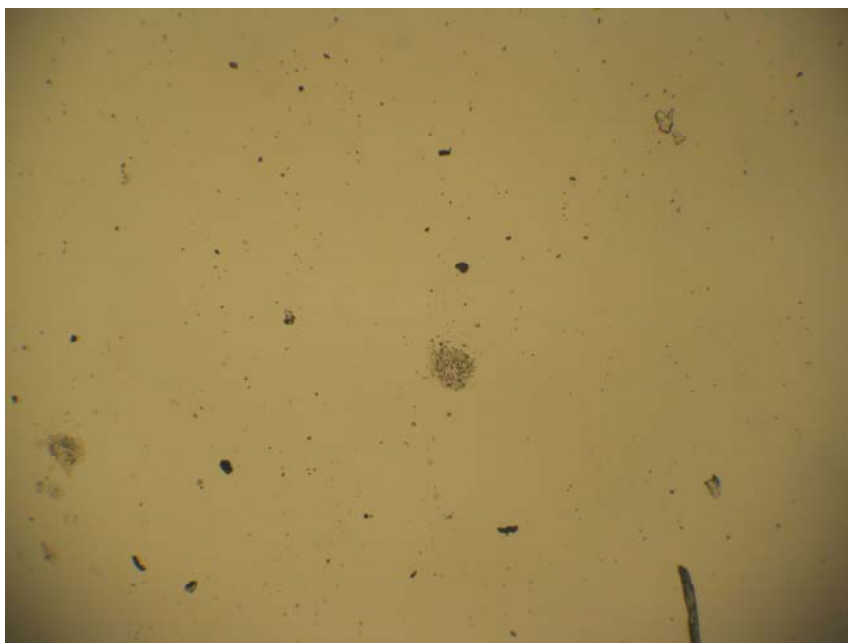


Figura 1 – Suspeita de surgimento de colônia após 5 dias de cultivo em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado. Aumento de 100x

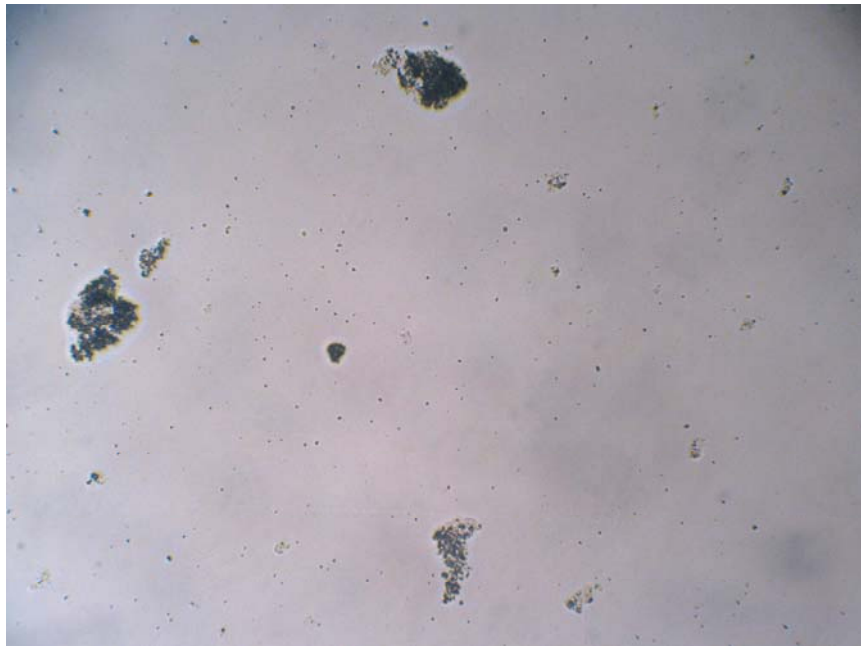


Figura 2 – Colônias com 8 dias de cultivo em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado. Aumento de 100x

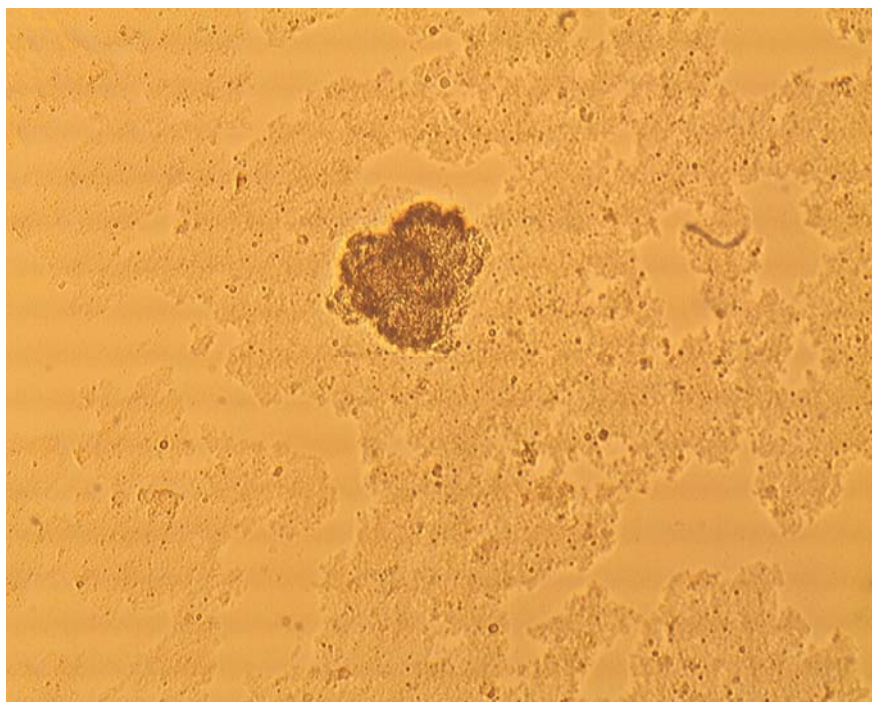


Figura 3 – Colônia com 12 dias de cultivo em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado. Aumento de 100x

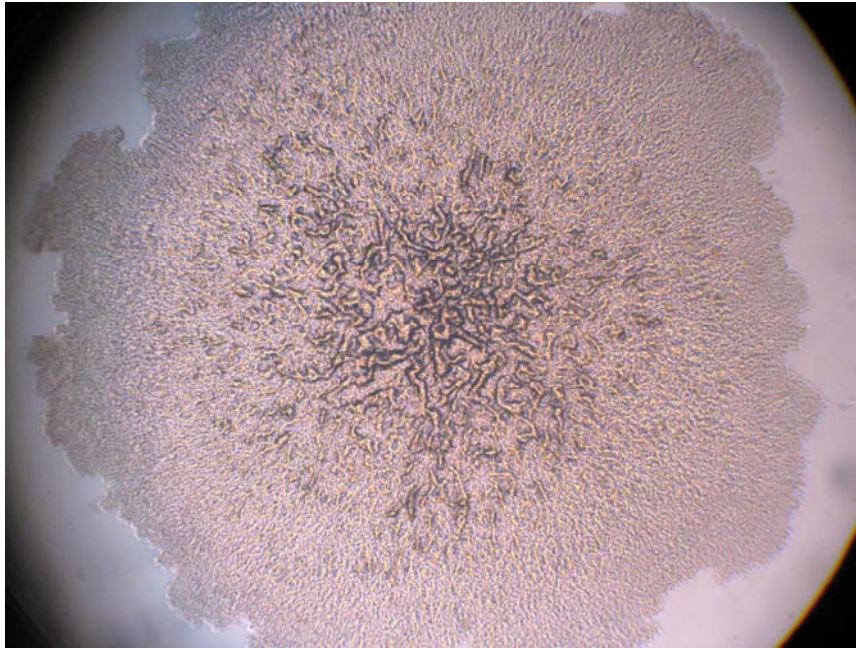


Figura 4 – Colônia com 15 dias de cultivo em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado. Aumento de 100x

