

UTILIZAÇÃO DE UMA TÉCNICA RÁPIDA PARA O DIAGNÓSTICO DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* EM AMOSTRAS DE LEITE EXPERIMENTALMENTE INOCULADAS

C.C. Dib^{1*}, Z.M. Morais², G.O. de Souza², M. Amaku², N.R. Benites², S.R. Pinheiro²

¹Instituto de Zootecnia, Rua Heitor Penteadó 56, CEP 13460-000, Nova Odessa, SP, Brasil. E-mail: corsi@iz.sp.gov.br

RESUMO

O meio de Middlebrook 7H11 modificado foi comparado ao meio de Stonebrink, a fim de se avaliar a sensibilidade e o tempo de detecção de micobactérias em amostras de leite, experimentalmente inoculadas com *Mycobacterium bovis* (estirpe AN5), em uma diluição 10⁻², e submetidas a duas diferentes técnicas de processamento: gordura (técnica 1) e sedimento (técnica 2), descontaminadas pelo método de Petroff modificado (adicionado de Tween 80), confrontadas com a técnica do leite total submetida ao método de Petroff tradicional. Os resultados destas técnicas (1 e 2) foram comparados entre si pelos testes não paramétricos de Wilcoxon e de Mann-Whitney e demonstraram que as técnicas 1 e 2 forneceram maior recuperação de micobactérias e proporção de cultivos positivos nos meios de Stonebrink e Middlebrook 7H11; o meio de Middlebrook 7H11 permitiu a visualização precoce das micobactérias, podendo ser utilizado como uma técnica de diagnóstico rápida da tuberculose bovina, em amostras de leite, para fins de vigilância epidemiológica.

PALAVRAS-CHAVE: Tuberculose, *Mycobacterium bovis*, leite, Middlebrook, isolamento.

ABSTRACT

UTILIZATION OF THE FAST ISOLATION TECHNIQUE OF *MYCOBACTERIUM BOVIS* FROM EXPERIMENTALLY INOCULATED MILK SAMPLES. The modified Middlebrook 7H11 cultivation technique was compared with the traditional culture technique by using the Stonebrink medium. The purpose of this comparison was to evaluate the sensitivity and the time for the detection of positive cultures of mycobacteria in milk samples experimentally inoculated with *Mycobacterium bovis* (strain AN5), at a dilution of 10⁻², and submitted to two types of procedures: technique 1 (skin milk) and technique 2 (pellet), decontaminated by modified the Petroff's method, added with Tween 80, and compared with total milk samples submitted to traditional Petroff method in the same media types. The results of the two techniques were compared with each other by the non-parametric Wilcoxon test and Mann-Whitney. The results obtained from this experiment showed that: techniques 1 and 2 produced great number of colonies and higher proportion of positive culture than the traditional one by using total milk; the time needed for the detection of mycobacteria colonies was slightly shorter by the thin layer technique than by the traditional culture method; in order to improve the epidemiological surveillance, this technique should be used as a complementary method to the traditional one in the diagnosis of bovine tuberculosis.

KEY WORDS: Tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, milk, Middlebrook, isolation.

INTRODUÇÃO

A obrigatoriedade da pasteurização do leite em nosso país estabeleceu-se em 1952 (BRANDÃO, 1994), entretanto, ainda hoje se acredita que aproximadamente 50% de todo o leite consumido no Brasil, não é pasteurizado,

aumentando o risco de infecção por *Mycobacterium bovis* (LEITE *et al.*, 2003) e reafirmando a necessidade de políticas públicas que estabeleçam medidas de controle sanitário do leite (ANTUNES *et al.*, 2002).

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), que

²Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil.

*Auxílio Bolsa Capes

entrou em vigor no Brasil em 2001, estabelece o teste de tuberculina como a principal ferramenta no diagnóstico da infecção no bovino. Recomenda também o diagnóstico laboratorial que é importante na confirmação dos exames realizados no campo e/ou frigorífico por favorecer o isolamento e tipificação das cepas circulantes, informações estas importantes no processo de controle e erradicação da doença (PNCEBT, 2001).

