

Marina de Azevedo Issa

**ESTUDO COMPARATIVO DE ENSAIOS BACTERIOLÓGICOS PARA
CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE *Mycobacterium bovis* EM AMOSTRAS
TECIDUAIS DE BOVINO COM LESÕES COMPATÍVEIS DE TUBERCULOSE**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em
Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva
Orientador: Rômulo Cerqueira Leite

Belo Horizonte
UFMG-EV
2015

186e Issa, Marina de Azevedo, 1983-
Estudo comparativo de ensaios bacteriológicos para confirmação da presença de *Mycobacterium bovis* em amostras teciduais de bovino com lesões compatíveis de tuberculose / Marina de Azevedo Issa. – 2015.
39 p. : il.

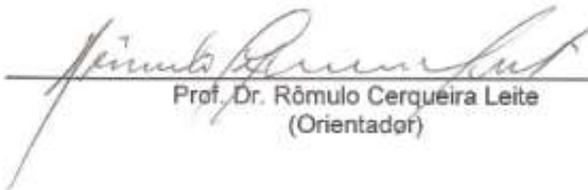
Orientador: Rômulo Cerqueira Leite
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

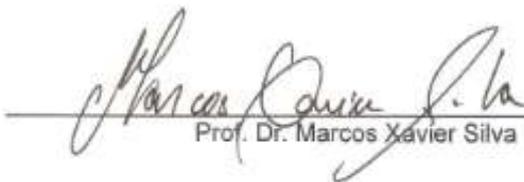
1. Bovino – Doenças – Teses. 2. *Mycobacterium bovis* – Teses. 3. Tuberculose em bovino – Teses. 4. Micobactérias – Teses. I. Leite, Rômulo Cerqueira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

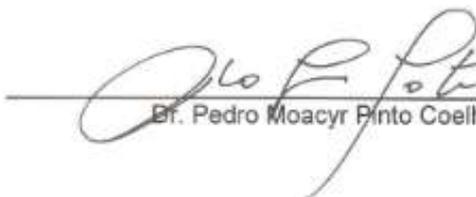
CDD – 636.089 699 5

FOLHA DE ASSINATURAS:

Dissertação defendida e aprovada em 27 de fevereiro de 2015, pela comissão
examinadora constituída por:


Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite
(Orientador)


Prof. Dr. Marcos Xavier Silva


Dr. Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota

DEDICATÓRIA

Esta dissertação de mestrado é dedicada ao meu marido Carlos Eduardo, exemplo de força, disciplina e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado sabedoria e força de vontade e por ter me guiado para chegar até onde cheguei.

Ao prof. Rômulo, meu orientador, pela oportunidade, por todo apoio e principalmente por ter acreditado em mim e no meu projeto.

Ao Ricardo Aurélio, pelo incentivo e oportunidade.

Ao Dr. Pedro Mota, meu grande exemplo, Fiscal Federal Agropecuário que implantou o método oficial de diagnóstico de tuberculose animal no LANAGRO/MG.

Ao Antônio Cândido (Tunico), grande mestre, pelos ensinamentos e por todo incentivo.

Ao Paulo, meu colega e amigo, por ter sido compreensivo e por ter me apoiado em todas as etapas do mestrado.

Aos queridos amigos Fabiana e Dario, pelo apoio, pelo carinho e deliciosos momentos de descontração.

À querida amiga Jamili, que pela graça de Deus apareceu na minha vida pra me ajudar a concluir esse mestrado.

Ao colega Eduardo Esteves, pela dedicação e grande colaboração a este trabalho.

À Lílian, colega e amiga, pela paciência e pelo grande auxílio no processamento das amostras.

Aos colegas André, Mikael, Leandro, Patrícia e “Totó” (Arianna) pela colaboração, pela convivência e momentos de alegria.

Ao meu sobrinho e afilhado amado Guilherme, por ter preenchido esses dois anos com sua existência, repleta de sorrisos, pirraças e “fofurices”.

Aos meus pais e aos meus avós, por terem me apoiado e compreendido minha ausência.

“A verdade é que o amor não morre, vira saudade. Uma saudade longa para nossa curta vida.”

(José Issa Filho)

SUMÁRIO

	RESUMO	11
	ABSTRACT	12
1.	INTRODUÇÃO	13
2.	OBJETIVOS	13
3.	REVISÃO DE LITERATURA	14
4.	MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1	AMOSTRAS	16
4.2	PREPARO DO TECIDO	16
4.3	DESCONTAMINAÇÃO.....	16
4.4	INOCULAÇÃO	17
4.5	INCUBAÇÃO E LEITURA	17
4.6	ANÁLISE DOS DADOS	17
5.	RESULTADOS	20
5.1	VALORES DOS MEIOS DE CULTURA.....	20
5.2	ISOLAMENTO.....	20
5.3	CONTAMINAÇÃO	22
5.4	TEMPO PARA VISUALIZAÇÃO DA PRIMEIRA COLÔNIA DE <i>M. bovis</i>	25
5.5	ESCORE DE COLÔNIAS AO FINAL DA INCUBAÇÃO	27
5.6	TEMPO TOTAL DE INCUBAÇÃO NECESSÁRIO PARA CADA COMBINAÇÃO DE DESCONTAMINANTE E MEIO DE CULTURA.....	28
6.	DISCUSSÃO	29
7.	CONCLUSÕES	33
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
9.	ANEXOS	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Isolamento de <i>M. bovis</i> (número de amostras negativas, positivas e as respectivas frequências - %) de amostras descontaminadas com H ₂ SO ₄ 5% e inoculadas nos meios de cultura ágar sangue tuberculose (B83), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca A (7H11 A), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca B (7H11 B) e meio de Stonebrink (SB). N = 65 por grupo.....	20
Tabela 2	Isolamento de <i>M. bovis</i> (número de amostras negativas, positivas e as respectivas frequências - %) de amostras descontaminadas com NaOH 2% e inoculadas nos meios de cultura ágar sangue tuberculose (B83), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca A (7H11 A), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca B (7H11 B) e meio de Stonebrink (SB). N = 65 por grupo.....	21

Tabela 3	Isolamento de <i>M. bovis</i> (número de amostras negativas, positivas e as respectivas frequências - %) de amostras descontaminadas com HPC 0,75 % e inoculadas nos meios de cultura ágar sangue tuberculose (B83), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca A (7H11 A), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca B (7H11 B) e meio de Stonebrink (SB). N = 65 por grupo.....	21
Tabela 4	Isolamento de <i>M. bovis</i> (número de amostras positivas e frequência - %) de amostras descontaminadas com H ₂ SO ₄ 5% (ácido), NaOH 2% (base) e HPC 0,75 % e inoculadas nos meios de cultura ágar sangue tuberculose (B83), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca A (7H11 A), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca B (7H11 B) e meio de Stonebrink (SB). N = 65 por grupo.....	22
Tabela 5	Número e frequência (%) de amostras não contaminadas (-) e contaminadas (+) inoculadas nos meios de cultura ágar sangue tuberculose (B83), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca A (7H11 A), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca B (7H11 B) e meio de Stonebrink (SB), após tratamento com água destilada deionizada estéril. N = 79 por grupo.....	23
Tabela 6	Número e frequência (%) de amostras não contaminadas (-) e contaminadas (+) inoculadas nos meios de cultura ágar sangue tuberculose (B83), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca A (7H11 A), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca B (7H11 B) e meio de Stonebrink (SB), após descontaminação com H ₂ SO ₄ 5%. N = 79 por grupo.....	23
Tabela 7	Número e frequência (%) de amostras não contaminadas (-) e contaminadas (+) inoculadas nos meios de cultura ágar sangue tuberculose (B83), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca A (7H11 A), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca B (7H11 B) e meio de Stonebrink (SB), após descontaminação com NaOH 2%. N = 79 por grupo.....	24
Tabela 8	Número e frequência (%) de amostras não contaminadas (-) e contaminadas (+) inoculadas nos meios de cultura ágar sangue tuberculose (B83), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca A (7H11 A), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca B (7H11 B) e meio de Stonebrink (SB), após descontaminação com HPC 0,75%. N = 79 por grupo.....	24

Tabela 9	Número e Frequência (%) de contaminação de amostras tratadas apenas com água destilada deionizada estéril ou descontaminadas com H ₂ SO ₄ 5% (ácido), NaOH 2% (base) ou HPC 0,75 % e inoculadas nos meios de cultura ágar sangue tuberculose (B83), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca A (7H11 A), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca B (7H11 B) e meio de Stonebrink (SB). N = 79 por grupo.....	25
Tabela 10	Média da variável tempo para aparecimento da primeira UFC (semanas), segundo os descontaminantes e meios de cultura. N=39 por grupo.....	26
Tabela 11	Média da variável quantidade de colônias (escore) ao fim de 12 semanas de incubação, segundo os descontaminantes e meios de cultura. N=39 por grupo.....	27
Tabela 12	Frequência de amostras positivas por período de incubação em relação ao total de amostras positivas ao final da incubação (12 semanas) nos meios de cultura ágar sangue tuberculose (B83), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca A (7H11 A), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca B (7H11 B) e meio de Stonebrink após descontaminação com H ₂ SO ₄ 5% (ácido), NaOH 2% (base) ou HPC 0,75 %.....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da metodologia utilizada para o preparo, descontaminação, inoculação e incubação das amostras.....	19
----------	--	----

RESUMO

O diagnóstico definitivo da tuberculose animal requer o isolamento do agente etiológico. Entretanto, não há um consenso em relação à melhor metodologia para isolamento primário de *Mycobacterium bovis* no Brasil. Este estudo avaliou os descontaminantes e meios de cultura mais utilizados no país, visando indentificar a melhor combinação para as amostras brasileiras. Três descontaminantes - hidróxido de sódio (NaOH) 2% (p/v), cloreto de hexadecilpiridinium (HPC) 0,75% (p/v) e ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5% (v/v), e quatro meios de cultura - Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento OADC da marca A (7H11 A), o mesmo meio com suplemento da marca B (7H11 B), ágar sangue tuberculose (B83) e meio de Stonebrink (SB) foram comparados. Considerando o sucesso de isolamento, não houve diferença significativa entre as combinações de descontaminantes e meios, exceto 7H11A combinado a qualquer descontaminante. Entretanto, o escore médio de colônias foi significativamente maior quando as amostras foram descontaminadas com o ácido e inoculadas em 7H11 B ou SB, sem diferença significativa entre eles, embora as colônias tenham aparecido mais cedo no meio 7H11B. A marca comercial do suplemento OADC influenciou a taxa de isolamento e o número de colônias isoladas em Middlebrook 7H11. Foi necessário um período de incubação de até quatro semanas para se detectar todas as amostras positivas inoculadas em 7H11 B após descontaminação com H₂SO₄ 5%, mas houve aumento do número de colônias até a sexta semana de incubação. A melhor estratégia para o isolamento primário de *M. bovis* das amostras brasileiras foi a descontaminação com H₂SO₄ a 5% (concentração final) e inoculação em meio Middlebrook 7H11 formulado com suplemento OADC da marca B.