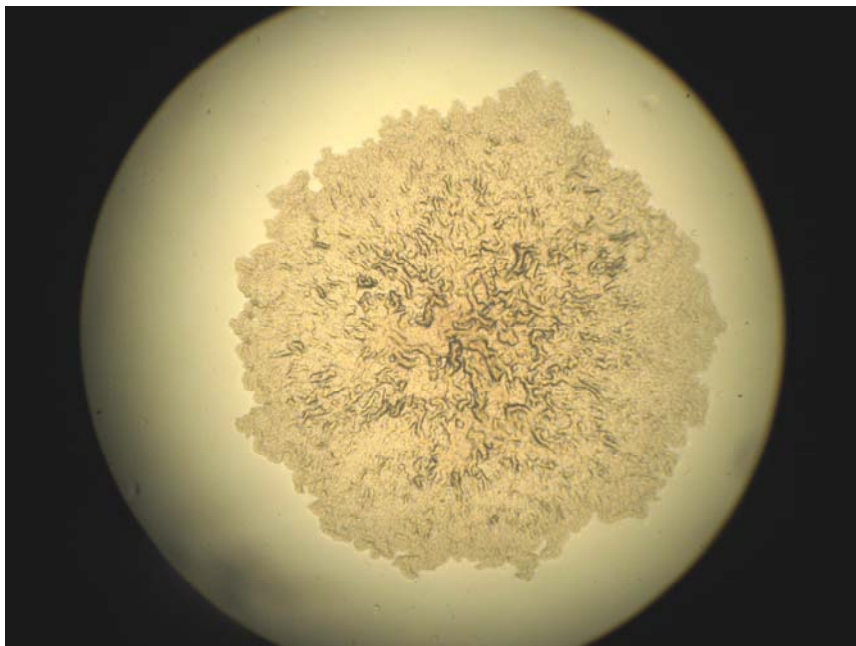


Figura 5 – Colônia com 15 dias de cultivo em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado. Aumento de 40x



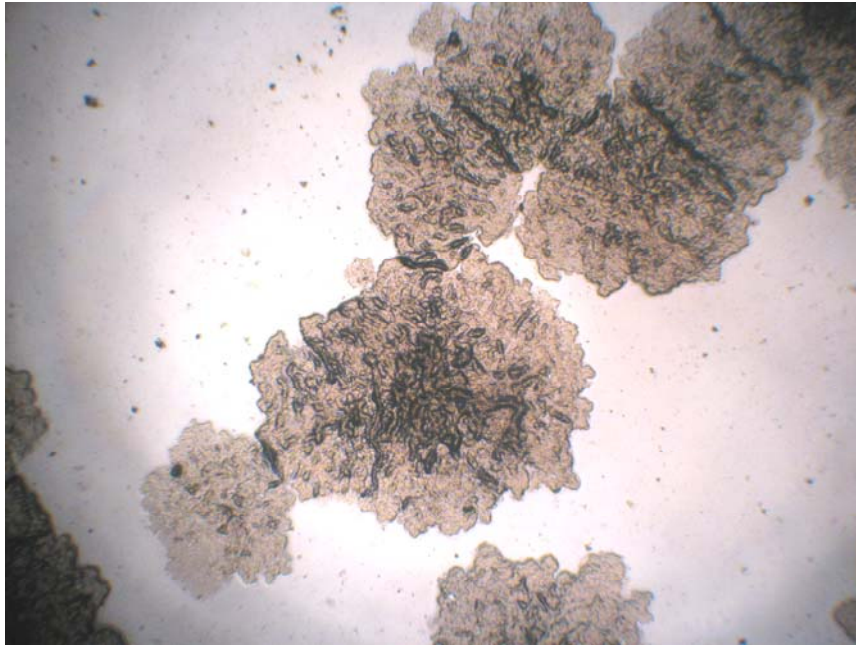


Figura 6 – Colônia com 21 dias de cultivo em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado. Aumento de 100x

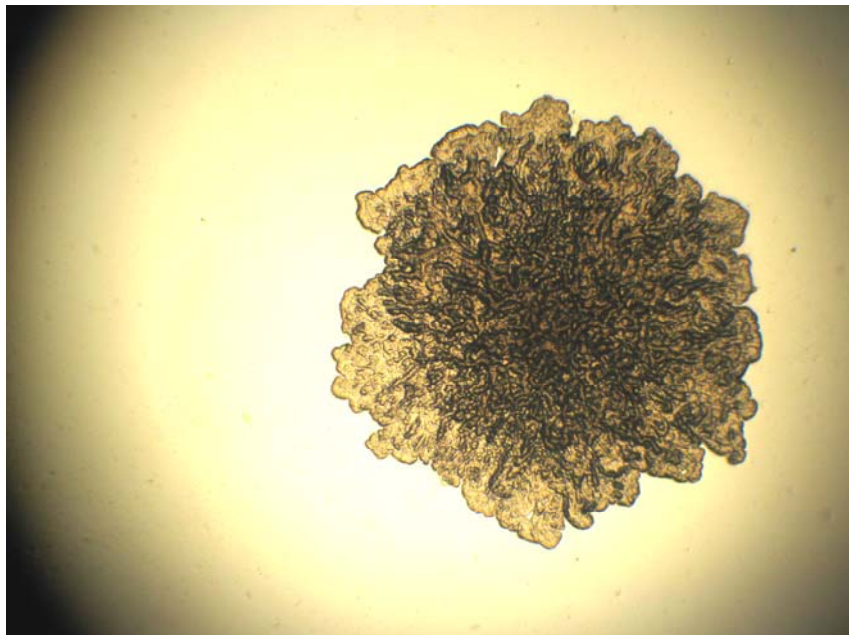


Figura 7 – Colônia com 25 dias de cultivo em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado. Aumento de 40x

