SIMONE RODRIGUES AMBROSIO

Métodos bacteriológicos aplicados à tuberculose bovina: comparação de três métodos de descontaminação e de três protocolos para criopreservação de isolados

São Paulo

2005

SIMONE RODRIGUES AMBROSIO

Métodos bacteriológicos aplicados à tuberculose bovina: comparação de três métodos de descontaminação e de três protocolos para criopreservação de isolados

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Amaku

São Paulo

2005

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1570
FMVZ

Ambrosio, Simone Rodrigues
Métodos bacteriológicos aplicados à tuberculose bovina: comparação de três métodos de descontaminação e de três protocolos para criopreservação de isolados / Simone Rodrigues Ambrosio. – São Paulo : S. R. Ambrosio, 2005.
61 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2005.

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Amaku.

1. *Mycobacterium bovis*. 2. Descontaminação. 3. HPC. 4. Criopreservação. 5. 7H9. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Aperfeiçoamento de métodos bacteriológicos aplicados à tuberculose bovina: comparação de três métodos de descontaminação e de quatro protocolos para manutenção dos isolados em laboratório", protocolo nº328/2003, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcos Amaku, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendun".

(We certify that the Research "Improvement of bacteriologic methods applied to bovine tuberculosis: comparison of three decontamination methods and four protocols of isolates maintenance in laboratory", protocol number 328/2003, under the responsibility of Prof. Dr. Marcos Amaku, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendun").

São Paulo, 06 de agosto de 2003

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 - 05508-000 - Cid. Univ. "Armando de Salles Oliveira"
Fones: (011) 3091-7671/3091-7676 Fax: (011) 3032-2224

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: AMBROSIO, Simone Rodrigues

Título: Métodos bacteriológicos aplicados à tuberculose bovina: comparação de três métodos de descontaminação e de três protocolos para criopreservação de isolados

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

Data:___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura:_____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

"Ao meu pai, minha mãe, meu irmão, minha irmã e minha querida mel por me apoiarem nesta trajetória tão importante de minha vida, agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de fazer parte desta família tão maravilhosa, muito obrigada!"

"Aos meus querido animais de estimação que fizeram e fazem parte de minha vida, sempre carinhosos e companheiros. Meu querido Thorzinho, minha amada Tequinha, minha querida Darinha, meus amores Tuca, Laika, Leka, Meg, Tina e Nina"

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Marcos Amaku, por ter me aceitado como sua orientada, pela paciência, dedicação e pelo carinho que sempre teve comigo, muito obrigada.

Ao Professor Doutor José Soares Ferreira Neto, por ter me ajudado desde o início, me dando a oportunidade de ingressar no curso de pós-graduação no LZB, pela experiência e orientações, minha gratidão.

À Professora Doutora Eugênia Márcia de Deus Oliveira, por tudo, seu companheirismo, sua dedicação, sua paciência e principalmente pela sua amizade. Tenho por você um carinho muito especial e total admiração.

Ao Professor Doutor Silvio Arruda Vasconcellos e aos Professores do Curso de Pós-Graduação, pela experiência, orientação e aprendizado.

À Zenaide Maria de Morais e Gisele Oliveira de Sousa, duas pessoas muito especiais, cuidadosas, prestativas, conselheiras. Obrigada pela ajuda.

À Patrícia (Paty Pink), sempre disposta a me ajudar, tantos sábados e domingos que trabalhamos juntas, minha profunda gratidão.

Aos amigos de pós-graduação e funcionário do VPS, César (Pancho), Daniela, Lara, Cristina, Leandro, Amane, Daniel, Ricardo, Fabio, Paulo, Laura, Patrícia, Rísia, Vanessa, Simone, Silvio, Rodrigo, Jucélia, Sandrinha, Alexandre e tantos outros. Obrigada pelo incentivo e amizade.

Às minhas amigas especiais, Daniela, Gisele, Luciana e Mariana por estarem sempre ao meu lado, me dando a força necessária, para que eu seguisse em frente, companheiras e leais.

Aos meus queridos amigos e amigas que acompanharam esta trajetória importante de minha vida, Prof. Dr. Edson Lara, Prof. MSc. Antenor Aguiar, Eduardo Amaral, Prof. MSc. Marcelo Gomes, Roberta, Juliana Peboni, Lynn, Melissa, Cristiane, Daniel, Eduardo Andrade, Prof. Dr. Celso Martins, Patrícia Cunha, Eduardo Olivério, Débora e Valter Monteiro, Aline Vasconcelos, Fernanda Pena, Clívia Teixeira, Priscila, Elaine, Adriano Muraca e tantos outros, muito obrigada.

RESUMO

AMBROSIO, S. R. **Métodos bacteriológicos aplicados à tuberculose bovina**: comparação de três métodos de descontaminação e de três protocolos para criopreservação de isolados. [Bacteriologic methods applied to bovine tuberculosis: comparison of three decontamination methods and three protocols for cryopreservation of isolates]. 2005. 61 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdades de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Dada a importância do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), a necessidade de uma eficiente caracterização bacteriológica dos focos como ponto fundamental do sistema de vigilância e as dificuldades encontradas pelos laboratórios quanto aos métodos de isolamento de *Mycobacterium bovis* fizeram crescer o interesse do meio científico por estudos, sobretudo moleculares, de isolados *M. bovis*. Para a realização dessas técnicas moleculares, é necessária abundância de massa bacilar, obtida através da manutenção dos isolados em laboratório e repiques em meios de cultura. Entretanto o crescimento fastidioso do *M. bovis* em meios de cultura traz grandes dificuldades para essas operações. Assim sendo, o presente estudo teve por objetivos: 1°) Comparar três métodos de descontaminação para homogeneizados de órgãos, etapa que precede a semeadura em meios de cultura, onde 60 amostras de tecidos com lesões granulomatosas, provenientes de abatedouros bovinos do Estado de São Paulo, foram colhidas e imersas em solução saturada de Borato de Sódio e transportadas para o Laboratório de Zoonoses Bacterianas do VPS-FMVZ-USP, onde foram processadas até 60 dias após a colheita. Essas amostras foram submetidas a três métodos de descontaminação: Básico (NaOH 4%), Ácido (H_2SO_4 12%) e 1- Hexadecylpyridinium chloride a 1,5% (HPC) e o quarto método foi representado pela simples diluição com solução salina (controle). Os resultados foram submetidos à comparação de proporções, pelo teste de χ^2, na qual verificou-se que o método HPC foi o que apresentou menor proporção de contaminação (3%) e maior proporção de sucesso para isolamento de BAAR (40%). 2°) Comparar três

diferentes meios criopreservates para *M. bovis*, foram utilizados 16 isolados identificados pela técnica de *spoligotyping*. Cada um desses isolados foi solubilizado em três meios (solução salina, 7H9 original e 7H9 modificado), e armazenado em três diferentes temperaturas (-20ºC, -80ºC e -196ºC), sendo descongelado em três diferentes tempos (45, 90 e 120 dias de congelamento). Antes do congelamento e após o descongelamento foram feitos cultivos quantitativos em meios de Stonebrink Leslie. Os porcentuais de redução de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) nas diferentes condições foram calculados e comparados entre si através de métodos paramétricos e não-paramétricos. Os resultados obtidos foram: na análise da variável tempo, em 90 dias de congelamento foi observada uma maior proporção de perda de *M. bovis*, quando comparado ao tempo 120 dias ($p=0,0002$); na análise da variável temperatura, foi observada uma diferença estatística significativa entre as proporções de perda média nas temperaturas de -20°C e -80°C ($p<0,05$); na análise da variável meio, foi observada uma diferença significativa ($p=0,044$) entre os meios A e C, para 45 dias de congelamento e -20ºC de temperatura de criopreservação. Embora as medianas dos porcentuais de perdas de UFC terem sido sempre inferiores a 4,2%, permitiram sugerir que o melhor protocolo de criopreservação de isolados de *M. bovis* é solubilizá-los em 7H9 modificado e mantê-los à temperatura de -20°C.

Palavras-Chave: *Mycobacterium bovis*. Descontaminação. HPC. Criopreservação. 7H9

ABSTRACT

AMBROSIO, S. R. **Bacteriologic methods applied to bovine tuberculosis**: comparison of three decontamination methods and three protocols for cryopreservation of isolates. [Métodos bacteriológicos aplicados à tuberculose bovina: comparação de três métodos de descontaminação e de três Protocolos para criopreservação de isolados]. 2005. 61 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdades de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

In the context of the National Program of Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis (PNCEBT), the necessity of an efficient bacteriologic characterization of the infected herds as a cornerstone of the monitoring system and the difficulties faced by the laboratories regarding the methods for *Mycobacterium bovis* isolation led to a growing interest for scientific studies, especially molecular, of *M. bovis* isolates. To use these molecular techniques it is necessary to have an abundant bacillary mass, obtained through the maintenance of isolates in laboratory and replication in culture media. However the fastidious growth of *M. bovis* in culture media brings out great difficulties for these activities. Thus, the present study has the following objectives: First, to compare three decontamination methods for organ homogenates, phase that precedes the sowing in culture media, 60 samples of tissues with granulomatosis injuries, proceeding from bovine slaughterhouses in the State of São Paulo, were obtained, immersed in sodium borato saturated solution and transported to the Laboratório de Zoonoses Bacterianas of the VPS-FMVZ-USP, where they were processed up to 60 days after the sampling. These samples were submitted to three methods of decontamination: Basic NaOH 4%, Acid H2SO4 12% and 1- Hexadecylpyridinium chloride (HPC) 1.5% and a simple dilution with saline solution (control method). The results were analysed by means of the χ^2 test to compare proportions, and it was verified that HPC method presented the smallest proportion of contamination (3%) and the greatest proportion of success for *M. bovis* isolation (40%). Second, to compare three different cryopreservation media for *M. bovis*, 16 isolates identified by the technique of spoligotyping were used. Each one of these isolates was solubilized in three media

(original saline solution, 7H9 and 7H9 modified), and stored in three different temperatures (-20ºC, -80ºC and -196ºC), and defrosted in three different time periods (45, 90 and 120 days of freezing). Before the freezing and after the unfreezing, quantitative cultivations in Stonebrink Leslie media were carried out. The proportions of Colony-Forming Units (CFU) loss in the different conditions were calculated and compared with one another through parametric and non-parametric methods. The results obtained were: in the analysis of the variable time, at 90 days of freezing a bigger proportion of CFU loss was observed when compared to 120 days (p=0,0002); in the analysis of the variable temperature, a statistically significant difference was observed between the average proportions of CFU loss for the temperatures of -20°C and -80°C (p<0,05); in the analysis of the variable media, a significant difference was observed (p=0,044) between the media A and C, for 45 days of freezing and -20ºC of cryopreservation temperature. Althougth the medium ones of the proportion of losses of CFU to always have been inferior 4,2%, had allowed to suggest that the best protocol for cryopreservation of *M. bovis* isolates is to solubilize them in 7H9 modified medium and to keep them at a temperature of -20°C.

Key-words: *Mycobacterium bovis*. Decontamination. HPC. Cryopreservation. 7H9

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da execução dos protocolos de descontaminação realizados em homogeneizados de órgãos, visando o isolamento de *Mycobacterium bovis* 26

Figura 2 - Esquema descritivo da preparação e quantificação dos 16 isolados de *Mycobacterium bovis* antes do congelamento 29

Figura 3 - Esquema da quantificação das UFC de *Mycobacterium bovis* após os períodos de congelamento..... 31

Figura 4 - Esquema correspondente ao tempo de descongelamento 45 dias, onde podem ser observados os nove grupos resultantes das combinações das três temperaturas e dos três meios 32

Figura 5 - Esquema correspondente ao tempo de descongelamento 90 dias, onde podem ser observados os nove grupos resultantes das combinações das três temperaturas e dos três meios..... 33

Figura 6 - Esquema correspondente ao tempo de descongelamento 120 dias, onde podem ser observados os nove grupos resultantes das combinações das três temperaturas e dos três meios..... 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados do isolamento de BAAR e da ocorrência de contaminação segundo os métodos de descontaminação empregados e número de repetições. São Paulo, 2005..... 36-37

Tabela 2 - Proporção de perdas de UFC de *Mycobacterium bovis*/100µl depois de 45 dias de congelamento, segundo as repetições. São Paulo, 2005..... 39

Tabela 3 - Proporção de perdas de UFC de *Mycobacterium bovis*/100µl depois de 90 dias de congelamento, segundo as repetições. São Paulo, 2005..... 40

Tabela 4 - Proporção de perdas de UFC de *Mycobacterium bovis*/100µl depois de 120dias de congelamento, segundo as repetições. São Paulo, 2005 40

Tabela 5 - Resultados da comparação das proporções de perdas de UFC *de M. bovis*/100µl entre os grupos para a variável tempo de congelamento. São Paulo, 2005 41

Tabela 6 - Resumo estatístico da comparação das proporções de perdas de UFC de *M. bovis*/ 100µl para a variável tempo de congelamento, segundo os grupos consolidados para as variáveis meios de cultura e temperatura de congelamento. São Paulo, 2005..... 41

Tabela 7 - Resultados da comparação das proporções das perdas de UFC *de M. bovis*/100µl entre os grupos para a variável temperatura de congelamento. São Paulo, 2005..... 43