Palavras-Chave: *Mycobacterium bovis*; diagnóstico; Middlebrook 7H11; isolamento; ácido sulfúrico.

ABSTRACT

The definitive diagnosis of animal tuberculosis demands the isolation of its etiological agent. However, there is no consensus on the best methodology for isolation of Mycobacterium bovis in Brazil. This study evaluated the most used decontaminants and culture media in the country, in order to identify the best combination for the Brazilian samples. Three decontaminants - 2% sodium hydroxide (NaOH) (w/v), 0.75% hexadecylpyridinium chloride (HPC) (w/v) and 5% sulphuric acid (H₂SO₄) (v/v) and four culture media - 7H11 Middlebrook with additives and OADC supplement "A" (7H11 A), the same medium with another supplement trademark (7H11 B), tuberculosis blood agar (B83) and Stonebrink's medium (SB) were compared. Regarding the isolation success, there were no significant differences between the decontaminants-media combinations, except 7H11A combined to any decontaminant. However, the mean colonies score was significantly greater when the samples were decontaminated with the acid and inoculated in 7H11 B or SB, without significant difference between them, although colonies appeared earlier on 7H11B. The trademark of OADC supplement influenced the isolation rate and the number of isolated colonies in Middlebrook 7H11. An incubation time of four weeks was required to detect all positive samples in 7H11 B after decontamination with 5% H₂SO₄ but there was an increase in the number of colonies until the sixth week of incubation. Overall, the best strategy for the primary isolation of M. bovis from Brazilian samples was the decontamination with 5% H₂SO₄ (final concentration) and inoculation in Middlebrook 7H11 medium formulated with OADC supplement "B".

Keywords: Mycobacterium bovis; diagnosis; Middlebrook 7H11; isolation; sulphuric acid.

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma doença crônica e infecciosa presente em rebanhos de diversos países. Trata-se de uma zoonose causada por *Mycobacterium bovis* que, além de impactos em saúde pública, leva a perdas econômicas para a agroindústria, principalmente devido à condenação de carcaças em frigoríficos e às restrições ao comércio internacional de carnes e animais vivos.

No Brasil, a doença encontra-se disseminada. As medidas instituídas por meio do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) são baseadas na eliminação de todos os animais reagentes ao teste tuberculínico além da vigilância em frigoríficos sob inspeção federal. Dessa forma, lesões sugestivas identificadas durante o abate são encaminhadas para a realização de diagnóstico confirmatório e o rebanho de origem dos animais tuberculosos é rastreado.

O isolamento e identificação de *M. Bovis* é o método de diagnóstico direto confirmatório mais confiável e inequívoco, sendo considerado padrão-ouro. Além de teste confirmatório, o diagnóstico bacteriológico também é utilizado para a realização de estudos epidemiológicos e para a validação de ensaios imunológicos. Entretanto, o longo período de tempo necessário para o isolamento da micobactéria e o alto nível de contaminação inicial dos espécimes clínicos são fatores limitantes. Para otimizar o isolamento primário de *M. bovis*, a amostra de tecido deve ser homogeneizada, descontaminada e posteriormente inoculada em um meio de cultura enriquecido. A escolha do descontaminante e do meio de cultura influi diretamente no sucesso do isolamento do bacilo.

O Laboratório Nacional Agropecuário– LANAGRO, localizado em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, é o laboratório de referência no Brasil para a realização do isolamento e identificação de *M. bovis*. Além do LANAGRO, outros laboratórios no país executam o diagnóstico bacteriológico de tuberculose bovina, mas percebe-se que não há um consenso em relação ao melhor descontaminante e meio de cultura a serem utilizados para as amostras brasileiras. Estudos prévios avaliaram de forma isolada o efeito de descontaminantes quanto à toxicidade e eficiência de descontaminação e o efeito de alguns meios de cultura no isolamento primário do bacilo. Entretanto, nenhum estudo no Brasil avaliou o efeito da combinação de descontaminantes e meios de cultura em relação à frequência de contaminação e isolamento de amostras, quantidade de colônias isoladas e à precocidade de crescimento de *M. bovis* de acordo com a realidade encontrada em um laboratório de rotina.

2. OBJETIVOS

O presente estudo pretendeu comparar os descontaminantes e meios de culturas mais utilizados nos laboratórios do Brasil, com o intuito de identificar a combinação capaz de aumentar a sensibilidade do diagnóstico e reduzir o intervalo necessário para o isolamento primário do micro-organismo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Mycobacterium bovis é um bacilo de crescimento lento que requer o mínimo de 14 a 21 dias de incubação para o início do aparecimento de colônias visíveis no isolamento primário. Como consequência, de acordo com o grau de contaminação inicial da amostra, as culturas de *M. bovis* podem ser inibidas por outras bactérias e por fungos que apresentam crescimento mais rápido (CORNER; TRAJSTMAN, 1988). Esses micro-organismos contaminantes, muitas vezes, exaurem os nutrientes do meio de cultura e se sobrepõem ao crescimento da micobactéria, inviabilizando sua recuperação (CORNER *et al.*, 1995; AMBROSIO *et al.*, 2008). É necessário, portanto, tratar previamente o espécime clínico com um descontaminante adequado e utilizar meios de cultura enriquecidos que garantam as condições ideais para o isolamento primário do bacilo (MEDEIROS *et al.*, 2010; CORNER *et al.*, 2012).

A descontaminação implica em uso de substâncias químicas às quais as micobactérias são, geralmente, mais resistentes que os micro-organismos contaminantes (CORNER *et al.*, 2012). A técnica de descontaminação deve ser ajustada às condições em que o diagnóstico bacteriológico for realizado, pois sabe-se que ocorre considerável variação do nível de contaminação da amostra e do tipo de micro-organismo contaminante, de acordo com a região geográfica e a forma como o material é coletado e acondicionado (CORNER *et al.*, 1995).

O procedimento de descontaminação tradicionalmente utilizado para o isolamento de *M. bovis* de amostras de tecido de bovino é o método de Petroff, que utiliza uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 4% (OIE, 2014). O cloreto de hexadecilpiridínio (HPC) e o ácido sulfúrico (H₂SO₄) são algumas alternativas ao NaOH (MARKS, 1972; CORNER; TRAJSTMAN, 1988). O método de diagnóstico validado no LANAGRO/MG utiliza o ácido sulfúrico a uma concentração de 6% como descontaminante de amostras de tecido. Sabe-se que principal problema do uso de um reagente descontaminante é o efeito adverso em relação às micobactérias na concentração efetiva para controle da contaminação, seja reduzindo o número de bacilos viáveis na amostra ou danificando sua estrutura celular, tornando o crescimento ainda mais lento (GALLAGHER; HOWILL, 1977; CORNER, 1994; CORNER *et al.*, 1995; CORNER *et al.*, 2012). Essa situação é agravada em espécimes clínicos com baixa contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs), em que a toxicidade do reagente pode levar a resultados falso negativos (HOLANDA *et al.*, 2002). Estudos prévios evidenciaram uma redução da viabilidade do bacilo em amostras tratadas previamente com NaOH 4% (CORNER; TRAJSTMAN, 1988; CORNER *et al.*, 1995; CORNER *et al.*, 2012). Por outro lado, há relatos de baixa toxicidade do HPC 0,75% e H₂SO₄ a 6% para amostras de tecido bovino inoculadas com a cepa *M. bovis* AN5 (HOLANDA *et al.*, 2002). Entretanto, foram identificados apenas dois experimentos realizados no Brasil que compararam os três descontaminantes, H₂SO₄, NaOH e HPC, em relação ao controle da contaminação do espécime clínico e à toxicidade para o bacilo bovino (AMBROSIO *et al.*, 2008; MEDEIROS *et al.*, 2011) e nenhum desses estudos utilizou amostras similares às analisadas na rotina do laboratório oficial do Ministério da Agricultura, ou seja, amostras com lesões sugestivas mantidas congeladas. Enquanto AMBROSIO *et al.*, (2008), utilizou espécimes clínicos conservados em tampão borato de sódio, MEDEIROS *et al.*, (2011) utilizou amostras paucibacilares.

Além do descontaminante, o tipo de meio de cultura influencia significativamente a sensibilidade do isolamento primário de *M. bovis* (CORNER *et al.*, 2012). Os meios mais comumente utilizados são à base de ovos como o meio de Stonebrink e Lowestein–Jensen, e à base de ágar enriquecidos

com soro e/ou sangue, como o meio Middlebrook 7H11 com aditivos e o ágar sangue tuberculose, também chamado de B83 (CORNER, 1994).