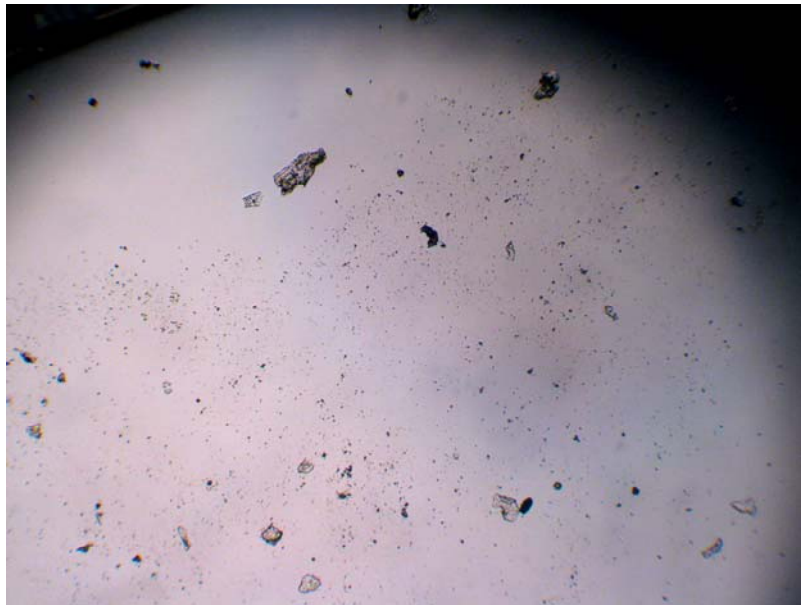


Figura 8 – Debris celulares de amostra controle negativo aos 29 dias de cultivo em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado. Aumento de 100x

Na figura 9 observa-se o aspecto de placa contendo colônias macroscópicas.



Figura 09 – Placa de petri contendo colônias aos 37 dias p.s.



A visualização microscópica do crescimento de colônias no meio de Middlebrook 7H11 modificado observada neste estudo, apresentando aspecto rugoso, bordas irregulares e de coloração acastanhada, também foi observada por Marcondes et al. (2006), trabalhando com estirpe padrão de *M. bovis* (AN5), e Morato et al. (2007), que utilizaram estirpe de *M. bovis* isolada de caprino, tipificada por PCR e mantida em meio de Stonebrink. Mejia et al. (1999) também observaram a tendência de formação do fator corda e colônias com bordas irregulares em amostras de campo.

Considerando os resultados das placas, a técnica de PCR confirmou não somente a positividade das 17 amostras que apresentaram crescimento, como também a de duas amostras consideradas negativas na observação, totalizando 19 resultados positivos, parcialmente visualizados na figura 10. É possível que tais amostras consideradas negativas na camada delgada tenham apresentado colônias microscópicas, suficientes para gerar um resultado positivo na PCR.

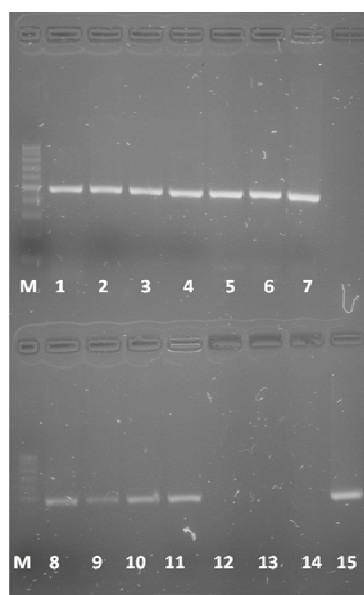


Figura 10 - Reação de PCR para amplificação do DNA de micobactérias isoladas em meio de Middlebrook 7H11 modificado em camada delgada, evidenciando bandas de aproximadamente 500 pb. M) marcador de peso molecular de 100 pb, 1) Amostra 12, 2) Amostra 16, 3) Amostra 16B, 4) Amostra 32, 5) Amostra 34, 6) Amostra 36, 7) Amostra 37, 8) Amostra 39, 9) Amostra 44, 10) Amostra 48, 11) Amostra 40, 12) Amostra Negativa 01, 13) Amostra Negativa 02, 14) Controle Negativo água ultra-pura, 15) Controle Positivo *M. bovis* AN5. Gel de agarose corado com brometo de etídio

Para os tubos, a técnica de PCR confirmou a positividade de 17 das 18 amostras, uma vez que na observação dos tubos foi considerado positivo um que continha colônias de aspecto alaranjado, mas que resultou negativo na PCR.

Segundo Cosivi et al. (1998), apesar do desenvolvimento recente de vários métodos bacteriológicos para o diagnóstico da tuberculose, nenhum deles deve ser aplicado isoladamente. Ruggiero et al. (2007) também reforçam a necessidade de associar técnicas para alcançar uma informação completa, destacando que os resultados laboratoriais devem ser associados a outros achados, como teste tuberculínico, exame *post mortem*, métodos histológicos e a PCR, entre outros.

Quando Rodriguez et al. (1995) descreveram os *primers* JB21 e JB22, inicialmente considerados específicos para *M. bovis*, perceberam que com a ampliação da amostragem observou-se que amplificavam também pelo menos 25% de isolados de *M. bovis* (RUGGIERO et al., 2007). Contudo, para este trabalho, consideramos com alguma segurança as amostras positivas na PCR como sendo oriundas da infecção por *M. bovis*, uma vez que o *M. tuberculosis* não gera a doença nos bovinos (CORRÊA; CORRÊA, 1992), não sendo assim a responsável pelas lesões nos órgãos trabalhados.

Das placas positivas, durante a colheita de material para a realização da PCR, foram retiradas as amostras para serem submetidas à coloração de Ziehl-Neelsen (Figura 11).

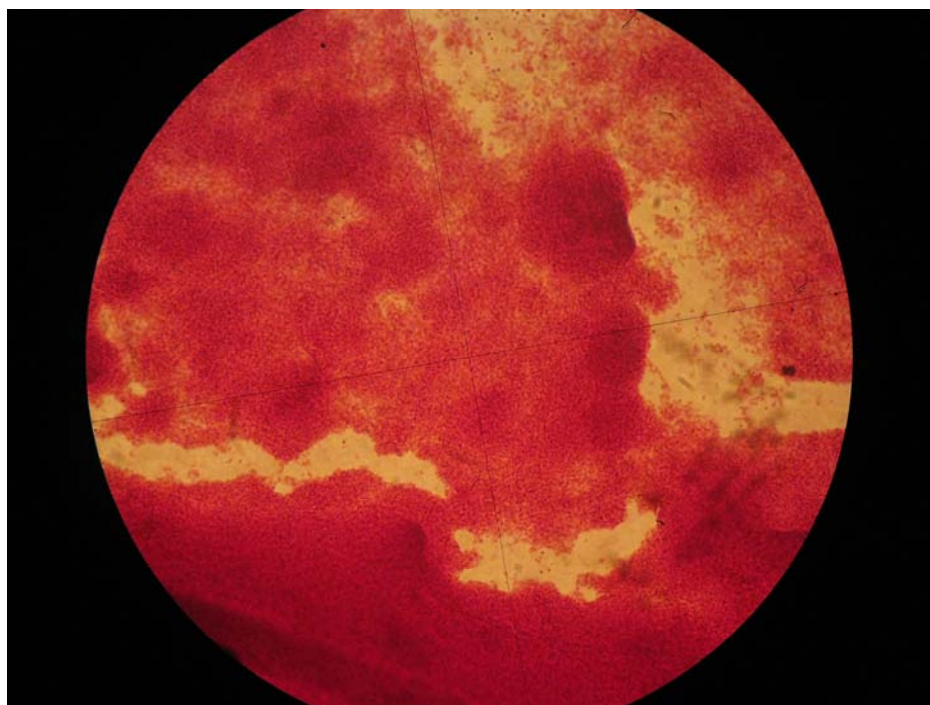


Figura 11 – Coloração de Ziehl-Neelsen evidenciando microorganismos álcool-ácido resistentes. Aumento 400 x

Na observação das lâminas ao microscópio (aumento 400x) notou-se a presença de microorganismos álcool-ácido resistentes, com características e formato incomuns (formas cocóides, com pouca ou nenhuma forma bacilar ou fator corda), quando comparadas às formas tradicionalmente denominadas bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). Apenas após a posterior confirmação da positividade na PCR destas amostras, associada às características assumidas pelas colônias na camada delgada (aspecto rugoso, bordas irregulares, coloração acastanhada), pôde-se afirmar que se tratava de BAAR de *M. bovis*.