Tabela 8 - Resumo estatístico da comparação das proporções de perdas de UFC de *M. bovis*/100µl para a variável temperatura de congelamento, segundo os grupos consolidados para as variáveis meios de cultura e tempo de descongelamento. São Paulo, 2005..... 43

Tabela 9 - Resultados da comparação das perdas de UFC *de M. bovis*/100µl entre os grupos para a variável meio de conservação. São Paulo, 2005..... 44

Tabela 10 - Resumo estatístico da comparação das perdas de UFC de *M. bovis*/100µl para a variável meio de conservação, segundo os grupos consolidados para as variáveis tempo de descongelamento e temperatura de congelamento. São Paulo, 2005..... 45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Proporções de isolamento de *Mycobacterium bovis*, submetidas aos três diferentes métodos descontaminantes e controle 38

Gráfico 2 - Proporções de contaminação de *Mycobacterium bovis*, submetidas aos três diferentes métodos descontaminantes e controle 38

Gráfico 3 - Diagrama de blocos para proporção de perdas de UFC de M. bovis/100µl para a variável tempo de descongelamento, segundo os grupos consolidado para as variáveis meios de cultura e temperatura de congelamento 42

Gráfico 4 - Diagrama de blocos da proporção de perdas de UFC de *M. bovis*/100µl para a variável temperatura de congelamento, segundo os grupos consolidados para as variáveis meios de cultura e temperatura de congelamento 44

Gráfico 5 - Gráfico de blocos das proporções das perdas de UFC de M. bovis/100µl para a variável meio de conservação, segundo os grupos consolidados para as variáveis meios de cultura e temperatura de congelamento 46

Gráfico 6 - Gráfico de blocos das proporções das perdas de UFC de M. bovis/100µl para a variável meio de conservação, segundo os grupos A1XB1XC1 46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

VPS	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
LZB	Laboratório de Zoonoses Bacterianas
FMVZ-USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
PNCETB	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Tuberculose e Brucelose Animal
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
VNTR	Variable Number Tandem Repeat
µL	Microlitro
mL	Mililitro
M. bovis	*Mycobacterium bovis*
UFC	Unidade formadora de colônia
HPC	Cloreto de hexadecilpiridínio
NaOH	Hidróxido de sódio
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
CPC	Cloreto de cetilpiridínio
HCl	Ácido clorídrico
χ^2	Qui-quadrado
pH	Concentração de hidrogênio iônico
N	Normal
RPM	Rotações por minuto
DNA	Ácido desoxirribonucléico
RFLP	Restriction Fragment Lenght Polymorphism

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 18
2 OBJETIVOS 23
3 MATERIAL E MÉTODO 24
3.1EXPERIMENTO 1: COMPARAÇÃO DE TRÊS PROTOCOLOS DE DESCONTAMINAÇÃO 24
3.1.1 Delineamento Experimental 24
3.1.1.1 Método Básico – Petroff modificado (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS) 24
3.1.1.2 Método Ácido – Lowenstein-Jensen (ROMÁN, 1990) 25
3.1.1.3 Método HPC – Cloretro de 1-Hexadecilpiridinio (CORNER; TRAJSTAMAN, 1988) 25
3.1.1.4 Controle 25
3.1.2 Tratamento dos Dados 27
3.2 EXPERIMENTO 2: COMPARAÇÃO DE TRÊS PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVAÇÃO 27
3.2.1 Delineamento Experimental 27
3.2.1.1 Isolados 27
3.2.1.2 Preparação das Soluções-mãe 28
3.2.1.3 Meios de conservação 28
3.2.2 Tratamento dos Dados 32
4 RESULTADOS 36
4.1 RESULTADOS EXPERIMENTO 1 36
4.2 RESULTADOS EXPERIMENTO 2 39
5 DISCUSSÃO 47
5.1 DISCUSSÃO EXPERIMENTO 1 47
5.2 DISCUSSÃO EXPERIMENTO 2 49
5.2.1 Tempo 50
5.2.2 Temperatura 51
5.2.3 Meio 52
6 CONCLUSÕES 53
REFERÊNCIAS 54
ANEXO A 59
ANEXO B 60
ANEXO C 61

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma efermidade infecto-contagiosa de distribuição mundial, de grande importância econômica e sanitária nos países afetados. Nos seres humanos a infecção é causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*, mas provavelmente é o patógeno *M. bovis*, próprio dos animais, o agente zoonótico mais importante na história da humanidade (ABALOS; RETAMAL, 2004). Apesar do controle da infecção por *Mycobacterium bovis* nos animais, conseguido em muitos países, com uma conseqüente diminuição da infecção humana, nos últimos anos a tuberculose é considerada um problema reemergente em vista do aparecimento de cepas multiresistentes aos antibióticos de eleição para o tratamento da infecção em seres humanos, a disseminação do vírus da imunodeficiência humana, do estabelecimento de reservatórios silvestres e da persistência no rebanho doméstico, especialmente nas regiões em desenvolvimento. O esforço conjunto dos sistemas de saúde pública e sanidade animal, para o melhoramento do diagnóstico e desenvolvimento de vacinas mais efetivas para a prevenção da infecção é a principal estratégia para o controle desta enfermidade (ABALOS; RETAMAL, 2004).

O *Mycobacterium bovis* é a principal micobactéria causadora da tuberculose bovina, uma zoonose de grande importância. Sua prevalência é maior em países subdesenvolvidos, em desenvolvimento e menor nos países desenvolvidos (FERREIRA NETO; BERNARDI, 1997). A tuberculose bovina, apesar de ter sido erradicada ou eficientemente controlada em vários países, continua sendo um grande problema para a evolução pecuária de um grande número de países em desenvolvimento.

Apesar de algumas iniciativas, o Brasil, até agora, não observou melhoras significativas da situação epidemiológica da doença no seu território. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) brasileiro, verificando a ineficácia das medidas até recentemente

adotadas, em 11 de janeiro de 2001, instituiu o Programa Nacional de Controle Erradicação da Brucelose e Tuberculose (BRASIL, 2005).

Os dados de notificações oficiais de tuberculose bovina indicam uma prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados, no período de 1989 a 1998. Um levantamento realizado em 1999, no Triângulo Mineiro e nas regiões do centro e sul de Minas Gerais, envolvendo aproximadamente 1.600 propriedades e 23.000 animais, estimou a prevalência aparente de animais infectados em 0,8%. No mesmo estudo, foram detectadas 5% propriedades com animais reagentes, sendo importante destacar que este valor subiu a 15% no universo de propriedades produtoras de leite com algum grau de mecanização da ordenha e de tecnificação da produção (BELCHIOR, 2000). Os objetivos do programa são baixar a prevalência e a incidência da brucelose e tuberculose bovina e criar um número significativo de propriedades certificadas que ofereçam produtos que proporcionem baixo risco sanitário (www.agricultura.gov.br).

Tradicionalmente inicia-se o combate à tuberculose bovina com estratégias de controle, que têm como objetivo a diminuição constante do número de focos, o que é feito através da certificação de propriedades livres, que envolve a realização de testes indiretos em massa e operações de saneamento quando animais positivos são detectados. Esse procedimento demanda alto investimento e uma redução importante na prevalência de focos é alcançada no médio e longo prazo (KANTOR, 1994).

Após o que, passa-se para a fase de erradicação, onde o objetivo é a eliminação de todos os focos. Essa transição é feita através da adoção de sistema de vigilância para detecção e saneamento de focos. Uma boa alternativa é utilizar as informações de abatedouros como base desse sistema (BROWN et al., 1998). Portanto, as lesões são colhidas em abatedouros, enviadas ao laboratório e, após a confirmação bacteriológica do foco, rastreia-se a propriedade de origem, que é saneada através de uma rotina de testes tuberculínicos e

sacrifício dos animais reagentes. Assim sendo, o diagnóstico direto, isto é, o isolamento, a identificação da espécie da micobactéria envolvida e a discriminação molecular dos isolados de *M. bovis* são elementos de grande importância para o sistema.

Embora o Brasil tenha iniciado seu programa em 2001, existe uma expectativa de baixa prevalência de focos, fato já confirmado em Minas Gerais (BELCHIOR, 2000). Provavelmente essa prevalência seja muito baixa nos estados produtores de carne da região central. Portanto, o País deve considerar a possibilidade da implantação de um sistema de vigilância para detecção e eliminação de focos mais eficiente que a utilização em massa do teste tuberculínico. Isso traria maior velocidade e racionalidade ao combate da doença.

Sendo a caracterização bacteriológica do foco, a partir de abatedouro, a base do sistema, sua sensibilidade dependerá da sensibilidade dos métodos de isolamento utilizados. A melhor forma de se detectar o *M. bovis* em fragmentos de tecidos é através da bacteriologia clássica (WAYNE; KUBICA, 1986), ou seja, a descontaminação da amostra seguida da semeadura em meios de cultura sólidos denominados Lowenstein-Jensen e Stonebrink Lesslie para posterior incubação a 37°C por até 60 dias (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1973). É possível descontaminar essas amostras, pois as micobactérias apresentam uma parede celular bastante robusta, constituída de ácidos micólicos de cadeia longa, com 60 a 90 átomos de carbono, que provavelmente sejam os responsáveis pela relativa resistência a produtos desinfetantes e descontaminantes (MEIRELES NETO, 1982).

A descontaminação da amostra tem por objetivo inativar outras bactérias presentes na amostra, pois se estiverem presentes, crescerão mais rapidamente, esgotando os nutrientes do meio e inviabilizando o crescimento do *M. bovis.* Um dos métodos de descontaminação mais utilizados em medicina veterinária é o de Petroff, que utiliza NaOH a 2% com posterior neutralização com HCl a 1N, sendo tradicionalmente empregado em amostras de fragmentos de tecidos resfriados ou congelados (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1972;

DAVID et al., 1994; ROSEMBERG, 1990). Importante considerar que a taxa de contaminação da amostra pode variar de acordo com o tipo de material, forma como ele foi coletado e tempo de transporte até o laboratório (CORNER, 1994).

Além do método de Petroff, que utiliza o NaOH a 4%, várias outras substâncias têm sido utilizadas com o mesmo propósito: ácido sulfúrico a 12% (ROMÁN, 1990), ácido oxálico (CLAXTRON et al., 1979; JORGENSEN, 1982), cloreto de benzalcônio (ELLSWORTH et al., 1980), fosfato trissódico a 23% e fosfato monossódico a 20% (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1973), cloreto de sódio (DAVID et al., 1994) e cloreto de hexadecilpiridinio (SMITHWICK et al. 1975; WHIPPLE; MERKAL, 1983).

Portanto, esses produtos utilizados nos procedimentos de desontaminação deverão ser pouco agressivos para as micobactérias e, ao mesmo tempo, capazes de inativar a microbiota acompanhante. O balanço dessas duas capacidades, aliado ao grau de contaminação da amostra é que será o principal responsável pela sensibilidade do método de isolamento.

Uma vez isolada, a micobactéria deve ser identificada. A bacteriologia clássica utiliza como parâmetros de identificação a velocidade de crescimento, a produção de pigmento na presença e ausência de luz, o bioquimismo e a resistência a drogas, o que consome aproximadamente 4 semanas (KANTOR, 1988). Por conta desse longo tempo exigido pelos métodos clássicos, métodos moleculares têm sido investigados para essa finalidade. Atualmente, os métodos clássicos de identificação têm sido substituídos pelos moleculares, com grande abreviação do tempo. Os métodos mais empregados são o *PCR-PRA* (TELENTI et al., 1993), o *Spoligotyping* (KAMERBEEK et al. 1997) e o *MIRU* (GORDON et al., 1999; SUPPLY et al., 2000;), que além de permitir a identificação das espécies, também resultam em discriminação molecular de isolados de uma mesma espécie. Essa discriminação de

isolados torna possível a realização de estudos epidemiológicos que permitem o aperfeiçoamento dos métodos de controle e erradicação.

Porém, essas técnicas moleculares requerem uma grande quantidade de massa bacilar. Portanto, a manutenção dos isolados em laboratório e a subseqüente obtenção de boa quantidade de colônias têm que ser assegurada.

O isolamento do *M. bovis* é relativamente fácil, porém as amostras tendem a multiplicar-se de maneira fastidiosa nos repiques subseqüentes, o que compromete as análises moleculares. Na literatura existe referência à liofilização como forma de preservar os isolados em laboratório (GRUFT et al.,1968), porém essa metodologia tem como limitação o alto custo do liofilizador. Muitos laboratórios utilizam o congelamento como método alternativo, porém não foram encontrados estudos comparando a eficiência de diferentes protocolos de congelamento para preservar isolados de *M. bovis* em laboratório.

Em 2004 foi concluído o projeto: "Sistema de detecção de focos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo utilizando métodos moleculares e epidemiológicos". Nesse estudo foi possível verificar que existem 33 diferentes espoligotipos de *M. bovis* circulando na população bovina do Estado de São Paulo, os focos do espoligotipo SB0295 apresentaram-se de forma agrupada nas análises espaciais, foram geradas várias informações sobre a tipologia e o manejo das unidades de criação de bovinos caracterizadas como focos de tuberculose e que a atual infra-estrutura existente no Estado de São Paulo foi capaz de operar um sistema de detecção de focos de tuberculose bovina. (ROSALES RODRIGUEZ, 2005).