O gênero *Mycobacterium* é altamente exigente quanto à necessidade de nutrientes, podendo levar em torno de cinco semanas para se desenvolver em meio de Stonebrink, o que retarda o diagnóstico da doença (VEERMAN, 1986; MARCONDES *et al.*, 2006; MEDEIROS *et al.*, 2010). Por outro lado, o meio Middlebrook 7H11, à base de ágar e enriquecido com o suplemento OADC (ácido oléico, albumina, dextrose e catalase), proporciona o isolamento precoce do *M. bovis*, reduzindo o tempo de incubação necessário para o aparecimento de colônias para três semanas ou menos (GALLAGHER; HORWILL, 1977; CORNER; NICOLACOPOULOS, 1988; CORNER; TRAJSTMAN, 1988; VEERMAN, 1986). Entretanto, a maior concentração de nutrientes e menor concentração de verde malaquita na composição do Middlebrook 7H11 faz com que este meio seja mais suscetível ao crescimento de contaminantes quando comparado ao meio de Stonebrink (CORNER, 1994; MARCONDES *et al.*, 2006). Além disso, há relatos de lotes de suplementos OADC de baixa qualidade disponíveis no mercado, capazes até mesmo de inibir o crescimento do bacilo em meio Middlebrook 7H11 (GUTHERTZ, *et al.*, 1988; BUTLER *et al.*, 1990). O B83, meio de cultura com forte habilidade seletiva, à base de ágar e sangue, pode ser uma boa alternativa para o isolamento primário do *M. bovis*. Trata-se de um meio de baixo custo de produção e preparo simples, em que as colônias são facilmente identificadas contra um fundo vermelho-escuro (BIRN, 1965; COUSINS *et al.*, 1989). Estudo recente realizado no Brasil demonstrou maior eficiência do meio B83 em comparação ao Middlebrook 7H11 em relação à precocidade de isolamento e número de colônias isoladas (IKUTA, 2011).

Além do processo de descontaminação e do tipo de meio de cultura utilizado, o tempo de incubação das amostras também influi de forma significativa no sucesso do primo isolamento de *M. bovis* (CORNER *et al.*, 2012). A duração da incubação utilizada para o isolamento primário varia de seis a 12 semanas, ainda que possa haver redução da sensibilidade do diagnóstico caso os meios de cultura sejam incubados por período inferior a 12 semanas (WELCH, D. F., 1993; LEITE *et al.*, 2003.; HINES *et al.*, 2006; TAYLOR *et al.*, 2007; IKUTA 2011; CORNER *et al.*, 2012; ROBBE-AUSTERMAN *et al.*, 2013).

Diante do exposto, percebe-se que, embora estudos prévios tenham avaliado o desempenho de alguns descontaminantes e meios de cultura para o isolamento de *M. bovis*, nenhum deles comparou o efeito da combinação de descontaminantes e meios de cultura, visando definir a melhor metodologia para isolamento primário do bacilo nas condições reais de um laboratório de diagnóstico de rotina do Brasil.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - AMOSTRAS

Para o estudo, foram utilizadas amostras de tecido de 79 bovinos abatidos sob inspeção federal e que apresentavam lesões granulomatosas compatíveis com tuberculose. Estas amostras foram enviadas congeladas ou refrigeradas para diagnóstico no laboratório de diagnóstico de doenças bacterianas (DDB) do LANAGRO/MG, tendo sido mantidas a - 20°C por no máximo três meses até o momento das análises. O DDB possui instalações adequadas à manipulação do micro-organismo (nível 3 de biossegurança) e realiza controle rigoroso da qualidade dos meios de cultura e reagentes.

4.2 - PREPARO DO TECIDO

Após descongelamento das amostras e remoção de tecidos conectivo e adiposo, fragmentos correspondendo a aproximadamente 20 gramas foram homogeneizados em 55 mL de solução de vermelho de fenol a 0,04%, utilizando-se um triturador de tecidos (OMNI MIXER®), conforme técnica utilizada por ROBBE-AUSTERMAN *et al.* (2013).

Após homogeneização, a suspensão resultante foi filtrada em camada dupla de gaze estéril para remover fragmentos de tecido (CORNER *et al.*, 1995). O filtrado resultante, de aproximadamente 26% m/v, foi dividido em quatro alíquotas de 10 mL cada uma (CORNER *et al.*, 2012).

O procedimento de preparo do tecido vigente no LANAGRO/MG, com uso de grau, pistilo e areia, foi modificado apenas para viabilizar o experimento, uma vez que foi necessário obter quatro alíquotas de macerado o mais homogêneas possível. Entretanto, a quantidade de tecido e de solução de vermelho fenol foi precisamente calculada para se obter uma concentração final de tecido em contato com o descontaminante equivalente à obtida com a maceração tradicional. Foi realizado um experimento prévio que permitiu comprovar a equivalência das duas técnicas de preparo (dados não demonstrados).

4.3 - DESCONTAMINAÇÃO

Cada uma das quatro alíquotas de 10 mL recebeu um tratamento. A primeira alíquota foi adicionada a um tubo de centrifuga contendo um volume equivalente de H₂SO₄ na concentração de 10%, visando obter uma concentração final do ácido de 5%, segundo MARKS (1972). Essa concentração de H₂SO₄ foi estabelecida calculando-se a quantidade final de ácido em contato com o tecido quando H₂SO₄ a 6% é adicionado diretamente à 5g de amostra de tecido macerado (método vigente no LANAGRO/MG). A segunda alíquota foi adicionada a um volume equivalente de NaOH a 4%, para uma concentração final de 2% (CORNER; TRAJSTMAN, 1988). A terceira recebeu um tratamento com volume equivalente de HPC a 1,5%, para uma concentração final do descontaminante de 0,75% (CORNER *et al.*, 1995). A quarta alíquota foi adicionada a um volume equivalente de água destilada deionizada estéril para controle. Os três tubos contendo a solução resultante da mistura da amostra e descontaminante e o tubo controle ficaram em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período, as alíquotas tratadas com H₂SO₄ e NaOH foram neutralizadas com NaOH a 20% e H₂SO₄ a 10%, respectivamente. Em seguida, cada um dos quatro tubos foi centrifugado a 3000 x g por 15 minutos, o sobrenadante descartado e o *pellet* resultante ressuspensionado em 10 mL de solução

salina fosfatada tamponada. O tempo total do contato da suspensão de tecido com a solução de HPC foi de, aproximadamente, 60 minutos. Após 10 minutos de descanso, 200 µL de cada tubo foi inoculado em duplicata (dois tubos 16 x 150 mm de cada meio de cultura).

4.4 - INOCULAÇÃO

Foram utilizados quatro meios de culturas diferentes: meio de Stonebrink modificado (MOTA, 1985), meio ágar sangue tuberculose ou B83 (COUSINS *et al.*, 1989), ágar Middlebrook 7H11 com aditivos (ROBBE-AUSTERMAN *et al.*, 2013) e suplemento OADC da marca Himedia® (aqui representado por 7H11 A) e o mesmo meio ágar Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento OADC da marca Difco® (aqui representado por 7H11 B). Para cada tratamento, dois tubos de ensaio de cada meio de cultura foram semeados.

4.5 - INCUBAÇÃO E LEITURA

Os tubos ficaram incubados em estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e foram examinados semanalmente por 12 semanas. O número de colônias de *M. bovis* em cada tubo de meio foi contabilizado e classificado de acordo com CORNER *et al.*, (2012) em escore um (1 a 9 colônias), escore dois (10 a 99) colônias, escore três (≥ 100 colônias individuais) e escore quatro (crescimento confluyente). Tubos de meios de cultura em que houve deterioração do meio, ou onde se avaliou que os micro-organismos contaminantes como fungos e bactérias atípicas interferiram no crescimento de *M. bovis*, foram considerados contaminados. Os meios de cultura não contaminados ou com isolamento de colônias típicas foram monitorados por todo o período de incubação independentemente dos resultados dos outros meios de cultura para a mesma amostra. Os resultados das leituras, como início de aparecimento de colônias visíveis com características de *M. bovis*, escore de colônias em cada semana de incubação e contaminação em cada tubo de meio de cultura, foram registrados em formulários apropriados para posterior compilação dos dados. Os isolados resultantes foram identificados como *M. bovis* pelas características morfológicas das colônias e pela prova de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) realizado no Laboratório de Biologia Molecular (LBM) do LANAGRO/MG (SALES *et al.*, 2014).

4.6 - ANÁLISES DOS DADOS

As variáveis analisadas foram frequência de isolamento e contaminação, tempo em semanas para aparecimento da primeira colônia, escore de colônias na 12ª semana de incubação e tempo máximo necessário para detecção de todas as amostras positivas de acordo com as combinações de descontaminantes e meios de cultura.

As variáveis frequência de contaminação e isolamento foram analisadas pelo teste Q de Cochran e teste de McNemar a um nível de significância de cinco por cento com o auxílio do programa MedCalc (versão gratuita para teste). Quando a frequência esperada foi muito pequena, utilizou-se a prova binomial de preferência à prova de McNemar, de acordo com SIEGEL (1975). As variáveis tempo em semanas para aparecimento da primeira colônia e o escore na 12ª semana de incubação foram analisadas pelo teste de Friedman e pelo teste de Dunn a um nível de significância de cinco por cento com o auxílio do programa Graphpad Prism®.

Para a estimativa dos valores de cada meio de cultura, foi feita a média de três orçamentos de cada reagente utilizado em cada meio de cultura, exceto do pó para Middlebrook 7H11 Difco™ e do suplemento OADC da marca B, oferecidos por apenas um representante no Brasil.