A observação referida poderia ser explicada, já que colônias crescendo no meio sintético de Middlebrook 7H11 modificado podem ter apresentado disgonia, se comparadas ao meio de Stonebrink, rico em material orgânico. Trabulsi (1999) comenta que as micobactérias são microorganismos de crescimento lento, com tempo de geração aproximado de 12 horas, e esta dificuldade de crescimento pode estar relacionada com a absorção mais demorada dos nutrientes, provavelmente em função

da grande quantidade de lipídeos em sua parede. Assim, a observação precoce com o encerramento das leituras das placas após o 36º dia pode ter provocado uma estagnação do crescimento da micobactéria, impedindo que ela assumia sua forma bacilar clássica, adquirindo um aspecto de coco-bacilo. Além disso, as nocardias geralmente também são álcool-ácido resistentes e podem apresentar-se em formato cocóide (TRABULSI, 1999), reforçando as dúvidas relativas à observação das lâminas e a importância da confirmação como *M. bovis* pela PCR.

#### 4.2 SEGUNDA ETAPA

Os resultados desta etapa são apresentados no quadro 3, referentes à comparação entre os positivos na camada delgada no 12º dia p.s. em relação à PCR. Como não foi observado nenhum crescimento macroscópico, esta etapa foi interrompida aos 12 dias p.s.

| Amostras |               | PLACAS |   |        | PCR       |
|----------|---------------|--------|---|--------|-----------|
| Número   | Identificação | A      | B | Status | Resultado |
| 1        | 12            | +      | + | POS    | POS       |
| 2        | 16            | +      | + | POS    | POS       |
| 3        | 32            | +      | + | POS    | POS       |
| 4        | 34            | +      | + | POS    | POS       |
| 5        | 36            | +      | + | POS    | POS       |
| 6        | 37            | +      | + | POS    | NEG       |
| 7        | 39            | +      | + | POS    | POS       |
| 8        | 40            | +      | + | POS    | POS       |
| 9        | 47            | -      | - | NEG    | NEG       |
| 10       | 49            | +      | + | POS    | NEG       |

Quadro 3 – Resultados da observação por microscopia óptica da positividade das amostras semeadas em placas contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado em camada delgada e confirmadas pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). São Paulo – 2010.

Das 10 amostras semeadas em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado, nove (90%) foram declaradas positivas, e para a confirmação do resultado foi realizada a técnica de PCR. O resultado negativo da amostra 47 foi confirmado, mas para as amostras 37 e 49 não ocorreu confirmação da positividade observada nas placas (Figura 12).

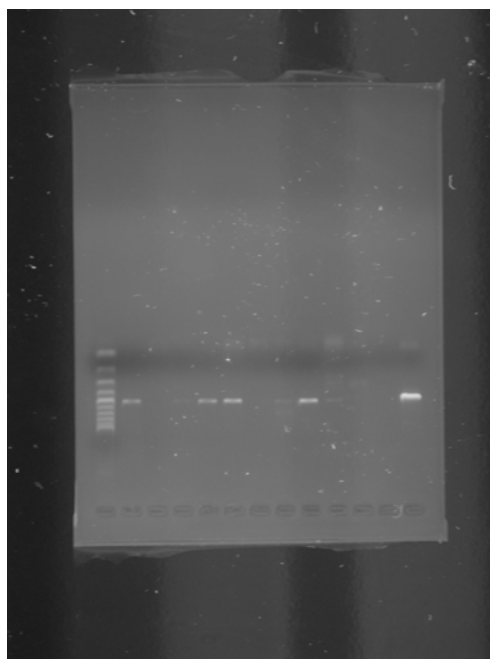


Figura 12 - Reação de PCR para amplificação do DNA de micobactérias isoladas em meio de Middlebrook 7H11 modificado em camada delgada, evidenciando bandas de aproximadamente 500 pb. M) marcador de peso molecular de 100 pb, 1) Amostra 12-1, 2) Amostra 12-2, 3) Amostra 16-1, 4) Amostra 16-2, 5) Amostra 32-1, 6) Amostra 32-2, 7) Amostra 34-1, 8) Amostra 34-2, 9) Amostra 36-1, 10) Amostra 36-2, 11) Controle Negativo água ultra-pura, 12) Controle Positivo *M. bovis* AN5. Gel de agarose corado com brometo de etídio

Embora as nove amostras positivas nesta segunda etapa tenham apresentado inicialmente um resultado positivo na primeira etapa, os resultados negativos na PCR para as amostras 37 e 49 podem estar relacionados parcialmente à qualidade da coleta da colônia retirada da placa para a realização da PCR. Uma vez que não ocorreu o crescimento macroscópico das colônias, e apesar desta técnica ser capaz de detectar quantidades muito pequenas de bacilos vivos ou mortos na amostra (KOCAGOZ et al., 1993; BEIGE et al., 1995), durante o procedimento de retiradas das colônias para diluição considerou-se apenas a localização do crescimento, marcada com caneta

apropriada diretamente nas placas quando anteriormente observadas ao microscópico. Assim, é possível que simplesmente não se tenha conseguido capturar adequadamente os microorganismos da colônia, durante a raspagem do meio de cultura com alça.

Apesar de as colônias assemelharem-se visualmente àquelas observadas por Marcondes (2002); Dib (2005) e Morato (2007), em seus estágios mais precoces elas podem assemelhar-se a outras bactérias, gerando o resultado negativo na PCR. Bactérias do gênero *Nocardia* podem assumir formas filamentosas e bacilares (TRABULSI, 1999), podendo ser eventualmente confundidas com as micobactérias em estágios iniciais de crescimento, reforçando a importância da associação dos métodos com a PCR na identificação como *M. bovis*.

No quadro 4 são apresentados os resultados referentes aos dias de observação em relação à presença ou não de crescimento microscópico de colônias de micobactérias nas placas contendo meio de Middlebrook 7H11 modificado em camada delgada.

| 07 PLACAS POSITIVAS        |                    |     |     |
|----------------------------|--------------------|-----|-----|
|                            | DIAS PÓS-SEMEADURA |     |     |
|                            | 5º                 | 8º  | 12º |
| <b>Novas positivas/dia</b> | 3/7                | 4/7 | 0/7 |
| <b>Acumulado</b>           | 3                  | 7   | 7   |

Quadro 4 – Proporções de crescimento de micobactérias das amostras consideradas positivas (PCR e placa) sob visualização em microscopia óptica, segundo o momento da leitura - São Paulo – 2010

Aos oito dias p.s., todas as amostras com positividade confirmada pela PCR já foram consideradas positivas nas placas, mas aguardou-se até o 12º dia na esperança de que algum crescimento macroscópico pudesse acontecer para confirmar os achados microscópicos (Figuras 13 e 14).