Nesse projeto as amostras foram colhidas em solução saturada de borato de sódio (Na2B4O7.10H2O) bórax, como meio conservante das lesões, que tem a vantagem de prescindir de resfriamento, dando um prazo de dois meses para o processamento em laboratório. Durante sua execução, também foram constatados problemas para a obtenção de boa quantidade de colônias para os testes moleculares e de armazenamento dos isolados.

2 OBJETIVOS

Haja vista o impacto que os métodos de descontaminação podem ter na sensibilidade da tentativa de isolamento de *M. bovis* e a dificuldade de se manter isolados desse agente em laboratório, o presente estudo tem por objetivos:

- Comparar três métodos de descontaminação em amostras suspeitas de tuberculose provenientes de abatedouro bovino, enviadas ao laboratório submersas em solução saturada de borato de sódio.

- Comparar três protocolos de criopreservação para isolados de *Mycobacterium bovis.*

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 EXPERIMENTO 1: COMPARAÇÃO DE TRÊS PROTOCOLOS DE DESCONTAMINAÇÃO

3.1.1 Delineamento Experimental

As amostras utilizadas foram 60 fragmentos de tecido com lesões sugestivas de tuberculose conservadas em solução saturada de borato de sódio. De cada lesão, foram pesados três gramas, homogeneizados com 10 mL de solução salina 0,85%, durante 1 minuto em *Stomacher*. Após tal procedimento, alíquotas de 1,0 mL foram submetidas aos métodos de descontaminação descritos abaixo. Na figura 1, podemos visualizar um esquema da metodologia empregada, para execução dos protocolos de descontaminação.

3.1.1.1 Método Básico – Petroff modificado (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1979; PINHEIRO, 1992)

A uma alíquota de 1,0 mL foi adicionado 1,0 mL de hidróxido de sódio (NaOH) a 4% e duas gotas de vermelho de fenol como indicador, incubou-se à 37ºC por 20 minutos. Após este período foi acrescentada a solução de ácido clorídrico (HCl) à 1N até a mudança de cor do vermelho para tijolo e estabilização do pH entre 6,5 e 7,0.

3.1.1.2 Método Ácido – Lowenstein-Jensen (ROMÁN, 1990)

A uma alíquota de 1,0 mL foi adicionado 1,0 mL de solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 12% e duas gotas de vermelho de fenol como indicador, incubou-se à 37ºC por 20 minutos. Após este período foi acrescentada a solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 4% até a mudança de cor amarela para tijolo e estabilização do pH entre 6,5 e 7,0.

3.1.1.3 Método HPC – Cloretro de 1-Hexadecilpiridinio (CORNER; TRAJSTAMAN, 1988)

A uma alíquota de 1,0 mL foi adicionado 1,0 mL de HPC a 1,5% (Anexo A) e posteriormente incubou-se à 37ºC, durante 20 minutos.

3.1.1.4 Controle

A uma alíquota de 1,0 mL foi adicionado 1,0 mL de solução salina a 0,85% estéril.

Após a realização dos quatro protocolos acima descritos, cada uma das amostras foi submetida à mesma seqüência técnica, constituída de: centrifugação a 2.500 r.p.m. por 20 minutos, desprezo do sobrenadante e ressuspensão do sedimento com 1,0 mL de solução salina à 0,85% estéril, e homogeneização da suspensão seguida de semeadura de 100 µl em meio Stonebrink Leslie (Anexo B), em duplicata, conforme figura 1. Os tubos foram

incubados em estufa à 37ºC, horizontalmente sob um ângulo de aproximadamente 30º e mantidos com as tampas semi-abertas até a completa secagem da superfície do meio. Em seguida foram mantidos em estufa, na posição vertical e examinados diariamente durante a primeira semana para crescimento de contaminantes. A partir daí, foram efetuadas leituras semanais até 90 dias de incubação, anotando o isolamento ou não de BAAR e a presença ou ausência de contaminação.

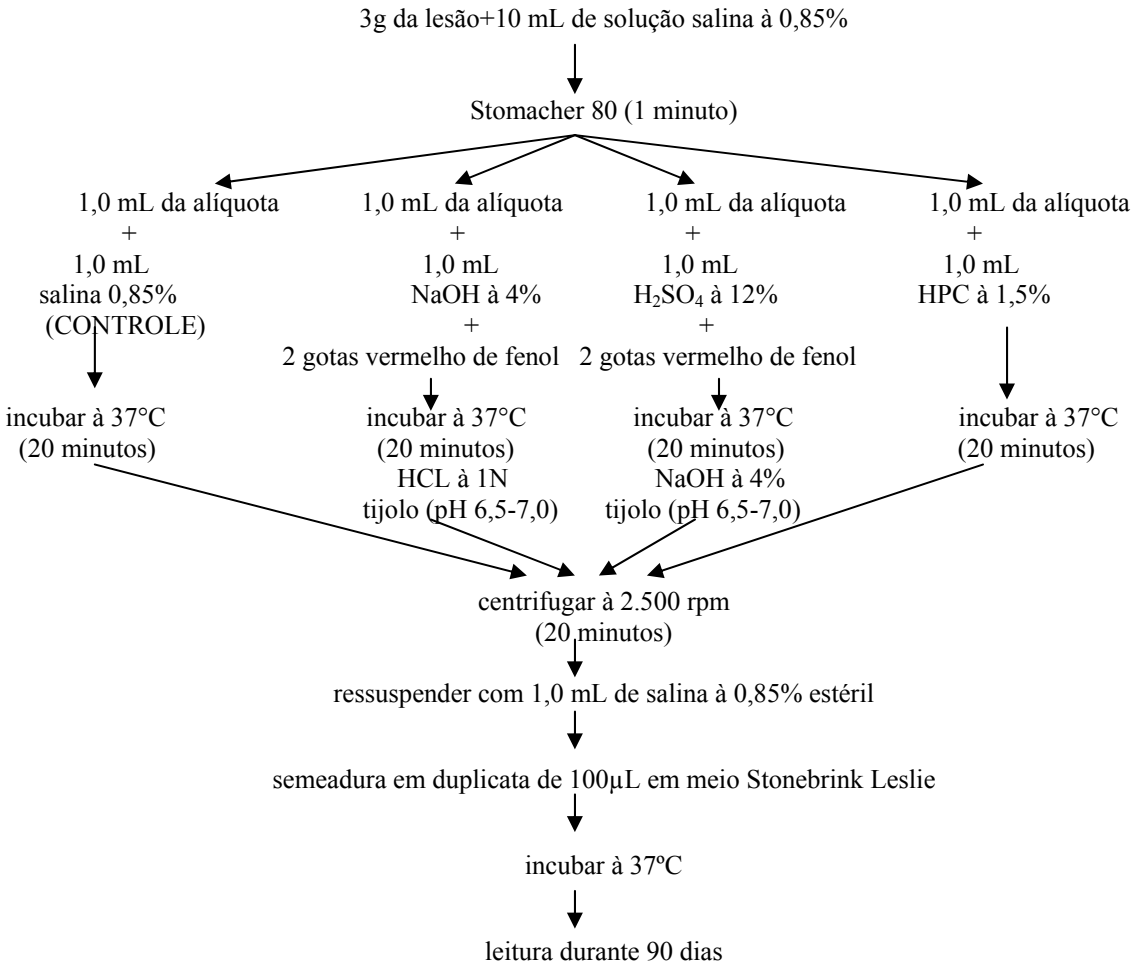

Figura 1 - Esquema da execução dos protocolos de descontaminação realizados em homogeneizados de órgãos, visando o isolamento de *Mycobacterium bovis*

3.1.2 TRATAMENTO DOS DADOS

As comparações das proporções dos sucessos no isolamento do *Mycobacterium bovis* entre os métodos descontaminantes e destes com o método controle foram feitas através do teste de χ^2. Também foram comparadas as proporções de insucessos (contaminação), utilizando a mesma metodologia.

3.2 EXPERIMENTO 2: COMPARAÇÃO DE TRÊS PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVAÇÃO

3.2.1 **Delineamento Experimental**

3.2.1.1 Isolados

Foram utilizados 16 isolados de *Mycobacterium bovis*, identificados pela técnica de spoligotyping (HERMANS et al., 1991), provenientes do projeto "Abatedouros como instrumento de rastreabilidade de focos de tuberculose bovina no estado de São Paulo. Mapeamento e epidemiologia molecular" (ROSALES RODRIGUEZ, 2005).

3.2.1.2 Preparação das Soluções-mãe

As colônias de cada um dos isolados foram removidas com alça bacteriológica umedecidas com *Tween* 80 e transferidas para tubo com 5,0 mL de solução salina. As 16 suspensões obtidas foram utilizadas para a preparação de 16 soluções-mãe, correspondentes à concentração 10^5 da escala de McFARLAND.

3.2.1.3 Meios de conservação

Cada uma das soluções mãe foi transferida para três diferentes meios de conservação: solução salina à 0,85% (A), 7H9 original (B), 7H9 enriquecido (C) (Anexo C), sempre na diluição 1:10. Para cada uma dessas 48 diluições iniciais obtidas, foram feitas outras três em solução salina (10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}). Todas as diluições foram semeadas em placas contendo meio de Stonebrink Leslie (100 µL/placa), em duplicata, e incubadas a 37ºC. Aos 30 dias de incubação foram feitas as leituras e os cálculos para a obtenção do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *M. bovis*/100 µL de diluição inicial. A diluição escolhida para a contagem foi sempre a maior delas na qual houve crescimento. A figura 2 mostra um esquema desse procedimento.

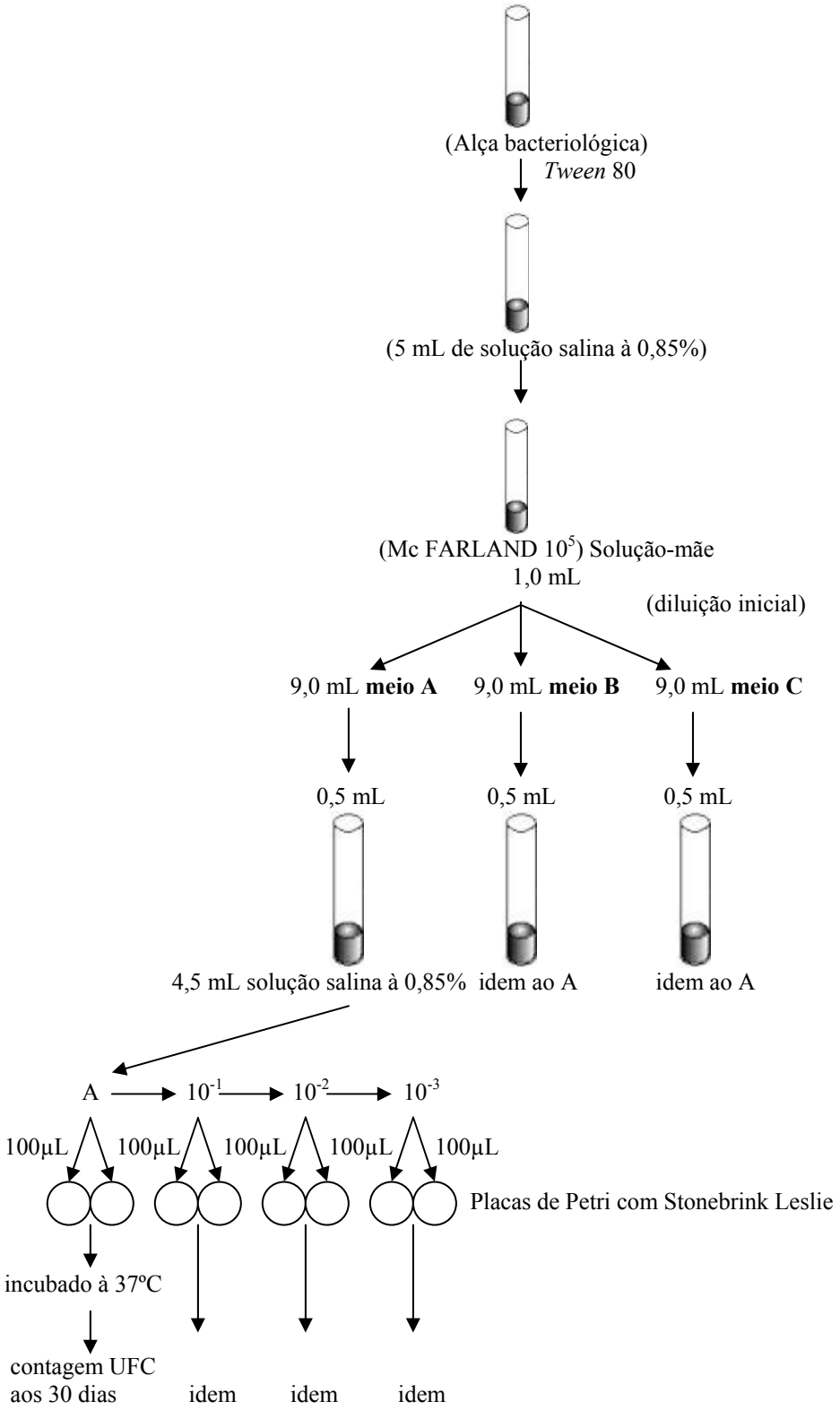

Figura 2 - Esquema descritivo da preparação e quantificação dos 16 isolados de *Mycobacterium bovis* antes do congelamento

O volume remanescente das 48 diluições, correspondentes aos três meios conservantes testados para cada um dos 16 isolados, foi aliquotado em nove volumes para teste de três diferentes temperaturas de congelamento (-20ºC, - 80ºC e -196ºC) e três diferentes períodos de descongelamento (45 dias, 90 dias e 120 dias).