Do ponto de vista diagnóstico, uma das principais desvantagens da cultura de micobactérias é o tempo necessário entre a semeadura e o surgimento de colônias macroscopicamente visíveis, o que leva de 24 a 40 dias em média (KONEMAN *et al.*, 2001). O aperfeiçoamento do método microbiológico convencional para um rápido diagnóstico representa uma grande vantagem na luta contra a tuberculose no homem e no bovino (MEJIA *et al.*, 1999) e tem considerável impacto no controle da doença no bovino (CORNER, 1994).

MEJIA *et al.* (1999) e SMOSKOVI & MAGYAR (1999) demonstraram as vantagens do diagnóstico da técnica de camada delgada que se baseia na observação precoce de microcolônias de micobactérias em placas com uma fina camada de meio de Middlebrook 7H11, frente ao método tradicional de cultivo em meios de Löwenstein-Jensen e Stonebrink. Esses trabalhos demonstram significativa redução no tempo para observação das primeiras colônias com elevada sensibilidade em favor da técnica de camada delgada, além de permitir a identificação preliminar das micobactérias por suas características morfológicas.

Os métodos utilizados para descontaminação de amostras de leite "in natura" já foram objeto de discussão no meio acadêmico (PARDO *et al.*, 2001; PEREZ *et al.*, 2002) e até hoje, não há um método de descontaminação específico para o leite. Na prática laboratorial de isolamento de micobactérias no leite, a fração da gordura do leite obtida após o processo de centrifugação das amostras, é descartada, utilizando-se apenas do sedimento no processamento destas amostras (PARDO *et al.*, 2001; PEREZ *et al.*, 2002; KANTOR, 1976; DUNN & HODGSON, 1982). A elevada concentração de lipídios da parede celular das micobactérias (KONEMAN *et al.*, 2001) poderia fazer com que a sua presença em amostras de leite, possivelmente associadas à gordura do leite, passasse despercebida, devido ao descarte desta fração obtida por meio da centrifugação das amostras, diminuindo desta maneira a sensibilidade da técnica diagnóstica.

Este trabalho foi delineado para investigar a viabilidade técnica de um método de diagnóstico rápido para o *M. bovis*, a partir de amostras de leite "in natura", assim como testar sua eficiência quando comparado com os métodos de cultura tradicionais usando como inóculo amostras descontaminadas pela técnica de Petroff modificada pela adição do Tween.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada inicialmente, uma suspensão bacteriana de *Mycobacterium fortuitum*, a partir da suspensão de 0,06 g de colônias (peso úmido) raspadas da superfície do meio, com 32 dias de crescimento no meio de Petragani, em 1 mL de solução salina 0,85% com 0,05% de Tween 80 (polioxietilensorbato monooleato) (PINHEIRO *et al.* 1997), para padronizar os melhores parâmetros de diluição a serem preconizados posteriormente, e semeado no meio de Middlebrook 7H10 (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1979). Para este fim foram realizadas diluições de 1:1; 1:10 e 1:100. Com a diluição estabelecida, nas fases seguintes, os inóculos passaram a ser preparados com *M. bovis* (estirpe AN5), com 32 dias de cultivo no meio de Stonebrink (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1979).

As amostras de leite foram obtidas em uma única ordenha, de um animal clinicamente sadio, negativo ao teste de tuberculina e ao California Mastitis Test (CMT). Todas as alíquotas de 4,5 mL foram mantidas a -20° C até o dia do processamento.

Procurou-se verificar se ocorria diferença no número de micobactérias recuperadas das diferentes fases do leite, gordura (técnica 1) e sedimento (técnica 2), obtidos por meio da centrifugação das amostras, e avaliar o período mínimo em dias, necessário para o crescimento das U.F.C. (Unidades Formadoras de Colônias) após a semeadura nos meios de Stonebrink e Middlebrook 7H11 modificado. O procedimento desta etapa baseou-se em: a cada amostra de 4,5 mL de leite descongelado foi adicionado 0,5 mL da suspensão bacteriana na diluição 10⁻¹, homogeneizada em aparelho tipo Vortex, resultando em amostras de diluição 10⁻². Foram efetuadas 30 repetições, sendo que cada amostra utilizada foi subdividida em duas outras amostras obtidas por meio de centrifugação a 3.000 rpm por 20min, obtendo-se desta forma as duas fases do leite: gordura (técnica 1) e sedimento (técnica 2) acondicionadas em frascos diferentes e comparadas a técnica tradicional de leite total submetida a descontaminação de Petroff. Tanto à gordura quanto ao sedimento, foi adicionado 1 mL de solução salina contendo 0,05% de Tween 80, seguida da homogeneização em aparelho Vortex, e submissão à centrifuga por 3.000 rpm por 20min. Após o descarte do sobrenadante, ressuspendeu-se o sedimento com 1 mL de solução salina 0,85% e realizou-se a descontaminação pela técnica de Petroff. Ao final deste procedimento foram semeadas duas placas contendo meio Middlebrook 7H11 e dois tubos contendo meio Stonebrink para as três técnicas empregadas (técnicas 1, 2 e técnica tradicional).