Figura 13 - Colônia de micobactéria com 8 dias de cultivo em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 Modificado. Aumento de 100x

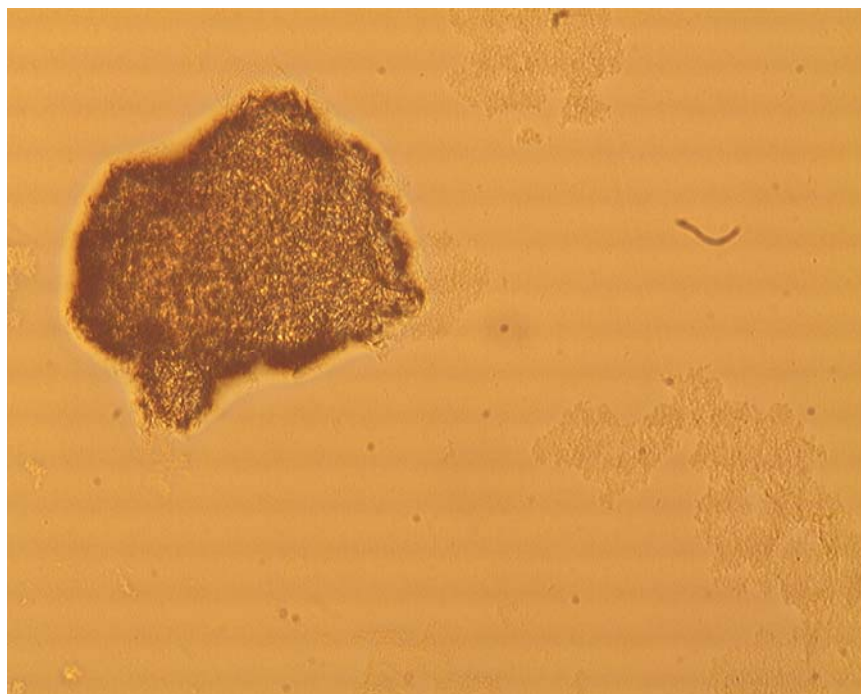


Figura 14 - Colônia de micobactéria com 12 dias de cultivo em camada delgada contendo meio de Middlebrook 7H11 Modificado. Aumento de 100x

Acredita-se que nesta etapa já existia uma maior acurácia na observação das colônias, em comparação com a primeira etapa do experimento, na qual ocorria certa insegurança no momento de identificar possíveis estágios iniciais de crescimento ou mesmo diferenciá-los de debris celulares (MARCONDES, 2002). Assim sendo, aos 5 dias p.s. já era possível afirmar com maior segurança que as três placas consideradas positivas na segunda etapa apresentavam crescimento de colônias em estágios iniciais, ressaltando a importância do treinamento visual em laboratórios dos pesquisadores que desejarem trabalhar com o cultivo em camada delgada.

Ao se priorizar o menor tempo de leitura das placas em dias, notou-se que a ausência do crescimento macroscópico pode levar a um erro de técnica ou à insuficiência de amostra para a realização da PCR, aumentando a chance de erro na atribuição de um resultado positivo. Contudo, a associação da PCR para confirmação ainda mais precoce dos resultados (12 dias, em lugar dos 36 dias da primeira fase do experimento) parece vantajosa, no sentido de confirmar os achados microscópicos sem aparente necessidade de crescimento macroscópico das colônias.





## 5 CONCLUSÕES

- A técnica de cultivo de *Mycobacterium bovis* em camada delgada no meio de Middlebrook 7H11 modificado a partir de amostras de órgãos de bovinos e bubalinos mostrou-se viável quando comparada ao cultivo clássico no meio de Stonebrink, reduzindo o tempo de isolamento e podendo ser utilizada de forma complementar aos métodos tradicionais de diagnóstico de tuberculose bovina.
- Foi possível a identificação precoce do crescimento das micobactérias em camada delgada (entre 12º e 25º dia de crescimento) quando comparada ao meio de Stonebrink.
- A PCR mostrou-se uma ferramenta complementar à somatória das técnicas de descontaminação de Petroff, coloração de Ziehl-Neelsen e cultivo em camada delgada na confirmação do diagnóstico de presença de micobactérias em amostras de órgãos de bovinos e bubalinos.
- Novos estudos de associação de técnicas são recomendados, no sentido de alterar a sensibilidade e a especificidade relativa do cultivo em camada delgada, aumentar a precocidade da observação das positivities e acelerar sua confirmação.



## REFERÊNCIAS

- ABALOS, P.; RETAMAL, P. Tuberculosis: ¿una zoonosis re-emergente? **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 23, n. 2, p. 583-594, 2004.
- ABRAHÃO, R. M. C. M.; NOGUEIRA, P. A.; MALUCELLI, M. I. C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, p. 1-17, 2005.
- ANDRADE, L. E. C. Princípios de biologia molecular e suas aplicações em medicina. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 39, n. 3, p. 175-186, 1993.
- ANTUNES, J. L. F.; MORAES, M.; BIAZEVIC, M. G. H.; WALDMAN, E. A.; CORRÊA, M. O. A. Tuberculose e leite: elementos para a história de uma polêmica. **História, Ciências, Saúde**, v. 9, n. 3, p. 609-623, 2002.
- ARANAZ, A.; COUSINS, D.; MATEOS, A.; DOMÍNGUEZ, L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1785–1789, 2003.
- BAPTISTA, F. **Tuberculose e outras causas de condenação de bovinos em frigoríficos de Minas Gerais, Brasil**. 1999. 49 f. Tese (Doutorado), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 1999.
- BEIGE, J.; LOKIES, J.; SCHABERG, T.; FINCKH, U.; FISCHER, M.; MAUCH, H.; LODE, H.; KÖLER, B.; ROLFS, A. Clinical evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 90-95, 1995.
- BERR, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1998. p.178-183.
- BRANDÃO, J. F. L. Leite: legislação, responsabilidade e saúde pública. **Balde Branco**, v. 30, n. 360, p. 68-71, 1994.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal**

(PNCEBT), Brasília: MAPA, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual técnico para o controle da tuberculose.** Cadernos de Atenção Básica nº 6, Série A - Normas e Manuais Técnicos, n. 148, Brasília: MS, 2002.

BEMER-MELCHIOR, P.; DRUGEON, H. B. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* for DNA Typing Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2350-2351, 1999.

CAMPOS, H. S. *Mycobacterium tuberculosis* resistente: de onde vem a resistência? **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 7, n. 1, p. 51-64, 1999.

COLLINS, D. M.; RADFORD, A. J.; DE LISLE, G. W.; BILLMAN-JACOB, H. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 83-94, 1994.

CORREIA, C. N. M.; CORREIA, W. M. Tuberculose humana por bacilo bovino em São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 43, n. 3, p.131-134, 1974.