Aos 45, 90 e 120 dias de congelamento, três alíquotas de cada isolado, correspondentes às três diferentes temperaturas de congelamento (-20ºC, - 80ºC e -196ºC) foram submetidas à quantificação de UFC, nos mesmos moldes descritos anteriormente (Figura 2), acrescentando-se a 10^{-4}. A figura 3 mostra um esquema desse procedimento.

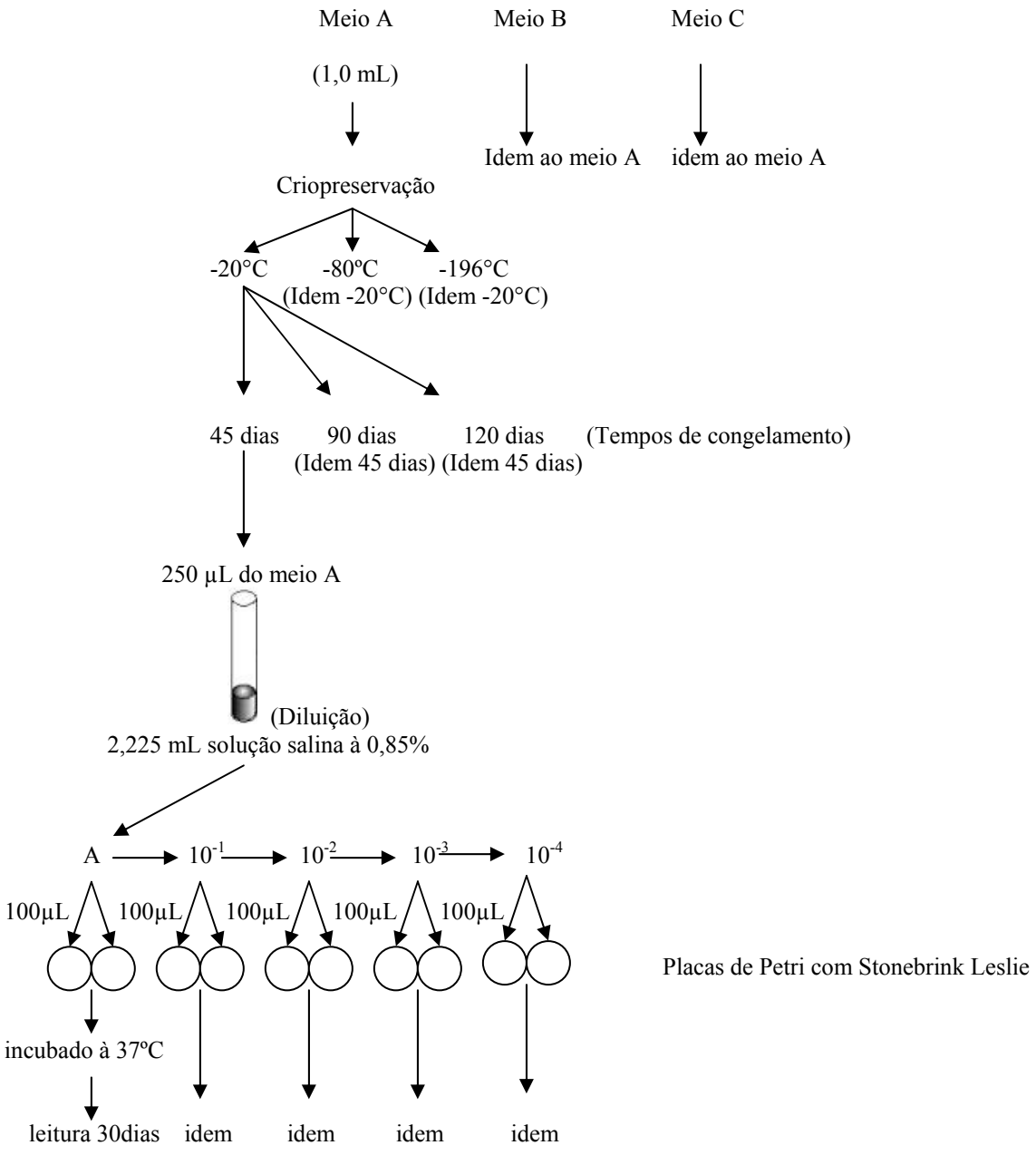

Figura 3 - Esquema da quantificação das UFC de *Mycobacterium bovis* após os períodos de congelamento

3.2.2 TRATAMENTO DOS DADOS

Com o objetivo de se verificar qual o melhor meio de criopreservação, a melhor temperatura e se o tempo de congelamento influencia na perda do isolado, foram calculados os números de UFC/100µL de *M. bovis* antes e depois dos diferentes protocolos de criopreservação. Foi, então, calculada a proporção de perda de UFC/100µL através da seguinte fórmula:

$$\text{Proporção de perda} = \frac{\text{UFC/100µl}_{\text{antes}} - \text{UFC /100µl}_{\text{depois}}}{\text{UFC/100µl}_{\text{antes}}}$$

Para cada uma das variáveis, foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov, para verificar se os dados seguiam a distribuição normal.

A seguir, estão mostrados três esquemas (Figuras 4, 5 e 6), diferenciados pelos tempos de descongelamento (45, 90 e 120 dias), numerados de 1 a 9 para os meios de criopresevação (A, B e C) de acordo com as temperaturas de criopreservação a que foram submetidos (-20°C, -80°C e -196°C).

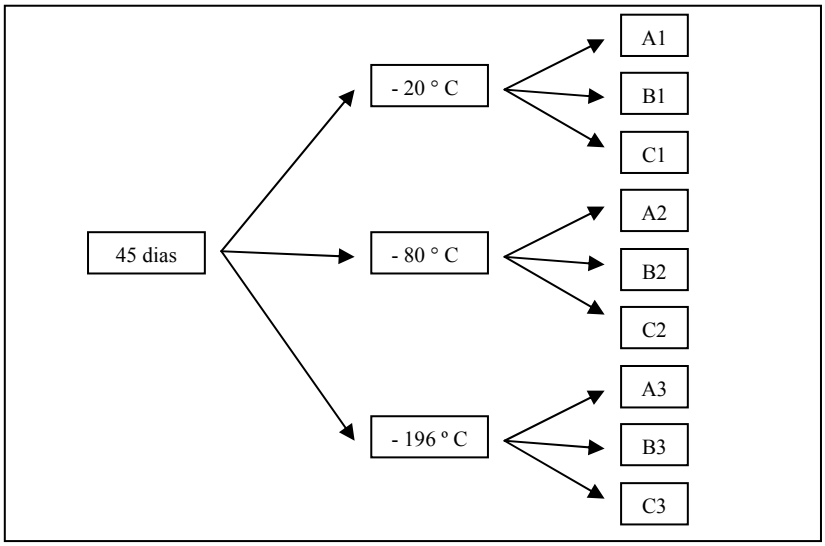

Figura 4 - Esquema correspondente ao tempo de descongelamento 45 dias, onde podem ser observados os nove grupos resultantes das combinações das três temperaturas e dos três meios

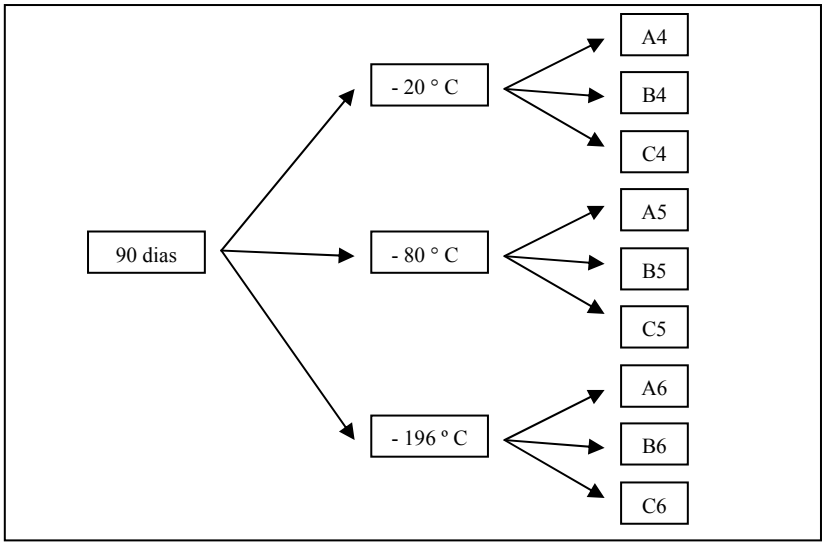

Figura 5 - Esquema correspondente ao tempo de descongelamento 90 dias, onde podem ser observados os nove grupos resultantes das combinações das três temperaturas e dos três meios

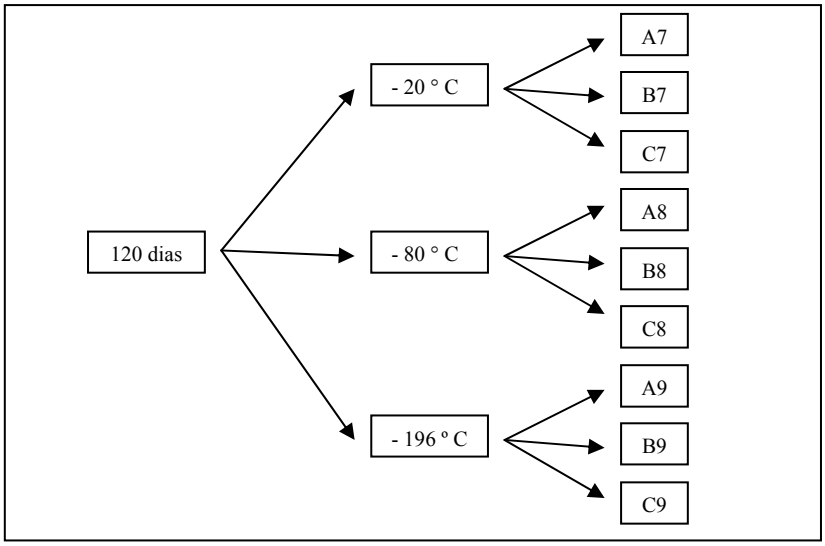

Figura 6 - Esquema correspondente ao tempo de descongelamento 120 dias, onde podem ser observados os nove grupos resultantes das combinações das três temperaturas e dos três meios

A estratégia de análise para tempo, temperatura e meio foi a mesma, fixando-se duas variáveis e fazendo a comparação específica entre os grupos da terceira variável. Por exemplo, para 45 dias de descongelamento e -20ºC de temperatura de criopreservação, foram comparadas as proporções de perda média entre os meios A, B e C (neste caso, grupos A1, B1 e C1). Para todas as variáveis fizemos uma análise consolidada. A análise consolidada consistiu no agrupamento dos dados de cada uma das categorias das variáveis para o tempo, a temperatura e o meio, visando à comparação entre categorias. Por exemplo, na análise consolidada para o tempo, foram agrupados e posteriormente comparados os dados obtidos nos três diferentes tempos de criopreservação, 45dias (A1,B1,C1,A2,B2,C2,A3,B3,C3) versus 90dias (A4,B4,C4,A5,B5,C5,A6,B6,C6) versus 120 dias (A7,B7,C7,A8,B8,C8,A9,B9,C9). Nesta análise, procurou-se responder se o tempo de congelamento aumenta as perdas de U.F.C./100µL de *M. bovis*. De modo análogo, foram feitas análises consolidadas para as variáveis temperatura e meio.

Foram utilizados três esquemas para facilitar as análises estatísticas, sendo separados cada um deles em tempos de descongelamentos distintos e criados novos grupos (A, B e C) numerados de 1 a 9, para efetuarmos ordenadamente as comparações entre os três diferentes: meios conservantes (A , B e C), tempos de descongelamento (45, 90 e 120 dias) e temperaturas de congelamento (-20°C, -80ºC e 196°C).

Para as análises estatísticas, utilizamos o programa InStat (GRAPHPAD SOFTWARE, 1998) como ferramenta para comparação das variáveis meios, tempos, temperaturas e seus respectivos consolidados. Comparamos colunas por colunas, através do teste de Friedman (teste não-paramétrico para análise de variância de medidas repetidas) e da análise de variâncias para medidas repetidas paramétrica, quando, respectivamente, os dados não seguiam ou seguiam a distribuição normal. Onde houvesse diferença significativa entre as variáveis, eram feitas comparações múltiplas dois a dois, através do teste de Dunn ou do teste

de Tukey, nas análises não-paramétrica e paramétrica, respectivamente. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para um nível descritivo $p < 0,05$.