As placas foram incubadas a 37° C, em condições de microaerofilia, dentro de caixas plásticas. Para a

quantificação das colônias, empregou-se um retículo calibrado acoplado à lente ocular do microscópio óptico que no aumento de 100 vezes, delimitava-se 100 μm^2 de área, correspondendo a um campo de visualização microscópica. Todas as placas foram quadriculadas com uma caneta de retroprojeter, delimitando-se quadrados de 0,5 cm. Foram destacados 10 quadrados por placa em cujo centro era realizada a contagem. A leitura foi realizada até o 21° dia pós-semeadura.

As leituras dos tubos foram semanais, até a 6ª semana, e realizadas de acordo com o critério estabelecido por PINHEIRO (2001).

Após a padronização das técnicas na diluição 10^{-2} o mesmo processamento foi realizado em amostras de leite nas diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , para avaliação da sensibilidade. Foram realizadas 10 repetições de cada uma das três diluições e para cada repetição foram semeadas duas placas e dois tubos. Nesta etapa as leituras passaram a serem realizadas até o 14° dia pós-semeadura, já que a partir deste dia o crescimento das colônias começou a tornar difícil a individualização das mesmas.

As medianas de crescimento em U.F.C obtidas nas técnicas 1 (gordura) e 2 (sedimento) foram comparadas, em cada dia de leitura pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. Para comparação das técnicas 1 e 2 a de Petroff, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, por meio do programa Minitab.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das três diluições de suspensão bacteriana realizadas com *M. fortuitum*, a diluição 10^{-2} foi a que apresentou o melhor padrão de contagem de U.F.C. nas placas contendo meio Middlebrook 7H10, representando um crescimento de 75% da superfície da placa no 3° e 5° dia pós-semeadura, micro e macroscopicamente, respectivamente. Este resultado também foi observado por MARCONDES (2002) utilizan-

do a estirpe AN5 de *M. bovis*, das diluições feitas a partir da suspensão bacteriana inicial preconizada por PINHEIRO (1992).

A escolha do *M. fortuitum*, que é uma micobactéria de rápido crescimento (KONEMAN *et al.*, 2001), fez com que os resultados experimentais fossem obtidos em menor tempo; esta estratégia se baseou nos trabalhos desenvolvidos por PINHEIRO *et al.* (1992) e PINHEIRO *et al.* (1997) que usaram a *M. fortuitum* na padronização dos parâmetros testes de desinfetantes, antes de usar a estirpe patogênica *M. bovis*, devido a rapidez na obtenção dos resultados e a possibilidade de se extrapolar o parâmetro obtido para outra micobactéria, conforme sugestão do manual da WORLD HEALTH ORGANIZATION (1984).

O *M. fortuitum* já foi considerado a micobactéria de crescimento rápido mais comumente associada com mastite, tendo sido identificada como causadora de mastite por WETZTEIN & GREENFIELD (1992), em 17 casos; isolada em amostras de leite cru proveniente de tanques de armazenamento e tanques transportadores, por DUNN & HODGSON (1982) e por PARDO *et al.* (2001), em vacas positivas ou suspeitas ao teste de Stormont, demonstrando a importância de aprimorar os métodos de cultivo de micobactérias para a prevenção de doenças na população.