CORREIA, W. M.; CORREIA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos.** 2 ed., Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 1992, p. 317-337.

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

COUSINS, D.; WILTON, S. D.; FRNACIS, B. R.; GOW, B. L. Use of Polymerase Chain Reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 255-258, 1992.

DIB, C. C. **Utilização de uma técnica rápida para o isolamento de *Mycobacterium bovis* a partir de amostras de leite experimentalmente inoculadas.** 2005. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

DIB, C. C.; MORAIS, Z. M.; SOUZA, G. O.; AMAKU, M.; BENITES, N. R.; PINHEIRO, S. R. Utilização de uma técnica rápida para o diagnóstico de *Mycobacterium bovis* em amostras de leite experimentalmente inoculadas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 2, p. 149-155, 2006.

DURMAZ, R.; DURMAZ, B.; GÜREL, M. *Mycobacterium tuberculosis* cultures in Mycobacterium 7H11 agar versus Löwenstein-Jensen medium. **Mikrobiyoloji Bülteni**, v.19, n. 2, p. 88-94, 1985.

ERLER, W.; MARTIN, G.; SACHSE, K.; NAUMANN, L.; KAHLAU, D.; BEER, J.; BARTOS, M.; NAGY, G.; CVETNIC, Z.; ZOLNIR-DOVC, M.; PAVLIK, I. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* isolates from Central Europe. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2234-2238, 2004.

GRANGE, J. M. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. **Tuberculosis**, v. 81, n.1-2, p. 71-777, 2001.

GARG, S. K.; TIWARI, R. P.; TIWARI, D.; SINGH, R.; MALHOTRA, D., RAMNANI, V.K.; PRASAD, G. B.; CHANDRA, R.; FRANZIANO, M.; COLIZZI, V.; BISEN, P. S. Diagnosis of tuberculosis: available technologies, limitations, and possibilities. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 17, n. 5, p. 155-163, 2003.

IDIGORAS, P.; PÉREZ-TRALLERO, E.; ALCORTA, M.; GUTIÉRREZ, C.; MUÑOZ-BAROJA, I. Rapid detection of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria by microscopic observation of growth on Middlebrook 7H11 agar. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 6-10, 1995.

KANTOR, I. N. **Bacteriología de la tuberculosis humana y animal**. Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud, 1988. 63 p. (Serie de Monografías Científicas y Técnicas; 11).

KANTOR, I. N.; RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 5-14, 1994.

KANTOR, I. N.; RITACCO, V. An update on bovine tuberculosis programs in Latin American and Caribbean countries. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 111-118, 2006.

KAUFMANN, S. H. E.; WINAU, F. From bacteriology to immunology: the dualism of specificity. **Nature Immunology**, v. 11, n. 6, p. 1063-1066, 2005.

KOCAGOZ, T.; YILMAZ, E.; OZKARA, S.; KOCAGOZ, S.; HAYRAN, M.; SACHEDEVA, M.; CHAMBERS, H. F. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by Polymerase Chain Reaction using a simplified procedure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 6, p. 1435-1438, 1993.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; LANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JUNIOR, W. C. **Diagnóstico microbiológico. Texto e Atlas colorido**. 5 ed. Rio de Janeiro: Editora Medsi, 2001. 1465 p.

LANGENEGGER, J.; LANGENEGGER, C. H.; OLIVEIRA, J. D. Tratamento da tuberculose bovina com isoniazida. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 1, p.1-6, 1981.

LEITE, C. Q. F.; ANNO, I. S.; LEITE, S. R. A.; ROXO, E.; MORLOCK, G. P.; COOKSEY, R. C. Isolation and identification of *Mycobacteria* from livestock specimens and milk obtained in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p. 319-323, 2003.

LIU, P. I.; MCGREGOR, D.H.; FAUCHER, I.; JINKS, W. I.; MILLER, L. A.; GREEN, L.; LIU, J. G. Comparison of three culture media for isolation of *Mycobacterium tuberculosis*: a 6-year study. **Applied Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 880-883, 1973.

LOPES, L. B.; CUNHA, A. P.; MOTA, R. A.; LEITE, R. C. Comparação de duas técnicas de tuberculinização em búfalos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 2, p. 187-191, 2006.

MARCONDES, A. G. **Padronização da técnica de cultivo em camada delgada de ágar Middlebrook 7H11 para isolamento de *Mycobacterium bovis***. 2002. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MARCONDES, A. G.; SHIKAMA, M. L. M.; VASCONCELLOS, S. A.; BENITES, N. R.; MORAIS, Z. M.; ROXO, E.; DIAS, R. A.; LEÃO, S. L. P. C.; PINHEIRO, S. R. 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**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 362-369, 2006.

MEJIA, G. I.; CASTRILLON, H.; TRUJILLO, J. A.; ROBLEDO, J. A. Microcolony detection in 7H11 thin layer culture is an alternative for rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases**, v. 3, n. 2, p.138-142, 1999.

MORATO, F. **Avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes químicos utilizando a técnica de cultivo em camada de ágar Middlebrook 7H11**. 2007. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

- MORATO, F.; DIAS, R. A.; GONÇALES, A. P.; SOUZA, G. O.; PEREIRA, J. J.; PINHEIRO, S. R. Utilização de uma técnica rápida em camada delgada para avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes químicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 1, p. 1-7, 2009.
- MOTA, P. M. P. C.; LOBATO, F. C. F.; ASSIS, R. A.; LAGE, A. P.; PARREIRAS, P. M.; LEITE, R. C. Ocorrência de tuberculose em rebanhos bubalinos (*Bubalus bubalis* var. *bubalis*-Linneus, 1758) no Município de Parintins, Amazonas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 4, p. 441-443, 2002.
- NEILL, S. D.; POLLOCK, J. M.; BRYSON, D. B.; HANNA, J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 41-52, 1994.
- O'REILLY, L. M.; DABORN, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. **Tuberculosis Lung Diseases**, v. 76, p. 1-46, 1995. Supplement.
- OGUSKU, M. M.; SALEM, J. I. Análise de diferentes *primers* utilizados na PCR visando ao diagnóstico da tuberculose no Estado do Amazonas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 4, p. 343-349, 2004.
- PARDO, R. B. **Isolamento de *Mycobacterium* spp. do leite de vacas suspeitas e positivas para tuberculose, segundo o Teste de Stormont**. 1998. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.
- PINHEIRO, S. R.; VASCONCELOS, S. A.; ITO, F. H.; FERREIRA NETO, J. S.; MORAIS, Z. M. Influência da matéria orgânica na atividade micobactericida de cinco desinfetantes de uso pecuário. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 29, n. 1, p. 51-60, 1992.
- PINHEIRO, S. R. Controle da tuberculose bovina *versus* tratamento. **Biológico**, v. 62, n. 2, p. 157-160, 2000.
- POLLOCK, J. M.; WELSH, M. D.; McNAIR, J. Immune responses in bovine tuberculosis: towards new strategies for the diagnosis and control of disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, p. 37-43, 2005.
- RITACCO, V.; LÓPEZ, B.; KANTOR, I. N.; BARRERA, L.; ERRICO, F.; NADER, A. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. **Research in Veterinary Science**, v. 50, p. 365-367, 1991.