Para análise da frequência de isolamento, foram excluídos os dados das amostras em que o meio de cultura foi considerado contaminado. Para a análise das variáveis tempo em semanas para aparecimento da primeira colônia e score na 12ª semana de incubação, foram analisados dados das amostras onde houve isolamento de *M. bovis* em ao menos uma das réplicas de cada um dos quatro tipos de meio de cultura inoculados para cada descontaminante. Na figura abaixo é possível visualizar a representação esquemática da metodologia utilizada para o preparo, descontaminação, inoculação e incubação das amostras.

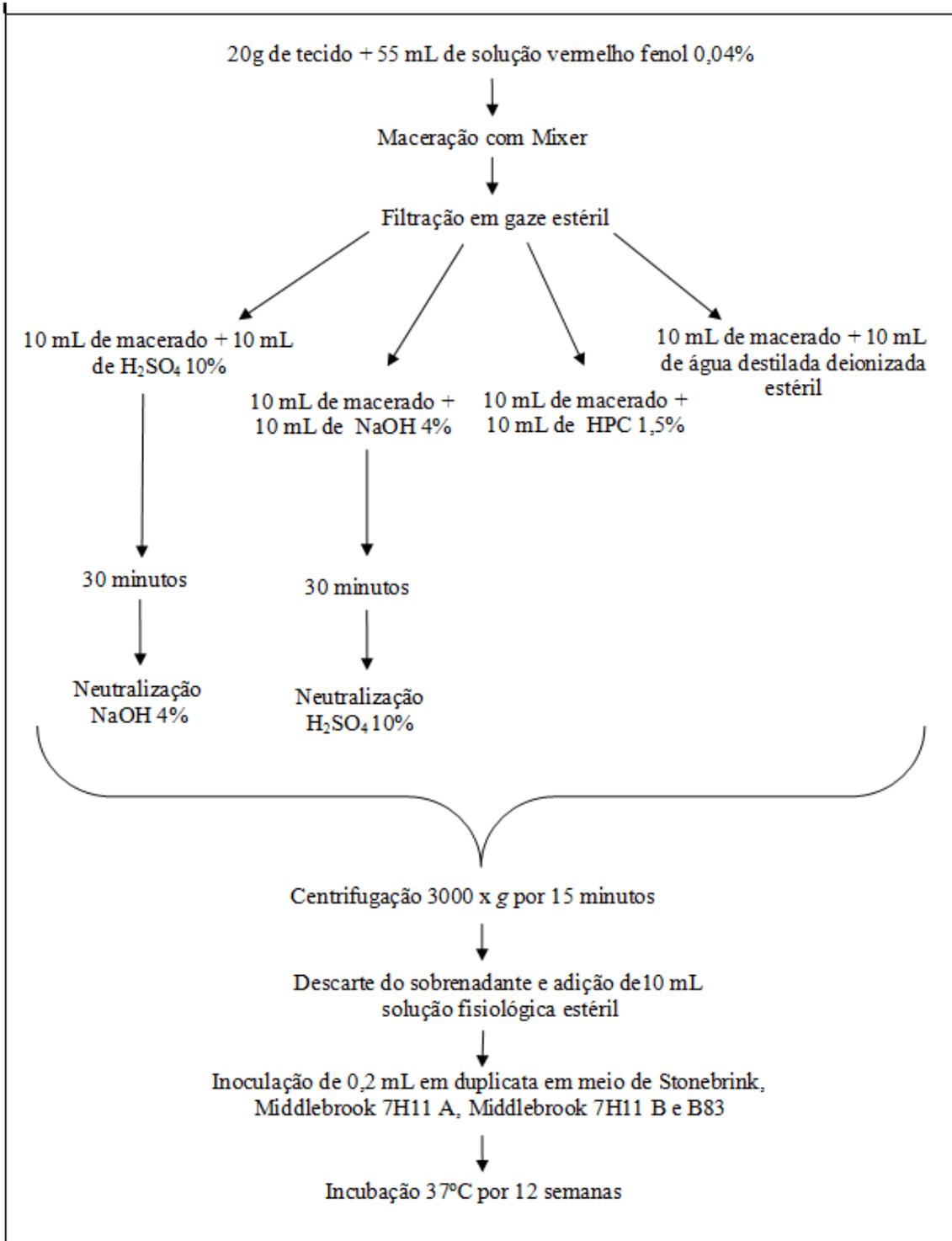


Figura 1 - Representação esquemática da metodologia utilizada para o preparo, descontaminação, inoculação e incubação das amostras.

5. RESULTADOS

5.1 - VALORES DOS MEIOS DE CULTURA

Com base na soma da média de três orçamentos de cada reagente utilizado, o meio de Stonebrink apresentou custo de produção de aproximadamente R\$ 0,24/tubo de meio de cultura, o meio B83, R\$ 0,32/tubo de meio, o meio 7H11 A, R\$ 2,00 /tubo e o meio 7H11 B, R\$ 4,62/ tubo. O orçamento dos reagentes foi realizado em maio de 2015, com o dólar cotado a 3,08.

5.2 - ISOLAMENTO

O número e a frequência de isolamento de *M. bovis* de amostras de tecido bovino com lesões compatíveis com tuberculose inoculadas em cada meio de cultura após tratamento com cada descontaminante são apresentados nas tabelas de 1 a 3.

Tabela 1 - Isolamento de *M. bovis* (número de amostras negativas, positivas e as respectivas frequências - %) de amostras descontaminadas com H₂SO₄ 5% e inoculadas nos meios de cultura ágar sangue tuberculose (B83), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca A (7H11 A), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca B (7H11 B) e meio de Stonebrink (SB). N = 65 por grupo.

Meio de cultura	Isolamentos - número e frequência (%)	
	(-)	(+)
SB	3 (4,6%)	62 (95,4% ^a)
7H11 B	4 (6,2%)	61 (93,8% ^a)
B83	4 (6,2%)	61 (93,8% ^a)
7H11 A	10 (15,4%)	55 (84,6% ^b)

Letras iguais não diferem estatisticamente ($p > 0,05$), segundo o teste de McNemar ou teste binomial.

Tabela 2 - Isolamento de *M. bovis* (número de amostras negativas, positivas e as respectivas frequências - %) de amostras descontaminadas com NaOH 2% e inoculadas nos meios de cultura ágar sangue tuberculose (B83), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca A (7H11 A), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca B (7H11 B) e meio de Stonebrink (SB). N = 65 por grupo.

Meio de cultura	Isolamentos - número e frequência (%)	
	(-)	(+)
7H11 B	4 (6,2%)	61 (93,8% ^a)
SB	4 (6,2%)	61 (93,8% ^a)
B83	5 (7,7%)	60 (92,3% ^a)
7H11 A	13 (20,0%)	52 (80,0% ^b)

Letras iguais não diferem estatisticamente ($p > 0,05$), segundo o teste de McNemar ou teste binomial.

Tabela 3 - Isolamento de *M. bovis* (número de amostras negativas, positivas e as respectivas frequências - %) de amostras descontaminadas com HPC 0,75 % e inoculadas nos meios de cultura ágar sangue tuberculose (B83), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca A (7H11 A), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca B (7H11 B) e meio de Stonebrink (SB). N = 65 por grupo.

Meio de cultura	Isolamentos - número e frequência (%)	
	(-)	(+)
SB	5 (7,7%)	60 (92,3% ^a)
7H11 B	7 (10,8%)	58 (89,2% ^a)
B83	7 (10,8%)	58 (89,2% ^a)
7H11 A	18 (27,7%)	47 (72,3% ^b)

Letras iguais não diferem estatisticamente ($p > 0,05$), segundo o teste de McNemar.

Após a descontaminação das amostras com ácido, base ou HPC, não houve diferença significativa de frequência de isolamentos entre os meios B83, Middlebrook 7H11 B e meio de Stonebrink.

Por outro lado, a frequência de isolamento em meio 7H11 A foi significativamente menor que nos demais meios de cultura ($p < 0,05$).

A frequência de isolamento de *M. bovis* de amostras de tecido bovino com lesões compatíveis com tuberculose em cada combinação de descontaminante e meio de cultura é apresentada na tabela 4.

Tabela 04 – Isolamento de *M. bovis* (número de amostras positivas e frequência -%) de amostras descontaminadas com H₂SO₄ 5% (ácido), NaOH 2% (base) e HPC 0,75 % e inoculadas nos meios de cultura ágar sangue tuberculose (B83), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca A (7H11 A), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca B (7H11 B) e meio de Stonebrink (SB). N = 65 por grupo.

Meio de cultura	Isolamento - número e frequência (%)		
	Ácido	Base	HPC
SB	62 (95,4% ^a)	61 (93,8% ^a)	60 (92,3% ^{ad})
7H11 B	61 (93,8% ^a)	61 (93,8% ^a)	58 (89,2% ^{ac})
B83	61 (93,8 % ^a)	60 (92,3% ^{ad})	58 (89,2% ^{ac})
7H11 A	55 (84,6% ^{bcd})	52 (80,0% ^{bc})	47 (72,3% ^b)

Letras iguais em cada linha e/ou coluna não diferem estatisticamente ($p > 0,05$), segundo o teste de McNemar.

Ao analisar separadamente cada tipo de meio de cultura inoculado, verifica-se que não houve diferença significativa de frequência de isolamento após a descontaminação das amostras com o ácido, a base ou o HPC ($p > 0,05$). A descontaminação com HPC e inoculação em meio Middlebrook 7H11A resultou na menor frequência de isolamento, mas sem diferença significativa em comparação à inoculação no mesmo meio de cultura após tratamento com o ácido ou a base.

5.3 - CONTAMINAÇÃO

O número e a frequência de contaminação das amostras de tecido bovino com lesões compatíveis com tuberculose inoculadas em cada tipo de meio de cultura e tratadas apenas com água destilada deionizada estéril ou previamente descontaminadas com ácido, base ou HPC são apresentado nas tabelas de 5 a 7.