REED (1953) e SOMMERS & RUSSELL (1967) já relatavam as vantagens de se utilizar meios de cultura "agar transparentes" no primo isolamento de micobactérias pois possibilitava a visualização precoce das micobactérias, em média dentro de 10 a 14 dias pós-semeadura, atribuindo à técnica de monocamada a precocidade de um diagnóstico positivo, e possibilitando a adição de drogas em concentrações exatas já que o meio não sofre a ação da temperatura para ficar solidificado.

Os resultados obtidos por meio das 3 técnicas empregadas (técnica 1, 2 e de Petroff tradicional) na diluição 10^{-2} das amostras de leite experimentalmente inoculadas, foram resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 – Proporções de cultivos com crescimento de micobactérias, segundo a técnica de processamento, o cultivo adotado (tubos e placas) e o momento de leitura.

Técnica	Placas positivas/total				Tubos positivos/total			
	Dias pós-semeadura							
	11°	14°	17°	21°	21°	28°	35°	42°
Petroff tradicional	25/59*	26/59	7/59	1/59	6/59	37/59	15/59	1/59
Técnica 1 (gordura)	41/58	10/58	7/58	0/58	13/60	32/60	15/60	0/60
Técnica 2 (sedimento)	54/59	4/59	1/59	0/59	19/55	29/55	7/55	0/55

*n° de positivos/n° de semeaduras

O *M. bovis* cresceu tanto nos meios de Middlebrook 7H11 modificado quanto no meio de Stonebrink. A maioria das placas apresentou crescimento no 11º ou 14º dia de leitura, para 28 dias apresentados pela maioria dos tubos, sendo que KONEMAN *et al.* (2001) citou o tempo médio para o crescimento de amostras de campo como sendo 24 a 40 dias. A adaptação da estirpe ao meio de cultura também explicaria esta precocidade, uma vez que a mesma era mantida em laboratório com sucessivos repiques em meio de Stonebrink.

CORNER & NICOLAPOULOS (1988) trabalhando com estirpes de *M. bovis* (AN5) e *M. bovis* (M86/90) em diversos meios de cultura, entre eles o de Stonebrink e o Middlebrook 7H11 modificado, obtiveram como médias de crescimento macroscópico, 27,3 e 28 dias, respectivamente, para o meio de Middlebrook. Para o meio de Stonebrink as médias foram 32,8 e 30,6 dias, respectivamente.

A técnica 2 apresentou o maior número de cultivos positivos no meio de Middlebrook 7H11, no 11º dia pós-semeadura, primeiro dia em que foi observado crescimento de colônias. Esta precocidade em relação às demais técnicas empregadas também foi observada para o meio de Stonebrink, que apresentou maior número de cultivos positivos no 21º dia pós-semeadura, primeiro dia em que foi observado o crescimento.

A técnica tradicional de Petroff foi a que apresentou maior número em dias necessários para o aparecimento das primeiras colônias, nos dois meios empregados.

Na maior parte das placas ocorreu algum tipo de contaminação, observada em geral logo na primeira leitura. Apesar disto, a maioria das contaminações observadas limitaram-se à região da borda da placa devido ao acúmulo de líquido, não interferindo, portanto, na leitura. Nas placas onde a contaminação estendeu-se por toda a superfície do meio, não foi realizada a contagem de colônias e isto ocorreu em apenas 4 placas. Os resultados das contagens de U.F.C. das placas contendo meio de Middlebrook 7H11 das três técnicas utilizadas foram resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultado da contagem da média de U.F.C. do *M. bovis* (estirpe AN5) do total de placas, segundo a técnica de processamento adotada, e o momento da leitura.

Técnica	Placas (dias pós-semeadura)					
	3º	7º	11º	14º	17º	21º
Técnica de Petroff	0	0	0,16	0,47	1	1,5
Técnica 1 (gordura)	0	0	0,46	0,85	1,38	1,81
Técnica 2 (sedimento)	0	0	0,83	1,28	1,64	1,88

Comparando-se as médias de crescimento em U.F.C. das 3 técnicas de processamento empregadas é possível verificar que a média obtida pela técnica de Petroff tradicional foi inferior em todos os dias, à média obtida pelas técnicas 1 e 2. Na técnica 2, foram obtidas as maiores médias de U.F.C. em todos os dias de observação; já na primeira observação, esta técnica forneceu uma média de contagem de U.F.C. 5 vezes superior à média obtida pela técnica de Petroff tradicional (0,83 e 0,16 U.F.C. respectivamente) e quase duas vezes superior ao material processado pela técnica 1 (gordura). No 14º dia pós-semeadura ainda houve uma diferença entre as três técnicas adotadas e só a partir do 17º dia em diante, diminuiu a diferença entre as médias de crescimento de U.F.C.