Nas tabelas apresentadas na seção de resultados, podemos visualizar melhor os dados das proporções de perdas de U.F.C/100µL de *M. bovis*, em função de tempos de descongelamento, meios e temperaturas.

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS EXPERIMENTO 1

Os resultados obtidos dos três diferentes protocolos de descontaminação estão organizados na tabela 1.

Tabela 1 - Resultados do isolamento de BAAR e da ocorrência de contaminação segundo os métodos de descontaminação empregados e número de repetições. São Paulo, 2005

(continua)

métodos de descontaminação	Controle (salina 0,85%)		NaOH 4%		H_2SO_4 12%		HPC à 1,5%	
repetições	Contaminação 1=SIM 0=NÃO	Isolamento 1=SIM 0=NÃO	Contaminação 1=SIM 0=NÃO	Isolamento 1=SIM 0=NÃO	Contaminação 1=SIM 0=NÃO	Isolamento 1=SIM 0=NÃO	Contaminação 1=SIM 0=NÃO	Isolamento 1=SIM 0=NÃO
1	1	0	1	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0	0	0
3	1	0	1	0	0	0	0	1
4	1	0	0	0	1	0	0	0
5	1	0	1	0	1	0	0	1
6	1	0	1	0	0	0	0	0
7	1	0	1	0	1	0	0	0
8	1	0	1	0	1	0	0	0
9	1	0	1	0	1	0	0	0
10	1	0	1	0	0	0	0	0
11	1	0	1	0	1	0	0	1
12	1	0	1	0	0	0	0	0
13	1	0	1	0	1	0	0	1
14	1	0	1	0	0	0	0	1
15	1	0	1	0	0	0	0	1
16	0	1	0	1	0	0	0	1
17	1	0	1	0	0	0	0	0
18	1	0	0	1	0	0	0	1
19	1	0	0	1	0	0	0	1
20	1	0	0	1	0	0	0	1
21	1	0	1	0	1	0	0	1
22	1	0	0	1	0	0	0	1
23	1	0	1	0	1	0	0	1
24	1	0	1	0	1	0	0	1
25	1	0	0	1	0	0	0	1
26	1	0	1	0	1	0	1	0
27	1	0	1	0	1	0	1	0
28	1	0	0	1	0	0	0	1
29	0	0	1	0	1	0	0	0
30	0	1	0	1	0	1	0	1

Tabela 1 - Resultados do isolamento de BAAR e da ocorrência de contaminação segundo os métodos de descontaminação empregados e número de repetições. São Paulo, 2005. (conclusão)

métodos de descontaminação	Controle (salina 0,85%)		NaOH 4%		H_2SO_4 12%		HPC à 1,5%	
repetições	Contaminação 1=SIM 0=NÃO	Isolamento 1=SIM 0=NÃO	Contaminação 1=SIM 0=NÃO	Isolamento 1=SIM 0=NÃO	Contaminação 1=SIM 0=NÃO	Isolamento 1=SIM 0=NÃO	Contaminação 1=SIM 0=NÃO	Isolamento 1=SIM 0=NÃO
31	1	0	0	0	0	0	0	0
32	1	0	0	0	0	0	0	1
33	1	0	0	0	0	0	0	0
34	1	0	0	0	0	0	0	0
35	1	0	0	0	0	0	0	0
36	1	0	0	0	0	0	0	0
37	1	0	0	0	0	0	0	0
38	1	0	0	0	0	0	0	0
39	1	0	0	0	0	0	0	0
40	1	0	0	0	0	0	0	0
41	0	0	0	0	0	0	0	1
42	1	0	0	0	0	0	0	1
43	0	0	0	0	0	0	0	1
44	1	0	0	0	0	0	0	0
45	1	0	0	0	0	0	0	1
46	1	0	0	0	0	0	0	0
47	1	0	0	0	0	0	0	0
48	1	0	0	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0	0	0
50	1	0	0	0	0	0	0	0
51	1	0	0	0	0	0	0	0
52	1	0	0	0	0	0	0	0
53	1	0	0	0	0	0	0	0
54	1	0	0	0	0	0	0	0
55	1	0	0	0	0	0	0	1
56	1	0	0	0	0	0	0	0
57	0	0	0	0	0	0	0	1
58	1	0	0	0	0	0	0	0
59	1	0	0	0	0	0	0	0
60	1	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	**53/60**	**2/60**	**20/60**	**8/60**	**13/60**	**1/60**	**2/60**	**24/60**
%	**83,3**	**3,3**	**33,3**	**13,3**	**21,7**	**1,7**	**3,3**	**40,0**

A análise dos resultados mostrou que o método HPC foi o que apresentou menor proporção de contaminação (3%), com diferença estatística significativa em relação ao grupo controle (88%, $p<0,001$), NaOH (33%, $p<0,001$) e H_2SO_4 (21,7%, $p=0,002$). Em relação às comparações das proporções de sucesso no isolamento, o método HPC apresentou o melhor resultado (40%), tendo sido estatisticamente superior ao grupo controle (3%, $p<0,001$), NaOH (13%, $p=0,001$) e H_2SO_4 (1,7%, $p<0,001$). Os gráficos 1 e 2 mostram, respectivamente, as

proporções de isolamento e contaminação para os três diferentes métodos de descontaminação e o grupo controle.

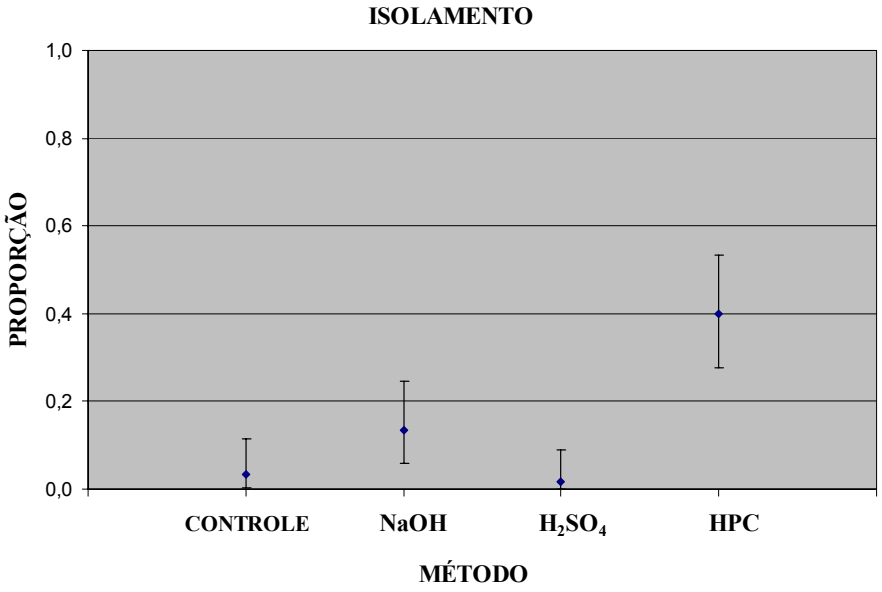

Gráfico 1 - Proporções de isolamento de *Mycobacterium bovis*, submetidas aos três diferentes métodos descontaminantes e controle

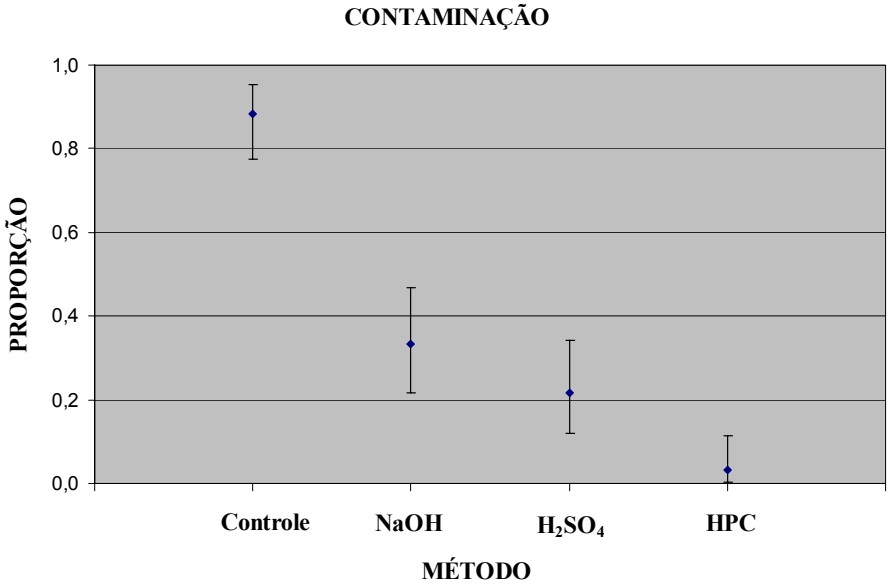

Gráfico 2 - Proporções de contaminação de *Mycobacterium bovis*, submetidas aos três diferentes métodos descontaminantes e controle

4.2 RESULTADOS EXPERIMENTO 2

Como o objetivo do estudo foi encontrar o melhor protocolo de criopreservação, ou seja, aquele que apresente a menor perda de UFC de *M. bovis*, inicialmente foram calculadas as perdas para cada um deles e depois calculadas as proporções de perdas. Isso foi feito subtraindo-se as contagens de UFC de *M. bovis*/100 µL das diluições iniciais obtidas depois de cada período de congelamento, daquelas obtidas antes do congelamento e dividindo o valor encontrado de perda com o valor inicial, sendo obtido o valor da proporção de perda.

Foi efetuado o cálculo das perdas de UFC/100µL de *M.bovis* para cada um dos três tempos de congelamento (45, 90 e 120 dias), em cada umas das três temperaturas de congelamento (-20ºC, -80ºC e -196ºC) e em cada um dos três diferentes meios de conservação (A, B e C). Nas tabelas 2, 3 e 4 pode-se visualizar melhor os números obtidos em cada uma destas etapas.

Tabela 2 - Proporção de perdas de UFC de *Mycobacterium bovis*/100µl depois de 45 dias de congelamento, segundo as repetições. São Paulo, 2005

Meios de conservação	**A**			**B**			**C**		
temperaturas (ºC)	**-20ºC**	**-80ºC**	**-196ºC**	**-20ºC**	**-80ºC**	**-196ºC**	**-20ºC**	**-80ºC**	**-196ºC**
Grupos / Repetições	**A1**	**A2**	**A3**	**B1**	**B2**	**B3**	**C1**	**C2**	**C3**
1	0,167	0,333	0,000	0,000	0,000	0,033	0,000	0,500	0,500
2	0,106	0,007	0,035	0,186	0,080	0,053	0,030	0,015	0,030
3	0,058	0,002	0,004	0,012	0,002	0,001	0,040	0,000	0,007
4	0,000	0,200	0,000	0,133	0,017	0,117	0,013	0,043	0,043
5	0,057	0,000	0,000	0,067	0,000	0,333	0,000	0,100	*
6	0,073	0,073	0,000	0,026	0,018	0,018	0,125	0,025	0,200
7	0,061	0,001	0,007	0,034	0,001	0,002	0,012	0,008	0,020
8	0,042	0,000	0,025	0,055	0,025	0,000	0,007	0,000	0,029
9	0,091	0,004	0,021	0,008	0,041	0,081	0,050	0,025	0,050
10	0,025	0,000	0,005	0,104	0,000	0,003	0,002	0,000	0,049
11	0,323	0,023	0,000	0,208	0,004	0,000	0,003	0,001	0,028
12	0,045	0,000	0,455	0,068	0,408	0,068	0,050	0,003	0,050
13	0,140	0,000	0,100	0,050	0,500	0,005	0,003	0,067	0,333
14	0,058	0,005	0,000	0,112	0,067	0,000	0,057	0,011	0,000
15	0,050	0,100	0,050	0,049	0,244	0,098	0,094	0,012	0,024
16	0,033	0,000	0,067	0,005	0,000	0,005	0,000	0,000	0,020

* Contaminação

Tabela 3 - Proporção de perdas de UFC de *Mycobacterium bovis*/100µl depois de 90 dias de congelamento, segundo as repetições. São Paulo, 2005

Meios	**A**			**B**			**C**		
temperatura (ºC)	**-20ºC**	**-80ºC**	**-196ºC**	**-20ºC**	**-80ºC**	**-196ºC**	**-20ºC**	**-80ºC**	**-196ºC**
Grupo repetições	**A4**	**A5**	**A6**	**B4**	**B5**	**B6**	**C4**	**C5**	**C6**
1	*	*	*	*	0,010	0,010	*	0,050	0,100
2	0,025	0,018	0,018	*	0,133	0,066	*	0,106	0,350
3	*	*	0,002	*	*	0.002	*	*	0,001
4	*	0,100	0,010	*	0,050	0,167	*	0,435	0,004
5	*	0,029	*	*	0,067	0,333	*	0,010	0,020
6	*	0,584	0,730	*	0,034	0,132	0,250	0,650	0,150
7	*	0,008	0,003	0,017	*	0,005	0,015	0,020	0,040
8	*	0,050	*	*	0,050	0,005	*	*	0,071
9	0,070	0,027	0,152	0,101	0,122	0,061	0,009	0,125	0,025
10	0,011	0,035	0,004	0,010	0,078	0,001	0,008	0,007	0,025
11	*	0,335	0,087	*	0,146	0,250	*	0,040	0,093
12	*	0,009	0,018	*	0,136	0,476	*	0,075	0,025
13	*	*	*	*	0,250	*	*	0,667	*
14	0,019	0,013	0,010	0,081	0,101	0,056	0,017	0,031	0,011
15	*	0,950	*	*	0,488	*	*	0,353	*
16	*	0,433	*	*	0,150	*	*	*	*