Tabela 5 - Número e frequência (%) de amostras não contaminadas (-) e contaminadas (+) inoculadas nos meios de cultura ágar sangue tuberculose (B83), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca A (7H11 A), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca B (7H11 B) e meio de Stonebrink (SB), após tratamento com água destilada deionizada estéril. N = 79 por grupo.

Meio de cultura	Contaminação – número e frequência (%)	
	(-)	(+)
B83	26 (32,9%)	53 (67,1 ^a)
7H11 B	05 (6,3 %)	74 (93,7 ^b)
SB	04 (5,1%)	75 (94,9 ^b)
7H11 A	03 (3,8%)	76 (96,2 ^b)

Letras iguais não diferem estatisticamente ($p>0,05$), segundo o teste de McNemar.

Tabela 6 - Número e frequência (%) de amostras não contaminadas (-) e contaminadas (+) inoculadas nos meios de cultura ágar sangue tuberculose (B83), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca A (7H11 A), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca B (7H11 B) e meio de Stonebrink (SB), após descontaminação com H₂SO₄ 5%. N = 79 por grupo.

Meio de cultura	Contaminação – número e frequência (%)	
	(-)	(+)
B83	78 (98,7%)	1 (1,3% ^a)
7H11 B	77 (97,5%)	2 (2,5% ^a)
7H11 A	75 (94,9%)	4 (5,1% ^a)
SB	73 (92,4 %)	6 (7,6% ^a)

Letras iguais não diferem estatisticamente ($p>0,05$), segundo o teste de McNemar.

Tabela 7 - Número e frequência (%) de amostras não contaminadas (-) e contaminadas (+) inoculadas nos meios de cultura ágar sangue tuberculose (B83), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca A (7H11 A), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca B (7H11 B) e meio de Stonebrink (SB), após descontaminação com NaOH 2%. N = 79 por grupo. Letras iguais não diferem estatisticamente ($p>0,05$), segundo o teste McNemar ou teste binomial.

Meio de cultura	Contaminação – número e frequência (%)	
	(-)	(+)
7H11 A	78 (98,7%)	1 (1,3% ^a)
7H11 B	77 (97,5%)	2 (2,5% ^a)
B83	77 (97,5%)	2(2,5% ^a)
SB	74 (93,7%)	5 (6,3% ^a)

Tabela 8 - Número e frequência (%) de amostras não contaminadas (-) e contaminadas (+) inoculadas nos meios de cultura ágar sangue tuberculose (B83), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca A (7H11 A), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca B (7H11 B) e meio de Stonebrink (SB), após descontaminação com HPC 0,75%. N = 79 por grupo

Meio de cultura	Contaminação – número e frequência (%)	
	(-)	(+)
B83	76 (96,2%)	3 (3,8% ^a)
7H11 A	73 (92,4%)	6 (7,6% ^a)
SB	73 (92,4%)	6 (7,6 % ^a)
7H11 B	73 (92,4%)	6 (7,6 % ^a)

Letras iguais não diferem estatisticamente ($p>0,05$), segundo o teste de McNemar.

Para as amostras tratadas apenas com água destilada deionizada estéril, o meio B83 apresentou frequência de contaminação significativamente menor em comparação aos meios Middlebrook 7H11 A, Middlebrook 7H11 B e meio de Stonebrink ($p<0,05$).

Não houve diferença significativa de frequência de contaminação entre os quatro meios de cultura inoculados após descontaminação das amostras com ácido, base ou HPC ($p>0,05$).

A frequência de contaminação das amostras de tecido bovino com lesões compatíveis com tuberculose em cada combinação de descontaminante e meio de cultura é apresentada na tabela 09

Tabela 09 – Número e Frequência (%) de contaminação de amostras tratadas apenas com água destilada deionizada estéril ou descontaminadas com H₂SO₄ 5% (ácido), NaOH 2% (base) ou HPC 0,75 % e inoculadas nos meios de cultura ágar sangue tuberculose (B83), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca A (7H11 A), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca B (7H11 B) e meio de Stonebrink (SB). N = 79 por grupo.

Meio de cultura	Contaminação - número e frequência (%)			
	Ácido	Base	HPC	Água
B83	1 (1,3% ^a)	2 (2,5% ^a)	3 (3,8% ^a)	53 (67,1 ^b)
7H11 B	2 (2,5% ^a)	2 (2,5% ^a)	6 (7,6% ^a)	74 (93,7 ^c)
7H11 A	4 (5,1% ^a)	1 (1,3% ^a)	6 (7,6% ^a)	76 (96,2 ^c)
SB	6 (7,6% ^a)	5 (6,3% ^a)	6 (7,6 % ^a)	75 (94,9 ^c)

Letras iguais não diferem estatisticamente ($p > 0,05$), segundo o teste de McNemar ou teste binomial.

Para cada meio de cultura inoculado, não houve diferença significativa de frequência de contaminação quando as amostras foram descontaminadas com ácido, base ou HPC ($p > 0,05$). Para cada meio de cultura inoculado, todos os três descontaminantes avaliados reduziram significativamente a contaminação das amostras ($p < 0,05$).

5.4 - TEMPO PARA VISUALIZAÇÃO DA PRIMEIRA COLÔNIA DE *M. BOVIS*.

O tempo de incubação (em semanas) necessário para a visualização da primeira colônia (UFC) de *M. bovis* em cada um dos meios de cultura inoculados após tratamento das amostras com lesões sugestivas de tuberculose com cada descontaminante é apresentado na tabela 10.

Tabela 10 – Média da variável tempo para aparecimento da primeira UFC (semanas), segundo os descontaminantes e meios de cultura. N=39 por grupo.

Meio de cultura	Descontaminante		
	Ácido ¹ \bar{X}	Base ² \bar{X}	HPC ³ \bar{X}
7H11B ⁴	2,9 ^{A a}	2,9 ^{A a}	3,4 ^a
7H11A ⁵	3,4 ^{A a}	3,6 ^{A a}	3,8 ^{ab}
B83 ⁶	3,4 ^{A a}	3,5 ^{A a}	4,2 ^b
SB ⁷	5,2 ^A	5,6 ^A	5,8

Solução de ácido sulfúrico a 5%¹; Solução de hidróxido de sódio a 2%²; Solução de cloreto de hexadecilpiridínio a 0,75%³; Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento marca B⁴; Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento marca A⁵; Ágar sangue tuberculose⁶; Meio de Stonebrink⁷. Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre descontaminantes e letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre os meios de cultura, segundo o teste de Dunn ($p > 0,05$).

Para cada um dos três descontaminantes avaliados, as amostras apareceram primeiro nos meios à base de ágar (Middlebrook 7H11 A, Middlebrook 7H11 B e B83) e por último no meio à base de ovos (Stonebrink) ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa de semana para aparecimento da primeira colônia de *M. bovis* entre os meios 7H11B, 7H11A e B83 quando a descontaminação foi realizada com o ácido ou a base ($p > 0,05$). Quando as amostras foram descontaminadas com HPC, houve diferença significativa do tempo para aparecimento da primeira colônia entre os meios 7H11 B, B83 e Stonebrink e entre os meios 7H11 A e Stonebrink ($p < 0,05$).

O tempo para início do aparecimento de colônias nos meios 7H11A, 7H11B, B83 e Stonebrink foi significativamente menor quando as amostras foram descontaminadas com o ácido ou a base em comparação ao HPC ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre o ácido e a base, em todos os meios de cultura avaliados.

Ao comparar todos os dados em conjunto nota-se que o tempo de incubação para aparecimento da primeira colônia de *M. bovis* foi menor quando as amostras foram descontaminadas com o ácido ou a base e inoculadas em qualquer um dos três meios de cultura à base de ágar avaliados (Middlebrook 7H11A, Middlebrook 7H11 B e B83). O Tempo para início do aparecimento de colônias foi maior quando as amostras foram descontaminadas com HPC e inoculadas em meio de Stonebrink.

5.5 – ESCORE DE COLÔNIAS AO FINAL DA INCUBAÇÃO.

A quantidade de colônias de *M. bovis* (em escore) contabilizada ao final do período de 12 semanas de incubação em cada meio de cultura inoculado após tratamento com cada descontaminante é apresentada na tabela 11.

Tabela 11 - Média da variável quantidade de colônias (escore) ao fim de 12 semanas de incubação, segundo os descontaminantes e meios de cultura. N=39 por grupo.

Meio de cultura	descontaminante		
	Ácido ¹ \bar{X}	Base ² \bar{X}	HPC ³ \bar{X}
7H11B ⁴	3,2 ^a	2,7 ^a	2,2 ^a
SB ⁵	3 ^{ab}	2,6 ^{B a}	2,4 ^{B a}
B83 ⁶	2,8 ^{A b}	2,6 ^{A a}	2,1 ^{ab}
7H11A ⁷	2,7 ^b	2 ^B	1,9 ^{B b}

Solução de ácido sulfúrico a 5%¹; Solução de hidróxido de sódio a 2%²; Solução de cloreto de hexadecilpiridínio a 0,75%³; Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento marca B⁴; Meio de Stonebrink⁵; Ágar sangue tuberculose⁶; Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento marca A⁷. Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre descontaminantes e letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre os meios de cultura, segundo o teste de Dunn.

Para as amostras descontaminadas com o ácido, o escore de colônias no meio Middlebrook 7H11 B foi significativamente maior em comparação aos meios B83 e Middlebrook 7H11 A ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa de escore entre os meios de Stonebrink e 7H11B e entre os meios de Stonebrink, B83 e Middlebrook 7H11 A ($p > 0,05$).

Para as amostras tratadas com base, o meio Middlebrook 7H11A apresentou o menor escore de colônias em comparação aos demais meios de cultura avaliados ($p < 0,05$) e não houve diferença significativa de escore de colônias entre os meios Middlebrook 7H11B, de Stonebrink e B83 ($p > 0,05$).