ROBLEDO, J. A.; MEJIA, G. I.; MORCILLO, N.; CHACÓN, L.; CAMACHO, M.; LUNA, J.; ZURITA, J.; BODON, A.; VELASCO, M.; PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; PORTAELS, F. Evaluation of a rapid culture method for tuberculosis diagnosis: a Latin American multi-center study. **International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases**, v. 10, n. 6, p. 613-619, 2006.

RODRIGUEZ, J. G.; MEJIA, G. I.; DEL PORTILLO, P.; PATARROYO, M. E.; MURILLO, L. A. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. **Microbiology**, v. 141, p. 2131-2138, 1995.

RORING, S.; HUGHES, M. S.; SKUCE, R. A.; NEILL, S. D. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue specimens by spoligotyping. **Veterinary Microbiology**, v. 74, p. 227-236, 2000.

ROSEMBERG, J. Mecanismo imunitário da tuberculose: síntese e atualização. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 9, n. 1, p. 35-59, 2001.

ROSWURM, J. D.; RANNEY, A. F. Sharpening the attack on bovine tuberculosis. **American Journal of Public Health**, v. 63, n. 10, p. 884-886, 1973.

ROXO, E. Tuberculose bovina: revisão. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 63, n. 2, p. 91-97, 1996.

ROXO, E.; IKUNO, A. A.; FERREIRA, V. C. A.; HARAKAVA, R.; RUGGIERO, A. P. M.; VIALTA, A. Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA de *Mycobacterium bovis* a partir de leite. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, p. 46, 2002. Suplemento.

ROXO, E. **Tuberculose humana e animal**. 2008. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_1/tuberculose/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_1/tuberculose/index.htm)>. Acesso em: 20 maio 2009.

RUA-DOMENECH, R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 86, p. 77-109, 2006.

RUA-DOMENECH, R.; GOODCHILD, A. T.; VORDERMEIER, H. M.; HEWINSON, R. G.; CHRISTIANSEN, K. H.; CLIFTON-HADLEY, R. S. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests,  $\gamma$ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 190-210, 2006.

RUGGIERO, A. P.; IKUNO, A. A.; FERREIRA, V. C. A.; ROXO, E. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 1, p. 55-65, 2007.

SALO, W. L.; AUFDERHEIDE, A. C.; BUIKSTRA, J.; HOLCOMB, T. A. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 2091-2094, 1994.

SAKAMOTO, S. M.; HEINEMANN, M. B.; TELLES, M. A. S.; ROXO, E.; RICHTZENHAIN, L. J.; VASCONCELLOS, S. A.; FERREIRA NETO, J. S. Detecção e identificação de *Mycobacterium bovis* pela reação em cadeia da polimerase (PCR). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 66, n. 2, p. 44-58, 1999.

SILVA, P. E. A.; WIESEL, F.; BOFFO, M. M. S.; VON GROLL, A.; MATTOS, I. G. MEJIA, G.; ROBLEDO, J. Microcolony detection in thin layer culture as an alternative method for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 421-423, 2007.

SIMPSON, D. M.; REED, R. W. Slide culture of tubercle bacilli. IV: Further diagnostic trials. **American Journal of Public Health Nations Health**, v. 48, n. 9, p. 1153-1161, 1958.

SNIDER, J. D. E.; MONTAGNE, J. R. L. The neglected global tuberculosis problem: a report of the 1992 World Congress on Tuberculosis. **Journal of Infectious Disease**, v. 169, p. 1189-1196, 1994.

SUNDRE, P.; DAM, G.; KOCHI, A. Tuberculosis: A global overview of the situation today. **Bulletin WHO**, v. 70, p. 149-159, 1992.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 720 p.

UNIVERSIDAD DE LAS NACIONES UNIDAS. Programa de biotecnología para Latinoamérica y el Caribe – BIOLAC. Red Latinoamericana y del Caribe de tuberculosis – RELACTB. **Nuevas tecnologías para el diagnóstico y pruebas de susceptibilidad a drogas de *M. tuberculosis* para países en vías de desarrollo**. La Paz, Bolivia: UNU, 1998, p.18-21.

VERA, A. Supervivência de *Mycobacterium bovis* em água. **Revista Cubana de Ciências Veterinárias**, v. 15, n. 3-4, p. 243-247, 1984.

VITALE, F.; CAPRA, G.; MAXIA, L.; REALE, S.; VESCO, G.; CARACAPPA, S.

Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates, and nasal swabs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 1050–1055, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of the WHO meeting on zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*)**. Geneva. WHO, 1993. 27 p. (Nota Técnica, 130).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO/EMC/ZOO 96.4. **Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex**. 2 ed. 1996. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/hq/1996/WHO\\_EMC\\_ZOO\\_96.4.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1996/WHO_EMC_ZOO_96.4.pdf). Acesso em 30 junho 2010.

ZANINI, M. S.; MOREIRA, E. C.; LOPES, M. T. P.; OLIVEIRA, R. S.; LEÃO, S. C.; FIORAVANTI, R. L.; ROXO, E.; ZUMARRAGA, M.; ROMANO, M. I.; CATALDI, A.; SALAS, C. E. *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymph node biopsies and genotyping in isolates from southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 2809-2813, 2001.

ZINK, A. R.; SOLA, C.; REISCHL, U.; GRABNER, W.; RASTOGI, N.; WOLF, H.; NERLICH, A. G. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Complex DNAs from egyptian mummies by Spoligotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 359–367, 2003.