* Contaminação

Tabela 4 - Proporção de perdas de UFC de *Mycobacterium bovis*/100µl depois de 120dias de congelamento, segundo as repetições. São Paulo, 2005

Meios	**A**			**B**			**C**		
temperatura (ºC)	**-20ºC**	**-80ºC**	**-196ºC**	**-20ºC**	**-80ºC**	**-196ºC**	**-20ºC**	**-80ºC**	**-196ºC**
Grupo repetições	**A7**	**A8**	**A9**	**B7**	**B8**	**B9**	**C7**	**C8**	**C9**
1	*	*	0,017	*	*	0,010	*	0,500	*
2	0,001	0,007	0,004	0,027	0,013	0,013	0,000	0,030	0,015
3	0,004	*	*	0,034	*	0,000	*	0,001	0,000
4	*	*	*	0,167	*	*	0,009	*	*
5	*	*	*	0,067	*	*	0,010	*	*
6	0,730	*	*	0,132	*	0,005	*	0,150	0,250
7	*	0,030	*	*	*	0,000	*	0,012	0,008
8	*	*	*	0,035	*	*	*	*	0,007
9	0,003	*	0,003	*	0,006	0,122	0,299	0,274	0,005
10	*	*	0,000	*	*	*	*	0,000	*
11	0,103	*	*	0,625	0,035	*	*	0,001	*
12	*	*	0,005	0,068	*	*	*	*	*
13	0,020	*	*	0,500	*	*	*	0,020	0,067
14	0,144	0,001	*	*	0,056	*	0,005	0,023	0,000
15	0,500	*	*	0,366	0,017	*	0,016	*	*
16	0,033	*	*	0,050	0,015	*	*	0,024	*

* Contaminação

A variável tempo de congelamento foi analisada dentro dos meios de conservação, fixando-se a variável temperatura (Tabela 5) e também de forma consolidada (Tabela 6 e Gráfico 3).

Tabela 5 - Resultados da comparação das proporções de perdas de UFC *de M. bovis*/100µl entre os grupos para a variável tempo de congelamento. São Paulo, 2005

grupos comparados	**valor de p para ANOVA**	**Comparações específicas (teste de Dunn)**
A1xA4xA7	P=0,527	-
B1xB4xB7	Valores insuficientes	-
C1xC4xC7	P=0,833	-
A2xA5xA8	P=0,306	-
B2xB5xB8	P=0,005	*B5>B8 (p<0,05)*
C2xC5xC8	P=0,017	*C2>C5 (p<0,05)*
A3xA6xA9	P=0,041	*A3>A9 (p<0,05)*
B3xB6xB9	P=0,183	-
C3xC6xC9	P=0,097	-

Tabela 6 - Resumo estatístico da comparação das proporções de perdas de UFC de *M. bovis*/100µl para a variável tempo de congelamento, segundo os grupos consolidados para as variáveis meios de cultura e temperatura de congelamento. São Paulo, 2005.

tempos	**grupos consolidados**	**N**	**média da perda de UFC de M.bovis**/100µl	**mediana**	**desvio padrão**	**valor de p para ANOVA**
45 dias	A1 B1 C1 A2 B2 C2 A3 B3 C3	40	0,062	0,027	0,109	P<0,05
90 dias	A4 B4 C4 A5 B5 C5 A6 B6 C6	40	0,103	0,040	0,160	
120 dias	A7 B7 C7 A8 B8 C8 A9 B9 C9	40	0,052	0,009	0,105	

Na tabela 5, observamos as seguintes situações: B5>B8 (em 90 dias houve maior proporção de perda média que em 120 dias), C2>C5 (em 45 dias houve maior proporção de perda média que em 90 dias) e A3>A9 (em 45 dias houve maior proporção de perda média que em 120 dias).

Através do teste de Friedman (Tabela 6), foi observada diferença estatística significativa entre os grupos consolidados (p=0,0002), onde houve maior proporção de perda de *M.bovis* em 90 dias de congelamento quando comparado ao tempo de 120 dias, para um nível de significância de 5%. No entanto, não foi observada diferença de 90 e 120 dias de congelamento em relação à 45 dias.

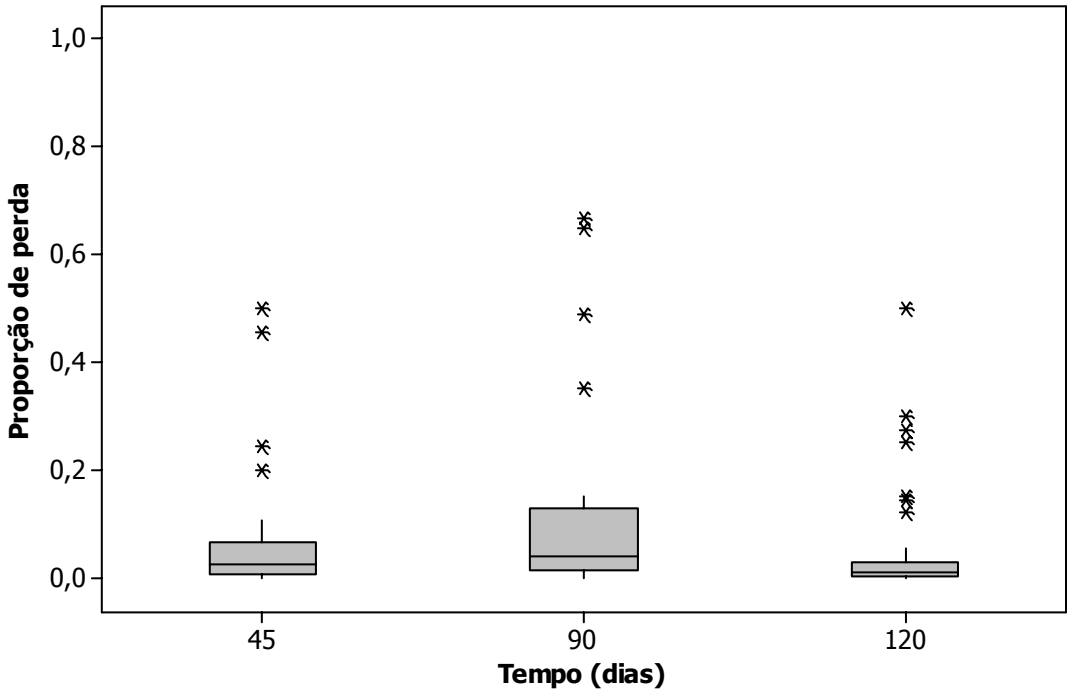

Gráfico 3 - Diagrama de blocos para proporção de perdas de UFC de M. bovis/100µl para a variável tempo de congelamento, segundo os grupos consolidados para as variáveis meios de cultura e temperatura de congelamento

A variável temperatura de congelamento foi analisada dentro dos meios de conservação, fixando-se o tempo de congelamento (Tabela 7) e também de forma consolidada (Tabela 8 e Gráfico 4).

Tabela 7 - Resultados da comparação das proporções das perdas de UFC *de M. bovis*/100µl entre os grupos para a variável temperatura de congelamento. São Paulo, 2005

grupos comparados	valor de p para ANOVA	comparações específicas (teste de Dunn)
A1xA2xA3	P=0,009	A1>A2 (p<0,05)
B1xB2xB3	P=0,120	-
C1xC2xC3	P=0,002	C2<C3 (p<0,05)
A4xA5xA6	P=0,420	-
B4xB5xB6	P=0,027	B5>B6 (p<0,05)
C4xC5xC6	P=0,956	-
A7xA8xA9	Valores insuficientes	-
B7xB8xB9	Valores insuficientes	-
C7xC8xC9	P= 0,361	-

Tabela 8 - Resumo estatístico da comparação das proporções de perdas de UFC de *M. bovis*/100µl para a variável temperatura de congelamento, segundo os grupos consolidados para as variáveis meios de cultura e tempo de descongelamento. São Paulo, 2005

T°C	grupos consolidados	N	média da perda de UFC de M.bovis/100µl	mediana	desvio padrão	valor de p para ANOVA
- 20 °C	A1 B1 C1 A4 B4 C4 A7 B7 C7	65	0,059	0,042	0,070	0,0351
- 80 °C	A2 B2 C2 A5 B5 C5 A8 B8 C8	65	0,069	0,017	0,134	
- 196 °C	A3B3C3 A6 B6 C6 A9 B9 C9	65	0,070	0,021	0,154	

Os dados da comparação específica (Tabela 7), mostraram as seguintes situações: A1>A2 (em -20°C houve maior proporção de perda média quando comparado com -80°C); C3>C2 (em -196°C houve maior proporção de perda média quando comparado com -80°C) e B5>B6 (em -80°C houve maior proporção de perda média quando comparado com -196°C).

Através do teste de Friedman (Tabela 8), observou-se uma diferença significativa entre as proporções de perda média em função da temperatura. Utilizando o teste de comparações múltiplas de Dunn, foi observada uma diferença estatística significativa entre as proporções de perda média nas temperaturas de -20°C e -80°C ($p<0,05$).

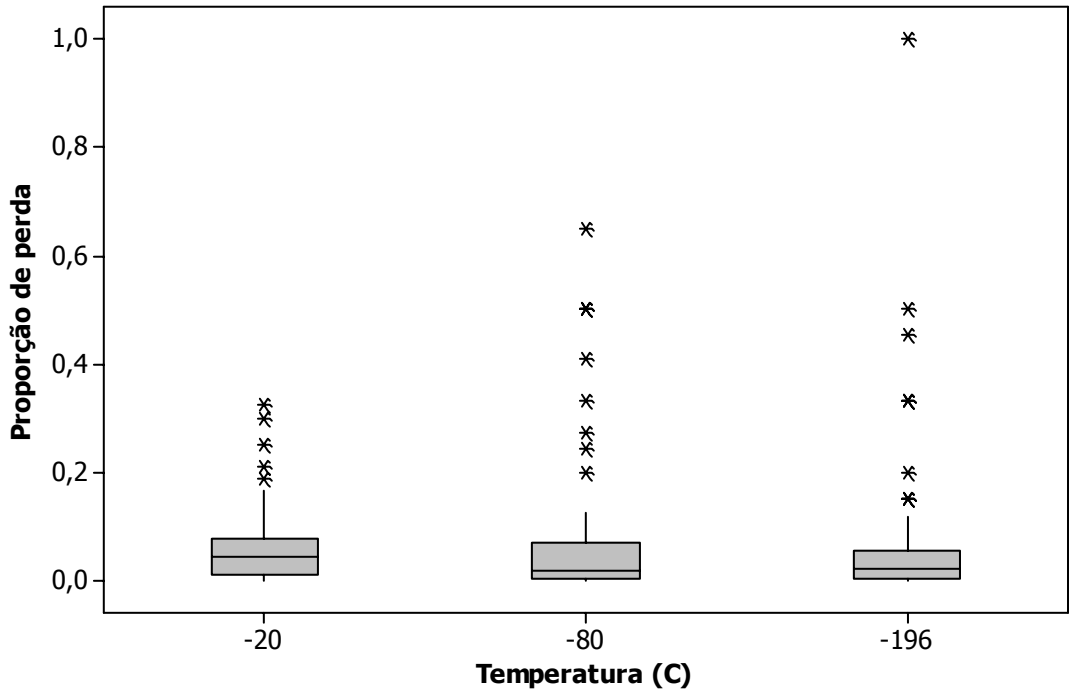

Gráfico 4 - Diagrama de blocos da proporção de perdas de UFC de *M. bovis*/100µl para a variável temperatura de congelamento, segundo os grupos consolidados para as variáveis meios de cultura e temperatura de congelamento

A variável meio de conservação foi analisada dentro dos tempos de descongelamento, fixando-se a temperatura (Tabela 9) e também de forma consolidada (Tabela 10 e Gráfico 5).