Para as amostras descontaminadas com HPC, o meio Middlebrook 7H11A apresentou escore de colônias menor em comparação aos meios Middlebrook 7H11B e de Stonebrink ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os meios Middlebrook 7H11B, de Stonebrink e B83 e entre os meios B83 e 7H11A ($P > 0,05$).

Para os três descontaminantes avaliados, o escore de colônias foi significativamente maior em meio Middlebrook 7H11 B em comparação ao Middlebrook 7H11A ($P < 0,05$) e não houve diferença significativa entre os meios Middlebrook 7H11B e de Stonebrink ($p > 0,05$).

Todos os meios de cultura avaliados apresentaram maior escore de colônias ao final do período de 12 semanas de incubação quando as amostras foram previamente descontaminadas com ácido em comparação à descontaminação com HPC ($p < 0,05$). Após descontaminação com o ácido, houve maior quantidade de colônias isoladas nos meios Middlebrook 7H11A, Middlebrook 7H11B e Stonebrink em comparação à descontaminação com base e HPC ($P < 0,05$). Para as amostras inoculadas no meio Middlebrook 7H11B, houve diferença significativa entre os três descontaminantes avaliados ($p < 0,05$) sendo o maior escore verificado para amostras previamente descontaminadas com o ácido e o menor, para as amostras descontaminadas com o HPC. Não houve diferença significativa de escore de colônias nos meios de Stonebrink e Middlebrook 7H11A quando as amostras foram previamente descontaminadas com a base em comparação ao HPC ($p > 0,05$). Não houve diferença significativa de escore de colônias após a descontaminação com ácido ou base das amostras inoculadas no meio B83 ($p > 0,05$).

5.6 – TEMPO TOTAL DE INCUBAÇÃO NECESSÁRIO PARA CADA COMBINAÇÃO DE DESCONTAMINANTE E MEIO DE CULTURA

A frequência de amostras positivas por período de incubação em relação ao total de amostras positivas ao final da incubação (12 semanas) para cada combinação de descontaminante e meio de cultura é apresentada na tabela 12.

Observa-se que para cada descontaminante, o tempo necessário para isolamento em 100% das amostras positivas foi sempre menor quando a inoculação ocorreu em meio 7H11 (A ou B) em comparação à inoculação nos demais meios. A combinação que apresentou os melhores resultados foi meio Middlebrook 7H11 B após a descontaminação com a base ou o ácido, em que 100% das amostras positivas cresceram até a quarta semana de incubação. A inoculação em meio de Stonebrink após descontaminação com qualquer um dos três descontaminantes elevou o tempo de incubação para crescimento de 100% das amostras positivas para até 10 semanas. O maior período de tempo requerido para identificar a última amostra positiva foi entre 10 e 12 semanas para a combinação HPC - B83.

Tabela 12 – Frequência de amostras positivas por período de incubação em relação ao total de amostras positivas ao final da incubação (12 semanas) nos meios de cultura ágar sangue tuberculose (B83), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca A (7H11 A), Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca B (7H11 B) e meio de Stonebrink após descontaminação com H₂SO₄ 5% (ácido), NaOH 2% (base) ou HPC 0,75 %.

Período de incubação (Semanas)	Ácido				Base				HPC			
	B83	7H11 A	7H11 B	SB	B83	7H11 A	7H11 B	SB	B83	7H11 A	7H11 B	SB
0-4	95	75	100	15	95	70	100	9	59	78	83	6
4-6	98	100	100	87	98	100	100	70	92	96	97	71
6-8	100	100	100	97	100	100	100	97	95	100	100	95
8-10	100	100	100	100	100	100	100	100	97	100	100	100
10-12	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

6. DISCUSSÃO

A frequência de isolamentos verificada no estudo variou de 72,3% (amostras tratadas com HPC e inoculadas em 7H11 A) a 95,4% (amostras tratadas com ácido sulfúrico e inoculadas em meio de Stonebrink). Entretanto, não houve diferença significativa de frequência de isolamentos entre as combinações formadas pelos meios de Stonebrink, 7H11 B e B83 e qualquer um dos três descontaminantes avaliados (tabelas 1, 2 e 3). Este resultado pode ter ocorrido devido ao tipo de amostras utilizado no experimento: tecido bovino com lesões compatíveis com tuberculose, que provavelmente continham grande quantidade de bacilos viáveis. Diferença significativa entre as combinações poderia ter sido verificada caso se tratasse de amostras paucibacilares. Essa suposição é reiterada pela observação de diferença significativa da quantidade de colônias isoladas entre as diferentes combinações de descontaminantes e meios de cultura (tabela 11).

O meio ágar sangue tuberculose, ou B83, reduziu consideravelmente a taxa de contaminação das amostras não submetidas a um processo de descontaminação (Tabela 5). Esse resultado está provavelmente relacionado à presença de penicilina na formulação do meio (2,5 mL de penicilina a 20.000 UI/mL para 1800 mL de meio de cultura), o que torna o B83 altamente seletivo (BIRN, 1965). Porém, quando as amostras receberam tratamento prévio com qualquer um dos três descontaminantes, não houve diferença significativa em relação à frequência de contaminação nos quatro meios de cultura avaliados (tabelas 6, 7 e 8). Portanto, a alta eficiência do ácido, da base ou do HPC, em relação à redução da contaminação inicial das amostras, dispensa o uso de um meio de cultura com alta seletividade. Por outro lado, o B83 pode ser considerado uma boa estratégia para inoculação de amostras que, ao contrário das avaliadas neste estudo, apresentem baixo risco de contaminação e, portanto, não precisam ser previamente descontaminadas.

Os dados obtidos para as amostras tratadas apenas com água destilada estéril demonstram uma alta contaminação inicial dos tecidos por outros micro-organismos (Tabela 5). É provável que a coleta em frigorífico, associada às condições de estocagem e ao tempo de trânsito até o laboratório tenha contribuído para o nível de contaminação encontrado neste estudo, ratificando a necessidade de descontaminação prévia das amostras de tecido encaminhadas pelo SIF.

Os três descontaminantes avaliados foram igualmente eficientes em relação ao controle da contaminação inicial das amostras (tabela 9). Esses resultados corroboram os achados de HOLANDA *et al.*, (2002). Ao comparar o efeito de HPC 0,75%, cloreto de benzalcônio (CB) 0,25%, ácido oxálico (AO) 5% e H₂SO₄ 6% para descontaminação de amostras de tecido bovino, os autores não verificaram diferença significativa em relação à taxa de contaminação. CORNER e TRAJSTMAN (1988) também não evidenciaram diferença em relação a contaminação de amostras após tratamento prévio com NaOH 2% em comparação ao HPC 0,75%. Por outro lado, AMBROSIO *et al.* (2008) verificaram maior eficiência do HPC 0,75% em comparação ao NaOH 2% e H₂SO₄ 6% para descontaminação de amostras de tecido bovino. Porém, as amostras utilizadas no experimento foram conservadas em solução saturada de borato de sódio, enquanto no presente estudo, elas foram mantidas a - 20 °C até o início das análises. Sabe-se que o grau de contaminação e o tipo de micro-organismo contaminante encontrados na rotina do laboratório de diagnóstico de tuberculose varia consideravelmente com a maneira como a amostra é coletada e estocada (CORNER *et al.*, 1995). Dessa forma, é possível que essa divergência de resultados observada seja decorrente da variação do modo de conservação das amostras.

As colônias de *M. bovis* apareceram mais cedo nos meios à base de ágar (Middlebrook 7H11 A, Middlebrook 7H11 B e meio B83) em comparação ao meio à base de ovos avaliado (meio de

Stonebrink), após tratamento das amostras com qualquer um dos três descontaminantes (tabela 10). Vários estudos constataram aparecimento precoce de colônias de *M. bovis* em meios de cultura à base de ágar em comparação aos meios à base de ovos, embora todos esses trabalhos tenham relatado uma superioridade dos meios à base de ovos em relação à quantidade de colônias isoladas (CORNER; TRAJSTMAN, 1988; CORNER, 1995; CORNER *et al.*, 2012). Por causa desses resultados, alguns autores sugerem o uso dos dois tipos de meio de cultura em paralelo (CORNER; NICOLACOPOULOS, 1988; CORNER *et al.*, 2012). Entretanto, os dados obtidos demonstraram que o meio Middlebrook 7H11 B foi capaz de isolar a maior quantidade de colônias após a descontaminação das amostras com o ácido, sem diferença significativa em comparação ao meio de Stonebrink (tabela 11). Dessa forma, após tratamento do tecido com H₂SO₄ 5%, a inoculação em Middlebrook 7H11 B é suficiente para se obter tanto a maior quantidade de colônias quanto precocidade de isolamento, sem necessidade de uso de um segundo tipo de meio de cultura, como o meio de Stonebrink. A redução do período de tempo do diagnóstico bacteriológico é de extrema importância por permitir decisões antecipadas em relação ao controle sanitário do rebanho, impedindo assim a disseminação da doença. O isolamento de maior quantidade de colônias é significativo principalmente no caso de amostras com suspeita de pouca quantidade de bacilos viáveis.