## APÊNDICE A – Identificação e procedência das amostras

| NÚMERO | ORIGEM                              | ÓRGÃO                   | ESPÉCIE  | OBSERVAÇÃO        |
|--------|-------------------------------------|-------------------------|----------|-------------------|
| 01     | Frig. COWPIG                        | Linfonodo mediastínico  | Bovino   | Controle Negativo |
| 02     | Frig. COWPIG                        | Linfonodo mediastínico  | Bovino   | Controle Negativo |
| 03     | Frig. COWPIG                        | Linfonodo mediastínico  | Bovino   | Controle Negativo |
| 04     | Frig. COWPIG                        | Linfonodo mediastínico  | Bovino   | Controle Negativo |
| 05     | Frig. COWPIG                        | Linfonodo mediastínico  | Bovino   | Controle Negativo |
| 06     | Frig. COWPIG                        | Linfonodo mediastínico  | Bovino   | Controle Negativo |
| 07     | Frig. COWPIG                        | Linfonodo mediastínico  | Bovino   | Controle Negativo |
| 08     | Frig. COWPIG                        | Linfonodo mediastínico  | Bovino   | Controle Negativo |
| 09     | Frig. COWPIG                        | Linfonodo mediastínico  | Bovino   | Controle Negativo |
| 10     | Frig. COWPIG                        | Linfonodo mediastínico  | Bovino   | Controle Negativo |
| 11     | Instituto Biológico                 | Linfonodo mediastínico  | Bubalino | Amostra           |
| 12     | Instituto Biológico                 | Útero                   | Bubalino | Amostra           |
| 13     | Instituto Biológico                 | Linfonodo               | Bubalino | Amostra           |
| 14     | Instituto Biológico                 | Baço                    | Bubalino | Amostra           |
| 15     | Instituto Biológico                 | Linfonodo               | Bubalino | Amostra           |
| 16     | Instituto Biológico                 | Pulmão                  | Bubalino | Amostra           |
| 17     | Instituto Biológico                 | Linfonodo               | Bubalino | Amostra           |
| 18     | Instituto Biológico                 | Linfonodo               | Bubalino | Amostra           |
| 19     | Instituto Biológico                 | Linfonodo               | Bubalino | Amostra           |
| 20     | Instituto Biológico                 | Linfonodo               | Bubalino | Amostra           |
| 21     | Instituto Biológico                 | Linfonodo               | Bubalino | Amostra           |
| 22     | Instituto Biológico                 | Linfonodo               | Bubalino | Amostra           |
| 23     | Instituto Biológico                 | Linfonodo               | Bubalino | Amostra           |
| 24     | Instituto Biológico                 | Linfonodo               | Bubalino | Amostra           |
| 25     | Instituto Biológico                 | Linfonodo               | Bubalino | Amostra           |
| 26     | Instituto Biológico                 | Linfonodo               | Bubalino | Amostra           |
| 27     | Instituto Biológico                 | Linfonodo               | Bubalino | Amostra           |
| 28     | Instituto Biológico                 | Linfonodo               | Bubalino | Amostra           |
| 29     | Instituto Biológico                 | Linfonodo               | Bubalino | Amostra           |
| 30     | Instituto Biológico                 | Rim                     | Bovino   | Amostra           |
| 31     | Instituto Biológico                 | Pulmão                  | Bovino   | Amostra           |
| 32     | Instituto Biológico                 | Linfonodo               | Bovino   | Amostra           |
| 33     | Instituto Biológico                 | Linfonodo               | Bovino   | Amostra           |
| 34     | Instituto Biológico                 | Fígado                  | Bovino   | Amostra           |
| 35     | Instituto Biológico                 | Órgão não identificado  | Bovino   | Amostra           |
| 36     | Instituto Biológico                 | Órgão não identificado  | Bovino   | Amostra           |
| 37     | Instituto Biológico                 | Órgão não identificado  | Bovino   | Amostra           |
| 38     | Instituto Biológico                 | Órgão não identificado  | Bovino   | Amostra           |
| 39     | Instituto Biológico                 | Órgão não identificado  | Bovino   | Amostra           |
| 40     | Instituto Biológico                 | Órgão não identificado  | Bovino   | Amostra           |
| 41     | Instituto Biológico                 | Órgão não identificado  | Bovino   | Amostra           |
| 42     | Instituto Biológico                 | Fígado                  | Bovino   | Amostra           |
| 43     | Instituto Biológico                 | Órgão não identificado  | Bovino   | Amostra           |
| 44     | Instituto Biológico                 | Linfonodo               | Bovino   | Amostra           |
| 45     | Instituto Biológico                 | Linfonodo               | Bovino   | Amostra           |
| 46     | Instituto Biológico                 | Linfonodo pré-escapular | Bovino   | Amostra           |
| 47     | Instituto Biológico                 | Órgão não identificado  | Bovino   | Amostra           |
| 48     | Laboratório de Zoonoses Bacterianas | Pulmão                  | Bovino   | Amostra           |
| 49     | Instituto Biológico                 | Órgão NI                | Bovino   | Amostra           |



## ANEXO A – Método de preparo do meio de Stonebrink

**Base de sais**

|  |        |
|--|--------|
| Fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).....                        | 3,5 g  |
| Fosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )..... | 2,0 g  |
| Piruvato de sódio.....   | 6,25 g |
| Água destilada q.s.p.....  | 500 mL |

**OBS:** caso se utilize fosfato dissódico com 12 moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$ , utilizar 4,0 g.

Se for o fosfato dissódico anidro, utilizar 1,59 g.

|  |          |
|--|----------|
| Conteúdo de $\approx 20$ ovos (suspensão)..... | 1.000 mL |
| Solução aquosa de verde de malaquita a 2%..... | 20 mL    |

Dissolver os sais na água destilada e autoclavar a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Aguardar esfriar a base e acrescentar os ovos e o verde de malaquita. Homogeneizar em agitador magnético por uma hora. Filtrar em gaze estéril (dobrada em quatro) e distribuir nos tubos. Coagular<sup>11</sup> a  $80^\circ\text{C}$  por 30 minutos.

---

<sup>11</sup> Coaguladora vertical ELETROLAB – Câmara climática

## ANEXO B – Método de preparo do Meio de Middlebrook 7H11 modificado acrescido de piruvato de sódio

|   |         |
|---|---------|
| Ágar Middlebrook 7H11.....                                    | 18,0 g  |
| Hidrolisado de Caseína (digestão pancreática de caseína)..... | 1,0 g   |
| Piruvato de Sódio.....  | 0,445 g |
| Água Destilada.....   | 900 mL  |
| Enriquecimento OADC <sup>12</sup> .....                       | 100 mL  |

Misturar no Erlenmeyer o ágar, a caseína e o glicerol. Acrescentar a água destilada pelas paredes para evitar a formação de espuma. Depois de misturado, agitar lentamente para que o glicerol se misture com a solução. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Aguardar o resfriamento a 50-56°C e adicionar assepticamente o enriquecimento OADC. O enriquecimento deve ser retirado da geladeira antes para que esteja na temperatura ambiente no momento de ser adicionado ao meio. Homogeneizar novamente, cuidando para evitar a formação de bolhas. Distribuir em placas e após a solidificação proceder aos testes de esterilidade por no mínimo 48 horas.

**OBS:** Na hora de distribuir, deixar a ponta da pipeta no canto da placa e descer o meio devagar para evitar a formação de bolhas. Não deixar descer todo o meio da pipeta; deixar um pouco de meio no funil da pipeta para que não fiquem bolhas.

---

<sup>12</sup> BBL™ - Middlebrook OADC Enrichment – Becton Dickson Microbiology Systems – Sparks, MD 21152



## ANEXO C – Preparo do ambiente de microaerofilia para incubação das placas com meio Middelbrook 7H11 modificado

### Preparo da solução de sulfato de cobre

|   |        |
|---|--------|
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O..... | 25 g   |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (PA).....  | 1,6 mL |
| Tween 80 <sup>13</sup> .....              | 1,0 mL |
| Água destilada q.s.p.....                 | 500 mL |

Depois de secas e vedadas, as placas são colocadas com a tampa para baixo em cubas de plástico tipo “Tuppeware”. Em um dos cantos da cuba é colocada uma placa de Petri vazia (aberta) contendo um chumaço de palha de aço comum e no outro canto outra placa vazia contendo uma pastilha de antiácido efervescente Sonrisal<sup>14</sup>. Em seguida, a palha de aço é molhada com 5,0 mL da solução de sulfato de cobre. A caixa então deve ser lacrada rapidamente com a película plástica<sup>15</sup> para evitar a entrada de ar.

---

<sup>13</sup> DIFCO

<sup>14</sup> SONRISAL® – Glaxo Smith Kline

<sup>15</sup> Parafilm M: American National Can™ - Chicago, IL 60631