Tabela 9 - Resultados da comparação das perdas de UFC *de M. bovis*/100µl entre os grupos para a variável meio de conservação. São Paulo, 2005

grupos comparados	valor de p para ANOVA	Comparações específicas (teste de Dunn)
A1xB1xC1	P=0,062	-
A2xB2xC2	P=0,569	-
A3xB3xC3	P=0,319	-
A4xB4xC4	P=0,162	-
A5xB5xC5	P=0,639	-
A6xB6xC6	P=0,790	-
A7xB7xC7	P=0,482	-
A8xB8xC8	P=0,449	-
A9xB9xC9	P=0,469	-

Tabela 10 - Resumo estatístico da comparação das perdas de UFC de *M. bovis*/100µl para a variável meio de conservação, segundo os grupos consolidados para as variáveis tempo de descongelamento e temperatura de congelamento. São Paulo, 2005

Meio	**grupos consolidados**	**N**	**média da perda de UFC de M.bovis/100µl**	**mediana**	**desvio padrão**	**valor de p para ANOVA**
A	A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8 A9	77	0,085	0,021	0,170	P=0,1289
B	B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9	77	0,087	0,053	0,117	
C	C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9	77	0,082	0,025	0,167	

Nas comparações específicas (Tabela 9), também não foram observadas diferenças estatísticas significativas. Através do teste de Friedman para os grupos consolidados (Tabela 10), observou-se que não houve diferença significativa entre as os meios A, B e C ($p>0,05$)

No entanto, ao se fazer a comparações específicas entre os grupos A1, B1 e C1 (Gráfico 6) através da análise de variância paramétrica, uma vez que estes conjuntos de dados apresentavam distribuição Normal, verificada através do teste de Kolmogorov-Smirnov, foi observada uma diferença significativa ($p=0,044$) entre os meios A e C, para 45 dias de descongelamento e -20ºC de temperatura de criopreservação.

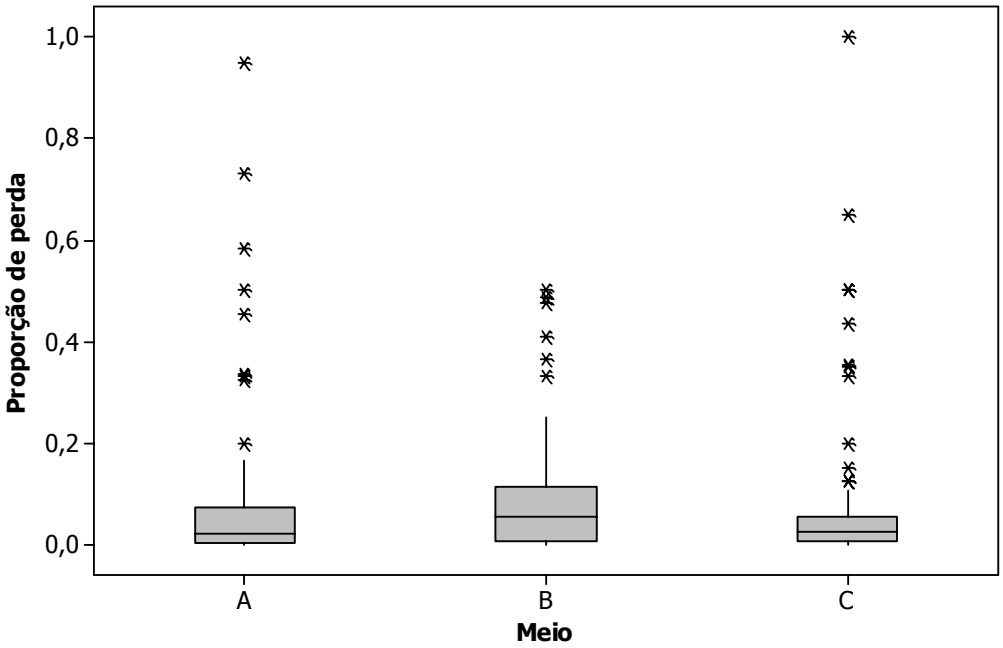

Gráfico 5 - Gráfico de blocos das proporções das perdas de UFC de M. bovis/100µl para a variável meio de conservação, segundo os grupos consolidados para as variáveis meios de cultura e temperatura de congelamento

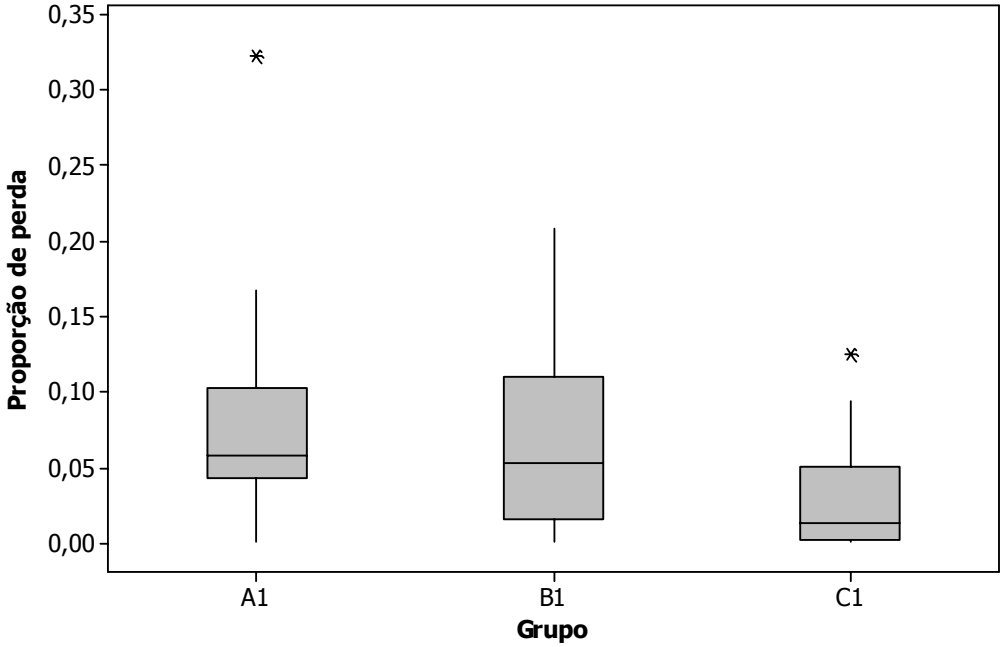

Gráfico 6 - Gráfico de blocos das proporções das perdas de UFC de M. bovis/100µl para a variável meio de conservação, segundo os grupos A1XB1XC1

5 DISCUSSÃO

5.1 DISCUSSÃO EXPERIMENTO 1

Os resultados da tabela 1, onde são apresentados os dados brutos, indicaram que a proporção mais elevada de isolamento (40,0%) e também a proporção mais baixa de contaminação (3,3%) foram observadas para o método HPC. Para as proporções de contaminação houve diferença estatística significativa em relação ao grupo controle (88%, $p<0,001$), NaOH (33%, $p<0,001$) e H_2SO_4 (21,7%, $p=0,002$). Para a proporção de sucessos no isolamento houve diferença estatística significativa em relação ao grupo controle (3%, $p<0,001$), NaOH (13%, $p=0,001$) e H_2SO_4 (1,7%, $p<0,001$). Portanto, este foi o método mais adequado para a recuperação do *Mycobacterium bovis* presente nos homogeneizados de órgãos examinados - conservados em solução saturada de borato de sódio por no máximo dois meses e posteriormente homogeneizados e congelados a -20°C.

Resultados semelhantes forma verificados por Corner et al. (1995), que avaliaram a ação de quatro descontaminantes, em diferentes concentrações, para isolamento de *M. bovis* em tecido bovino artificialmente contaminado com a estirpe AN5. As concentrações de descontaminantes que se mostraram mais eficicazes foram: cloreto de hexadecetilpiridínio a 0,75% (HPC), ácido oxálico a 5% (AO), cloreto de benzalcônio a 0,25% (BC) e hidróxido de sódio a 2% (NaOH). O método HPC 0,75% apresentou menor efeito tóxico sobre o *M. bovis*, enquanto que o hidróxido de sódio 2% foi o que se mostrou mais tóxico.

Holanda et al. (2002) testaram quatro diferentes descontaminantes e, além das capacidades de descontaminação, também estudou seus efeitos tóxicos sobre o *M. bovis.* Empregou como modelo homogeneizados de linfonodos bovinos artificialmente

contaminados com a amostra AN5. Os descontaminates foram cloreto de cetilpiridínio a 0,75% (CPC), cloreto de benzalcônio a 0,25%, (BC), ácido oxálico a 5% (AO) e ácido sulfúrico a 6% (H_2SO_4). O H_2SO_4 a 6%. e o CPC a 0,75% foram os descontaminantes que proporcionaram os melhores resultados, pois apresentaram a menor toxicidade para *M. bovis*. Cloreto de 1- Hexadecilpiridínio (HPC) é sinônimo de Cloreto de Cetilpiridínio (CPC) e tem sido utilizado com maior freqüência na descontaminação de tecidos e fezes visando o isolamento de M. paratuberculosis (CORNER; TRAJSTMAN, 1988).

Corner e Trajstman (1988) ao estudarem o isolamento primário de *M. bovis* de lesões bovinas, constataram que o HPC 0,75% foi tão eficiente quanto o NaOH 2% no controle do crescimento de contaminates. A vantagem do HPC 0,75% sobre o NaOH é o processamento mais rápido, pois o HPC não necessita da fase de neutralização, sendo, talvez por isso, menos tóxico ao *M. bovis*. Assim, aumenta a velocidade no isolamento e propicia o precoce aparecimento das colônias. No presente estudo, durante as leituras dos tubos verificou-se que as colônias apareceram mais precocemente e cresceram de forma mais abundante nas amostras descontaminadas pelo HPC. Deve-se salientar que no presente estudo essas variáveis não foram mensuradas, o que seria interessante fazer em futuros estudos sobre o tema.

Smithwick et al. (1975), utilizando o CPC a 1% e o Cloreto de Sódio a 2% (NaCl) para descontaminação de esputo a ser transportado ao laboratório para isolamento de *Mycobacterium tuberculosis*, demonstraram que a associação de ambos descontaminantes pode ser considerada como uma alternativa eficiente para isolamento de *M. tuberculosis*, podendo ser transportados por mais de 24 horas sem que haja redução bacilar.

Robbecke et al. (1991) compararam métodos de descontaminação para o isolamento de micobactéria a partir de amostras de água para consumo humano, utilizando o CPC de 0,001 a 0,005%, o NaOH de 0,5 a 1,0% e o formoldeído de 0,1 a 1,0% (HCHO). Amostras de água foram artificialmente contaminadas com nove espécies de micobactérias, dentre elas *M.*

chelonae e *M. fortuitum*, e quatro espécies de outras bactérias de crescimento mais rápido (*Pseudomonas aeruginosa, P. cepacia, Acinetobacter calcoaceticus*). Verificaram que nas amostras descontaminadas pelo CPC houve a maior proporção de isolamentos (64%) e a menor proporção de contaminação (11%). Esses resultados confirmaram os relatados por Du Moulin (1978), que recomendou a utilização do CPC para os métodos de isolamento de micobactérias a partir de amostras de água.

Portanto, esses dados indicam que os laboratórios que trabalham com isolamento de *M. bovis* a partir de homogeneizados de órgãos bovinos devem considerar a substituição do método utilizado pelo HPC.

5.2 DISCUSSÃO EXPERIMENTO 2

Embora o congelamento de isolados de micobactérias seja uma prática comum empregada pelos laboratórios visando sua preservação por longos períodos de tempo, não foram encontradas publicações que comparassem diferentes métodos de criopreservação. Por outro lado, em relação à liofilização, outro método utilizado para esse mesmo propósito, existem alguns estudos. Slosarek et al. (1976), analisaram 179 estirpes de 10 espécies de micobactéria, 25 anos após a liofilização, em diferentes meios. Verificaram 100% de recuperação de UFC para *M. avium*, *M. phlei*, *M. aquae*, *M. microti.* As taxas mais baixas foram verificadas para *M. kasassi*, *M. tuberculosis* e *M. bovis,* sendo que a pior delas foi observada para *M. bovis*. Entre os meios de suspensão, o sangue desfibrinado de carneiros com lactose e gelatina e a solução de glutamato de sódio a 1% provaram ser os mais apropriados. Segundo Gruft et al. (1968), a liofilização é um dos métodos mais comuns de preservar culturas bacterianas, mas quando esta prática é ineficaz para o armazenamento de

micobactérias, uma outra técnica a ser investigada, considerando que o processo de secagem seja prejudicial as culturas, é o congelamento a -20°C em suspensões de leite.

A grande desvantagem da liofilização é o custo do liofilizador. Portanto, o congelamento apresenta-se como alternativa viável, pois o processo pode ser reproduzido em laboratórios com os mais diversos níveis de sofisticação.

5.2.1 Tempo

Para a variável "tempo", na análise dos dados consolidados (Tabela 6 e Gráfico 3), houve maior proporção de perda de *M. bovis* em 90 dias de congelamento quando comparado ao tempo de 120 dias. No entanto, não foi observada diferença estatística de 90 e 120 dias de congelamento em relação à 45 dias.

Quando essa mesma variável foi analisada dentro dos meios de conservação, fixando-se a variável temperatura (Tabela 5), foram observadas diferenças estatísticas em três casos: entre os grupos B5 e B8, indicando que a proporção de perda média em 90 dias foi superior à perda em 120 dias; entre os grupos C2 e C5, indicando uma proporção de perda média em 45 dias superior à observada em 90 dias; e entre os grupos A3 e A9, indicando uma proporção de perda em 45 dias superior à observada em 120 dias.