A maioria dos reagentes utilizada para descontaminação das amostras apresenta efeito adverso também para o *M. bovis*, aumentando o tempo do início de aparecimento de colônias e reduzindo o número de colônias recuperadas (CORNER, 1994; CORNER *et al.*, 2012). Houve aumento do tempo de incubação necessário para aparecimento da primeira colônia em todos os meios de cultura avaliados além de redução do escore final de colônias nos meios 7H11 B e B83, quando as amostras foram tratadas com HPC em comparação ao ácido e à base, evidenciando a alta toxicidade desse reagente (tabelas 10 e 11). Esse efeito tóxico pode levar a um resultado falso negativo quando o espécime clínico analisado apresentar baixa quantidade de UFCs (HOLANDA *et al.*, 2002). CORNER e TRAJSTMAN (1988), ao contrário do presente estudo, observaram a presença de menor quantidade de colônias em Middlebrook 7H11 após o tratamento das amostras com NaOH 2% em comparação ao HPC 0,75%, embora não tenham observado diferença significativa em relação ao início de aparecimento das colônias. CORNER *et al.* (2012) relataram tanto redução de bacilos viáveis quanto atraso do aparecimento de colônias quando as amostras foram previamente descontaminadas com NaOH 2% em comparação ao HPC 0,75%. Essa discrepância entre os resultados de toxicidade dos reagentes pode estar associada à variação do estado metabólico do *M. bovis* presente nas amostras utilizadas em cada estudo. Diferentes descontaminantes podem apresentar diferentes modos de ação dependendo do estado metabólico do bacilo, ou seja, bactérias em latência ou em crescimento ativo podem ser afetadas de maneira diferente por cada reagente utilizado (CORNER *et al.*, 2012). Por outro lado, os resultados obtidos para tempo de aparecimento da primeira UFC e quantidade de colônias isoladas (tabelas 10 e 11), demonstraram que o ácido foi o descontaminante menos agressivo para a micobactéria. Resultado semelhante foi obtido por HOLANDA *et al.*, (2002). Ao comparar quatro descontaminantes - H₂SO₄ 6%, HPC 0,75%, AO 5%, e CB 0,25% - os autores verificaram uma menor toxicidade do ácido em comparação aos demais reagentes, para amostras contaminadas com a cepa de referência *M. bovis* AN5 na diluição 1 x 10⁻⁶ mg/ml.

Foi evidenciado que a marca e provavelmente a qualidade do suplemento OADC influencia o desempenho do meio Middlebrook 7H11 com aditivos. O meio Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento OADC da marca B garantiu maior taxa de isolamento e maior quantidade de colônias isoladas quando comparado ao mesmo meio Middlebrook 7H11 formulado com suplemento de outra marca comercial (suplemento A) (tabelas 04 e 11). Sabe-se que suplementos

OADC disponíveis comercialmente podem não apresentar a qualidade necessária para suportar o crescimento adequado da micobactéria (CAGE, 1994). BUTLER *et al.*, (1990) relataram que a variação de algum componente entre os lotes dos suplementos disponíveis comercialmente pode estimular ou inibir o crescimento dos bacilos. A comparação da fórmula dos dois suplementos testados permitiu identificar maior concentração de ácido oléico no suplemento da marca B em comparação ao suplemento da marca A. Sabe-se que o ácido oléico, quando adicionado aos meios de cultura à base de ágar, é responsável por aumentar consideravelmente o crescimento de micobactérias (DUBOS, 1947). A maior concentração do ácido graxo no suplemento B pode ter contribuído para o melhor desempenho apresentada pelo meio. Esses dados demonstram a importância de se testar previamente um lote comercial do suplemento OADC para comprovar sua eficiência antes de aprová-lo para uso na rotina de diagnóstico. A troca da marca comercial do suplemento já aprovado só deve ocorrer mediante novo teste de eficiência, comparando os resultados do novo produto aos resultados do produto em uso.

O tempo de incubação necessário para o isolamento de *M. bovis* de todas as amostras positivas variou de acordo com a combinação de descontaminante e meio de cultura avaliada. Para cada descontaminante, o tempo para todas as amostras se tornarem positivas foi mais longo em meio de Stonebrink em comparação ao Middlebrook 7H11 A ou B (tabela 18). CORNER *et al.*, (2012) obtiveram o mesmo resultado após o tratamento das amostras com HPC e cloreto de benzalcônio (BC), embora não tenha observado nenhuma diferença quando as amostras foram descontaminadas com NaOH. A combinação HPC-B83 foi a que resultou em maior período de tempo (de 10 a 12 semanas) para todas as amostras se tornarem positivas. Tal fato pode ser explicado pela dificuldade de visualização de colônias em início de crescimento neste meio de cultura. Embora BIRN (1965) tenha salientado a facilidade de leitura das colônias em meio B83, esta condição não foi verificada no presente estudo. A presença de pequenos restos teciduais do inóculo sobre o meio escuro encobriu colônias muito pequenas. IKUTA (2011) já havia relatado a dificuldade de leitura de colônias ao utilizar o meio B83.

O período de incubação do meio Middlebrook 7H11 necessário para se alcançar o maior nível de sensibilidade foi de oito semanas. Este período reduziu para quatro semanas quando as amostras foram descontaminadas com o ácido ou a base e inoculadas em meio 7H11 com suplemento da marca B. Entretanto, como foi verificado o aumento do número de colônias dessas amostras até a sexta semana de incubação (dados não apresentados), recomenda-se a incubação das amostras inoculadas em Middlebrook 7H11 B por até seis semanas para garantir o máximo de isolamento.

Em síntese, os dados consolidados no presente estudo demonstram que a melhor estratégia para o isolamento primário de *M. bovis* de amostras de tecido bovino no Brasil é a descontaminação prévia com H₂SO₄ 5% e inoculação em meio Middlebrook 7H11 B com incubação a 37°C por até seis semanas. Entretanto, no caso de laboratórios com recursos limitados, pode-se considerar determinados critérios para a escolha da combinação descontaminante-meio de cultura. Caso o critério para escolha seja maior número de amostras isoladas e menor contaminação, pode-se optar pelos meios de cultura de baixo custo de produção como o Stonebrink e o meio B83, após descontaminação com o ácido, a base ou o HPC. Se o tempo necessário para diagnóstico for significativo, deve-se optar por um dos meios à base de ágar (Middlebrook 7H11 ou B83) após descontaminação com o ácido ou a base. Caso o número de colônias isoladas tenha importância no diagnóstico, principalmente quando se suspeitar de baixa quantidade de bacilos viáveis na amostra, deve-se optar pelo meio Middlebrook 7H11 B ou meio de Stonebrink após a descontaminação com o ácido.

7. CONCLUSÕES

H₂SO₄ 5%, NaOH 2% e HPC 0,75% foram igualmente eficientes para reduzir a contaminação das amostras de tecido bovino com lesões compatíveis com tuberculose encaminhadas pelo SIF e mantidas à -20 °C.

O descontaminante menos tóxico para o *M. bovis* foi o H₂SO₄ 5% e o mais tóxico foi o HPC 0,75%.

O Tempo para início do aparecimento de colônias foi maior quando as amostras foram descontaminadas com HPC 0,75% e inoculadas em meio de Stonebrink e menor quando as amostras foram descontaminadas com H₂SO₄ 5% ou NaOH 2% e inoculadas em qualquer meio à base de ágar.

A maior quantidade de UFCs foi obtida após descontaminação das amostras com H₂SO₄ 5% e inoculação em meio de Stonebrink ou Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento da marca Difco®.

A marca do suplemento OADC utilizado influenciou o desempenho do meio de cultura Middlebrook 7H11 com aditivos.

A melhor combinação para o primo isolamento de *M. bovis* no Brasil foi o descontaminante H₂SO₄ 5% com o meio de cultura Middlebrook 7H11 com aditivos e suplemento OADC da marca Difco®.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBROSIO, S.R.; OLIVEIRA, E.M.D.; RODRIGUEZ, C.A.R., *et al.* Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. *Braz. J. Microbiol.*, v. 39, n 2, p. 241-244, 2008.
- BIRN, K.J. Blood medium for the isolation of tubercle bacilli. *Br. Vet. J.*, v.121, n.9, p.437-441, 1965.
- BUTLER, W.R.; WARREN, N.G.; KUBICA G.P.; KILBURN, J.O. Modified method for testing the quality of albumin-containing enrichments used in growth media for mycobacteria. *J Clin. Microbiol.*, v.28, n.5, p. 1068–1070, 1990.
- CAGE, G. D. Direct identification of *Mycobacterium* species in BACTEC 7H12B medium by high-performance liquid chromatography. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, n. 2, p. 521-524, 1994.
- CORNER, L.A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Microbiol.*, v. 40, n 1-2, p. 53-63,1994.
- CORNER, L.A.; GORMLEY, E.; PFEIFFER, D.U. Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: conditions for maximising the number of positive cultures. *Vet. Microbiol.*, v. 156, n 1-2, p. 162–171, 2012.
- CORNER, L. A.; NICOLACOPOULOS, C. Comparison of media used for the primary isolation of *Mycobacterium bovis* by veterinary and medical diagnostic laboratories. *Aust. Vet. J.*, v. 65, n. 7, p. 202-205, 1988.
- CORNER, L. A.; TRAJSTMAN, A. C. An evaluation of 1-hexadecylpyridinium chloride as a decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. *Vet. Microbiol.*, v. 18, n. 2, p. 127-134, 1988.
- CORNER L.A., TRAJSTMAN A.C.; LUND K. Determination of optimum concentration of decontaminants for primary isolation. *N. Z. Vet. J.*, v 43, n. 4, p.129-133, 1995.
- COUSINS, D.V.; FRANCIS, B.R.; GOW, B.L. Advantages of a new agar medium in the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.*, v.20, n.1, p.89-95, 1989.
- DUBOS, R. J. The effect of lipids and serum albumin on bacterial growth. *J. Exp. Med.*, v. 85, n.1, p.9-22, 1947.
- GALLAGHER, J.; HORWILL, D.M. A selective oleic acid albumin agar medium for the cultivation of *Mycobacterium bovis*. *J. Hyg.*, v.79, n.1, p. 155-60, 1977.
- GUTHERTZ, L.S.; GRIFFITH, M.E.; FORD, E. G. *et al.* Quality Control of Individual Components Used in Middlebrook 7H10 Medium for Mycobacterial Susceptibility Testing. *J. Clin. Microbiol.*, v.26, n. 11, p. 2338-2342, 1988.

- HINES, N.; PAYEUR, J. B.; HOFFMAN, L. J. Comparison of the recovery of *Mycobacterium bovis* isolates using the BACTEC MGIT 960 system, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11 solid media. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 18, n. 3, p. 243-250, 2006.
- HOLANDA, E.D.; LOBATO, F.C.F.; MOTA, P.M.P.C.; ABREU, V.L.V. Avaliação de métodos de descontaminação para isolamento de *Mycobacterium bovis*. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.24, n. 2, p. 54-57, 2002.
- IKUTA, C. Y. *Comparação entre meios de cultura e condições de incubação para o primo isolamento de Mycobacterium bovis de bovinos brasileiros*. 2011. 37 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP.
- LEITE, C. Q. F.; ANNO, I. S.; LEITE, S. R. A.; *et al.* Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 3, p. 319-323, 2003.
- MARCONDES, A. G.; SHIKAMA, M. L. M.; VASCONCELLOS, S. A. *et al.* Comparação entre a técnica de cultivo de Agar Middlebrook 7H11 e meio Stonebrink para isolamento de *Mycobacterium bovis* em amostras de campo. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 43, n. 3, p. 362-369, 2006.
- MARKS, J. Ending the routine guinea pig test. *Tubercle*, v. 53, n. 1, p. 31-34, 1972.
- MEDEIROS, L.S.; MARASSI, C.D.; FIGUEIREDO, E.E.S.; LILENBAUM, W. Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine Tuberculosis in Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v. 41, n. 3, p. 531-541, 2010.
- MEDEIROS, L.; MARASSI, R. S.; DUARTE, R. S. *et al.* Comparison of decontamination methods for primary isolation of *Mycobacterium bovis* in paucibacillary bovine tissues. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 54, n. 3, p. 182-186, 2011.
- MOTA, P.M.P.C. *Estudo da esofagostomose como fator predisponente de reações alérgicas inespecíficas no diagnóstico da tuberculose bovina*. 1985. 82p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerias, Belo Horizonte, MG.
- ROBBE-AUSTERMAN, S.; BRAVO, D.M.; HARRIS, B. Comparison of the MGIT 960, BACTEC 460 TB and solid media for isolation of *Mycobacterium bovis* in United States veterinary specimens. *BMC Vet. Res.*, v.9, p. 74, 2013.
- SALES, M. L.; FONSECA JR, A. A.; ORZIL, L., *et al.* Validation of two real-time PCRs targeting the PE-PGRS 20 gene and the region of difference 4 for the characterization of *Mycobacterium bovis* isolates. *Genet. Mol. Res.*, v. 13, n. 2, p. 4607-4616, 2014.
- SIEGEL, S. *Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento*. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1975. 350 p.

TAYLOR, G.; WORTH, D. R.; PALMER, S. *et al.* Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Vet. Res.*, v.03, n.1, p. 12, 2007.

VEERMAN, G.M.; PIKE, J.G.; FOX, J.L. Use of modified 7H-11 agar to increase growth rate of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues. *Aust Vet J.*, v.63, n.10, p.348-9, 1986.

WELCH, D. F.; GURUSWAMY, A. P.; SIDES, S. J. *et al.* Timely culture for mycobacteria which utilizes a microcolony method. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, n. 8, p. 2718-2184, 1993.

World Organization for Animal Health. OIE. Bovine tuberculosis. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, 2014. v.1, pt. 2, sec. 2.4, chap. 2.4.7. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BOVINE_TB.pdf
Acesso em 28.10.2014

9. ANEXOS

ANEXO A: MEIO MIDDLEBROOK 7H11 COM ADITIVOS

MATERIAIS E EQUIPAMENTOS:

Autoclave;	Espátula;
Balança analítica;	Microondas;
Balão volumétrico;	pHmetro;
Bancada limpa de fluxo laminar;	Provetas;
Barra magnética;	Tubos 16 mm x150 mm estéreis;
Chapa agitadora magnética;	Seringa estéril.
Filtro para seringa com 0,22 micra;	

INSUMOS

Solução de verde malaquita 0,25%;
Solução de glicose a 50% com ácido cítrico a 0,1%;
Ágar base Middlebrook 7H11 sem glicerina;
Piruvato de sódio ácido (sal de sódio);
Suplemento OADC da marca Difco BD®
Soro fetal bovino estéril;
Sangue de ovino lisado;
Água destilada/deionizada.

PROCEDIMENTO

SANGUE DE OVINO LISADO:

Para 10 mL de sangue lisado, misturar, assepticamente, 5 mL de sangue de ovino a 5 mL de água destilada deionizada.

PREPARAÇÃO DO MEIO:

Pesar 18,9 g do meio base Middlebrook 7H11 sem glicerina e 3,9 g de piruvato de sódio ácido (sal de sódio). Transferir para recipiente adequado e acrescentar 800 mL de água destilada/deionizada. Homogeneizar bem e aquecer em microondas até completa dissolução. Autoclavar a 121°C por 20 minutos. Resfriar a aproximadamente 56 °C;
Em bancada de fluxo laminar ou cabine de segurança biológica, adicionar, assepticamente, 4 mL do meio ácido cítrico em solução de glicose 50%, 100 mL do suplemento OADC, 100 mL de soro fetal bovino estéril filtrado em filtro de seringa com 0,22 micra, 5 mL de sangue de ovino lisado e 1 mL de solução de verde malaquita 0,25%. Homogeneizar bem. Sob agitação constante, distribuir 7- 8 mL do meio em tubos 16 x 150 mm com tampa de rosca. Deixar os tubos resfriarem inclinados, para a formação de bisel. Identificar com o número do lote, data de produção, data de validade e conservação.
Armazenar sob refrigeração. Validade três meses.

Fonte: Robbe-Austerman *et al.*, 2013.

ANEXO B: MEIO DE STONEBRINK

MATERIAIS E EQUIPAMENTOS:

Autoclave;	Chapa agitadora magnética;
Balança analítica;	Espátula;
Balão volumétrico;	Gaze estéril
Batedeira;	Pinça estéril
Bancada limpa de fluxo laminar;	Proveta;
Barra magnética;	Tubos 16 mm x150 mm estéreis;
Béquer	

INSUMOS:

Detergente neutro	Piruvato de sódio
Solução de etano 70° GL	Solução aquosa de verde malaquita 2%
Solução de ácido peracético 0,03%	Fosfato monopotássico anidro (KH ₂ PO ₄)
Fosfato dissódico anidro (NaHPO ₄) (Peso molecular = 141,96)	
Ovos frescos isentos de antibióticos e outras drogas	
Água destilada deionizada estéril	

PROCEDIMENTO:

SOLUÇÃO MINERAL

Pesar 3,5g de KH₂PO₄, 1,6g de NaHPO₄, 6,3g de piruvato de sódio e transferir para recipiente adequado. Acrescentar 250 mL de água destilada deionizada e homogeneizar até completa dissolução. Transferir para balão volumétrico de 500 ml e completar para 500 mL com água destilada deionizada. Autoclavar a 121°C por 15 minutos e reservar.

OVOS HOMOGEINIZADOS

Lavar 22 a 24 ovos frescos com água e detergente neutro com o auxílio da gaze. Deixá-los mergulhados em água destilada por, aproximadamente, três minutos e posteriormente colocá-los imersos em um recipiente com ácido peracético 0,03% por 10 minutos e depois em recipiente com álcool 70°GL por mais 10 minutos.

Em uma bancada limpa, quebrar os ovos com o auxílio de uma pinça estéril, transferindo-os para um recipiente de boca larga estéril de ± 1000 mL. Homogeneizar com a batedeira e filtrar através de gaze de oito dobras em uma proveta estéril de 1000 mL.

PREPARAÇÃO DO MEIO

Misturar 500 mL de solução mineral, 20 mL de solução de verde malaquita 2% e 1000 de ovos homogeneizados. Sob agitação constante, distribuir 7 a 8 mL do meio em tubos 16 x 150 mm com tampa de rosca. Colocar os tubos inclinados, para a formação de bisel, no sorocoagulador à temperatura de 80 à 85 °C até completa solidificação (aproximadamente de 50 a 90 minutos). Armazenar sob refrigeração. Validade seis meses.

Fonte: Mota (1985)

ANEXO C: MEIO ÁGAR SANGUE TUBERCULOSE (B83)

MATERIAIS E EQUIPAMENTOS:

Autoclave;	Chapa agitadora magnética;
Balança analítica;	Espátula;
Erlenmeyer;	Gaze estéril
Bancada limpa de fluxo laminar;	Proveta;
Barra magnética;	Tubos 16 mm x150 mm estéreis;

INSUMOS:

Água destilada deionizada estéril	Sangue bovino desfibrinado estéril
Caldo TB sem Tween 80	Penicilina (20.000 U/mL)
Piruvato de sódio	
L-asparagina	
Ágar base	

PROCEDIMENTO:

Misturar 20g de caldo TB sem Tween 80, 3,6g de piruvato de sódio, 4,5g de L-asparagina e 27 g de ágar base. Acrescentar 1650mL de água destilada deionizada. Homogeneizar bem. Aquecer a mistura em agitação constante por 30 minutos até completa dissolução, com o auxílio de chapa agitadora magnética e barra magnética. Autoclavar a 121°C por 20 minutos. Resfriar a 50°C em banho Maria (monitorar a temperatura) e adicionar, assepticamente, 150mL de sangue bovino (desfibrinado estéril) e 2,5 mL de penicilina (20.000 unidades /mL). Homogeneizar cuidadosamente. Sob agitação constante, distribuir 7 a 8 mL do meio em tubos 16 x 150 mm com tampa de rosca. Colocar os tubos inclinados, para a formação de bisel em temperatura ambiente. Armazenar sob refrigeração. Validade três meses

Fonte: COUSINS *et al.*, 1989