Uma primeira análise desses resultados leva à conclusão de que, paradoxalmente, há uma tendência de diminuição das perdas de UFC conforme se amplia o tempo de congelamento dos isolados (em especial, para o tempo de observação de 120 dias), o que seria um resultado inesperado, pois nessas temperaturas não há multiplicação de bactérias. Analisando o Gráfico 3, é importante verificar que as perdas proporcionais de UFC para as três temperaturas foram extremamente baixas, com mediana de 2,7% para o tempo de 45 dias

de congelamento, 4,0% para 90 dias e 0,9% para 120 dias, com a observação de alguns dados discrepantes (*outliers*). Portanto, é razoável admitir que nesses tempos de congelamento testados, bastante curtos, as proporções de perdas de UFC de *M. bovis* para os protocolos estudados sejam semelhantes. É também interessante ressaltar que, nos tempos de 90 e 120 dias, foram observadas as maiores proporções de contaminação, levando a perdas amostrais que podem ter influenciado a presente comparação, sobretudo no que se refere a estes dois tempos de observação. Ensaios com tempos de congelamento mais dilatados, com a ordem de grandeza de anos, poderão produzir resultados diferentes.

5.2.2 Temperatura

Para a variável "temperatura", na análise dos dados consolidados (Tabela 8), foi observada uma diferença significativa entre as temperaturas -20 °C e -80 °C ($p<0,05$), com uma proporção de perda maior para -20°C.

A mesma variável, quando analisada dentro dos meios de conservação, fixando-se o tempo de descongelamento, mostraram as seguintes situações: A1>A2 (em -20°C houve maior proporção de perda média quando comparado com -80°C); C3>C2 (em -196°C houve maior proporção de perda média quando comparado com -80°C) e B5>B6 (em -80°C houve maior proporção de perda média quando comparado com -196°C).

Um detalhe que chama a atenção é o fato das medianas para os três grupos consolidados (Tabela 8) estarem abaixo de 4,2% de perda.

Portanto, embora tenha havido diferença em algumas situações, o fato das medianas dessas perdas nunca terem superado 4,2%, permitem afirmar qualquer das temperaturas ensaiadas prestam-se para a preservação de *M. bovis*. Entretanto, preservar os isolados a -20ºC é mais prático e econômico, pois essa temperatura é atingida por *freezers*

convencionais, equipamento disponível na maioria dos laboratórios que trabalham com bacteriologia.

Adicionalmente, observando o gráfico 4, nota-se que há uma concentração de valores abaixo da mediana (portanto, 50% dos dados) para -20ºC, -80ºC e -196ºC, e uma série de valores discrepantes (*outliers*), sobretudo nas temperaturas de -80ºC e -196ºC. Isto faz com que os valores das perdas médias para as temperaturas de -80ºC e -196ºC sejam superiores ao valor observado para a temperatura de -20ºC.

5.2.3 Meio

Para a variável "meio", na análise dos dados consolidados (Tabela 10), observou-se que não houve diferença significativa entre as os meios A, B e C ($p>0,05$). Essa mesma variável, comparada dentro dos tempos de descongelamento, fixando-se a temperatura (Tabela 9), também não mostrou diferenças estatísticas significativas entre os meios.

No entanto, ao se fazer comparações específicas entre os grupos A1, B1 e C1 através da análise de variância paramétrica, foi observada uma diferença significativa ($p=0,044$) entre os meios A e C, para 45 dias de descongelamento e -20ºC de temperatura de criopreservação. Assim, nesta análise em particular, o meio C foi o mais adequado, com a menor proporção de perda.

Seria de grande valia a realização de outros estudos utilizando o meio de conservação C, notadamente para avaliar sua performance por longos períodos de congelamento. Além disso, por ser um meio enriquecido, poderia ser verificada sua capacidade de ampliação do inóculo antes do congelamento.

6 CONCLUSÕES

Experimento1:

- O método HPC foi o que apresentou menor proporção de contaminação (3%), com diferença estatística significativa em relação ao grupo controle (88%, $p<0,001$), NaOH (33%, $p<0,001$) e H_2SO_4 (21,7%, $p=0,002$).

- O método HPC foi o que apresentou a maior proporção de sucesso no isolamento (40%), tendo sido estatisticamente superior ao grupo controle (3%, $p<0,001$), NaOH (13%, $p=0,001$) e H_2SO_4 (1,7%, $p<0,001$).

Experimento 2:

- As medianas das proporções de perdas de UFC de *M. bovis* para os tempos de congelamento de 45, 90 e 120 dias foram respectivamente 2,7%, 4,0% e 0,9%.

- As medianas das proporções de perdas de UFC de *M. bovis* para as temperaturas de armazenamento de -20°C, -80°C e -196°C foram sempre inferiores a 4,2%.

- As medianas das proporções de perdas de UFC de *M. bovis* para os meios de criopreservação de A, B e C foram respectivamente 2,1%, 5,3% e 2,5%.

- Os valores dos percentuais de perdas de UFC permitem sugerir que o protocolo mais adequado de criopreservação de isolados de *M. bovis* é solubilizá-los em 7H9 modificado e mantê-los à temperatura de -20°C independentemente dos tempos de congelamento do estudo.

REFERÊNCIAS

ABALOS, P; RETAMA, P. Tuberculosis: una zoonosis re-emergente?. **Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties,** v.23, n.2, p. 583-594, 2004.

BELCHIOR, A. P. C. **Prevalência, distribuição regional e fatores de risco da tuberclose bovina em Minas Gerais**. 2000 Tese (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Departamento de Defesa Animal Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal** (PNCEBT). Disponível em < URL: http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 27 de setembro de 2005.

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

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Bacterilogia de la tuberculosis humana y animal**. Ramos Mejia, Buenos Aires, 1973. 63 p. (Série de monografias cientificas y tecnicas, 11)

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Diagnóstico de laboratório de la tuberculosis animal**. Buenos Aires, 1972. 48p. (Nota tecnica, 6)

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Métodos de laboratório de microbiologia veterinária para el aislamiento e identificacion de micobacterias**. Buenos Aires, 1973. 48 p. (Série de monografias cientificas y tecnicas, 6)

CLAXTRON, P.D.; EAMENS, G.J.; MYLREA, P.J. Laboratory diagnosis of bovine tuberculosis. **Australian Veterinary Journal** , v. 55, p. 514-520, 1979.

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

CORNER, L. A.; TRAJSTAMAN, A. C. An Evaluation of 1-Hexadecylpyridinium Chloride as a Decontaminant in the Primary Isolation of *Mycobacterium bovis* from Bovine Lesions. **Veterinary Microbiology**, n. 18, p. 127-134, 1988.

CORNER, L. A.; TRAJSTMAN, A. C.; LUND, K. Determination of optimum concentration of decontaminants for primary isolation. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 43, p. 129-133, 1995.

DAVID, H.; BRUM, L.; PRIETO, E. **Manual de micobacteriolgia em Saúde Pública. Pricípios e métodos**. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical, 1994.

DU MOULIN, G. C.; STOTTMEIER ,K. D. Use of cetylpyridinium chloride in the decontamination of water for culture of mycobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 36, p.771-773, 1978.

ELLSWORTH, S.; KIRKBRIDE, C. A.; JOHNSON, D. D. Excretion of *Mycobacterium avium* from lesions in the instestine and tonsils of infected swine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 9, p. 1526-1530, 1980.

FERREIRA NETO, J. S.; BERNARDI, F. O controle da tuberculose bovina. **Higiene alimentar**, v. 11, n. 47, p. 9-13, 1997.

GRAPHPAD SOFTWARE. **InStat guide to choosing and interpreting statistical tests**.Versão 3.01, GraphPad Software, Inc., San Diego California USA, 1998.

GORDON, S. F.; BROSCH, R.; BILLAULT, A.; GARNIER, T.; EIGLMEIER, K.; COLE, S. L. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. **Molecular Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 643-655, 1999.

GRUFT, H.; CLARK, M. E.; OSTERHOUT, M. Preservation of Mycobacterial Cultures. **Applied Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 355-357, 1968.

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

HOLANDA, E.D. **Avaliação de métodos de descontaminação para o isolamento de micobactérias de animais**.2002. p.25 Tese (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

HOLANDA, E. D.; LOBATO, F. C. F.; MOTA, P. M. P. C.; ABREU, V. L. V. Avaliação de métodos de descontaminção para isolamento de Mycobacterium bovis. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**,v. 24, n. 2, p. 54-57, 2002.

JORGENSEN. J. B. An improved medium for culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine faeces. **Acta. Veterinaria Scandinavica**, v. 23, n. 3, p. 325-35, 1982.

KANTOR, I. N. Bacteriologia de la tuberculosis humana animal. Martinez: **Centro Panamericano de Zoonosis – CEPANZO**, 1988 (Série de monografias científucas e técnicas, n.11).

KANTOR, I. N.; RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin América and the Caribbean: curret status, control and erradication programs. **Vetrinary Microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 5-14, 1994.

KAMERBEEK, J.; SCHOULS, L.; KOLK, A.; VAN AGTERVELD, M.; VAN SOOLINGEN, D.; KUIJPER, S.; BUNSCHOTEN, A.; MOLHUIZEN, H. SHAW, R.; GOYAL, M.; van EMBDEN, J. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 907-914, 1997.

MEIRELES NETO, J.R. **Atividade tuberculocida de detergentes catiônicos**. 1982. Tese (mestrado) Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais,1982.

PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, 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 Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 51-60, 1992.

ROBERTS, G.D.; KONEMAN, E.W., KIM, Y.K. Mycobacterium. In: BALOWS, A. **Manual of clinical microbiology**, 5. ed., Washington:ASM, 1991.cap. 34

ROBBECKE, R. S; WEBER, A.; FISCHEDER, R. Comparison of decontamination methods for isolation of mycobacteria from drinking water samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 14, p. 177-183, 1991.

ROMÁN, M. C. **Microbiologia clinica de las enfermidades por micobactérias** (tuberculosis, lepra e micobacteriosis). Espanha. Universidae de Cordoba – Faculdad de Medicina, 1990, p. 29-30

ROSALES RODRIGUEZ, C.A. **Sistema de detecção de focos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo utilizando métodos moleculares e epidemiológicos**.2005. p.86 Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

SLOSAREK, M.; SOUREK, J.; MIKOVA, Z. Results of long term preservation of mycobacteria by means of freeze-drying. **Cryobiology,** v. 13, p. 218-224, 1976.

SMITHWICK, R. W. ; STRATIGOS, C. B. ; DAVIS, H. L. Use of Cetylpyridinium chloride and sodium chloride for descontamination of sputum specimens that are transported to the laboratory for the isolation of Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 1, n. 5, p. 411-413, 1975.

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

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BÖTTGER, B. T. Rapid identification of Mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 175-178, 19993.

WHIPPLE, D. L.; MERKAL, R. S. **Modifications in the techniques for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis***. In: R. S. MERKAL (editor), Proceedings of the International Coloquium on Research in Paratuberculosis, 16-18, National Animal Disseases Center, Ames, IA, p. 82-92, 1983.

WAYNE,L. G.; KUBICA, G. P. The mycobacteria. In: SNEATH, P. H. A; SHARPE, M. E. ; HOLT, J. G. (Ed.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 8. ed., Baltimore: Willians e Wilkins. 1986, v. 2, cap. 6, p.1435-1457.

ANEXO A

Preparo dos Meios Descontaminantes:

1-) Preparo do Método de Petroff modificado

200 mL de NaOH à 4%

200 mL de água destilada

Ferver com o auxílio de um béquer a água destilada

Adicionar 8 g de NaOH, cuidado com o vapor!

2-) Preparo do método ácido

200 mL de H2SO4 à 1,5%

176 mL de água deslilada

24 mL de H2SO4

OBS.: Sempre adicionar o ácido à água destilada, nunca ao inverso.

3-) Preparo do método HPC

200mL de HPC à 1,5%

200 mL de água destilada

3g de HPC (trabalhar na capela de exaustão)

4-) Preparo de 200 mL de HCL à 1N

200 mL de água destilada

18,34 mL de HCL

OBS.: Sempre adicionar o ácido à água destilada, nunca ao inverso.

ANEXO B

1) Preparo do Meio Stonebrink Lesslie

- 3,5 g de Fosfato monopotassico (KH2PO4);
- 2,0 g de Fosfato dissódico (Na2HPO42H2O);
- 6,25 g de Piruvato de sódio (Ácido pirúvico);
- 500 mL de Água destilada;
- Colocar o imã ao fundo do elemayer e autoclavar à 110ºC, durante 15 minutos;
- 20 mL de verde malaquita a 2%;
- Suspensão de 20 ovos inteiros +/- 1.000 mL;
- Distribuir 25 mL em placas de Petri estéreis descartáveis;
- Levar a coaguladora, atingindo 80ºC deixar por 1 hora e meia.

ANEXO C

Preparo dos meios criopreservantes:

1) 7H9 ORIGINAL (Middle broak) para 200mL

- 1,04g de 7H9;
- 200mL de água destilada;
- 0,45mL de glicerol;
- Dissolver e esterilizar em autoclave à 121-124ºC por 10 minutos;
- Após ser submetido à autoclave adicionar 20mL de OADC.

2) 7H9 MODIFICADO para 200mL

- 1,0g de 7H9;
- 0,8g de piruvato;
- 200mL de água destilada MILIQ;
- Dissolver e esterilizar em autoclave à 121-124°C por 10 minutos;
- Após ser submetido à autoclave adicionar 22mL de OADC.