Pelos resultados do teste não paramétrico de Wilcoxon, foi verificada diferença estatística ($P < 0,05$) entre as medianas de crescimento de U.F.C. obtidas pela técnica 1 e 2 aos 11 e aos 14 dias pós-semeadura, sendo esta diferença maior para a técnica 2 do que para 1. A partir do 17º dia, não foi observada diferença estatística entre as medianas de crescimento das placas semeadas com material proveniente das técnicas 1 e 2.

O teste não-paramétrico de Mann-Whitney revelou diferença estatística ($p < 0,05$) entre as medianas de crescimento de U.F.C. obtidos pelas técnicas 1 e 2 quando comparadas aos resultados da técnica de Petroff tradicional, no 11º, 14º, 17º e 21º dias pós-semeadura. Foi possível verificar que o resultado da técnica 2 foi superior aos das demais técnicas empregadas na mesma diluição.

A precocidade para o aparecimento das primeiras U.F.C., observada principalmente nas placas semeadas com a técnica 2, pode ser devida ao processo de homogeneização das amostras com 1 mL de Tween 80, seguida de utilização do aparelho tipo Vortex, por meio do qual foi possível separar as colônias de micobactérias, em consequência da ação física aplicada pelo aparelho e da ação detergente do Tween 80. O Tween 80, além de nutriente é um agente tensoativo, atua como tal unificando-se à parede lipídica bacilar pela parte hidrofóbica de sua molécula, e ao meio externo pela sua porção hidrofílica (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1979).

A importância da força centrífuga na recuperação de micobactérias pode ser devida ao alto conteúdo de lipídios de sua parede celular (até 40% do peso seco). O lipídio confere baixa densidade ao microrganismo. Se o objetivo for a sedimentação máxima de microrganismo durante a centrifugação, a densidade do líquido de suspensão da amostra deve ser mantida tão baixa quanto possível, e a força centrífuga aplicada à amostra tão alta quanto prática (KONEMAN *et al.*, 2001).

Tabela 3 – Proporções de cultivos com crescimento de micobactérias, segundo a técnica de processamento, o cultivo adotado (placas e tubos) e a diluição do inóculo.

Técnica	Placas positivas/total			Tubos positivos/total		
	Diluição			Diluição		
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Técnica de Petroff	6/20	1/20	0/20	18/20	14/20	5/20
Técnica 1 (gordura)	19/20	9/20	2/20	20/20	17/20	10/20
Técnica 2 (sedimento)	16/20	4/20	4/20	19/20	10/20	10/20

*nº de positivos/nº de sementeiras

KANTOR (1976) trabalhando com amostras de sedimentos de centrifugação industrial de leite cru, provenientes de rebanhos controlados pela prova tuberculínica, obteve 62 isolamentos de micobactérias, entre elas duas identificadas como *M. bovis*.

HOSTY & MCDURMONT (1975) utilizaram o sedimento das amostras de leite cru obtidas de 28 plantas produtoras de leite, e obtiveram 64 isolados de micobactérias, em 35 das 51 amostras de leite cru, sendo muitas delas reconhecidas como patogênicas para o homem.

A utilização da gordura no processamento de amostras de leite para isolamento de micobactérias não é usualmente empregada. PEREZ *et al.* (2002), investigou a frequência de detecção de *M. bovis* nas fases de centrifugação do leite proveniente de rebanhos livres da infecção, experimentalmente inoculado com *M. bovis*-BCG. O organismo foi isolado do sedimento, mas não foi observado o seu desenvolvimento em amostras de fase aquosa e nem gordura.

Trabalhando com leite, foi possível diferenciar microscopicamente a técnica empregada pela observação dos debrís. Nas placas semeadas com a técnica 1, se observava o crescimento das U.F.C. em meio a pequenas moléculas de gordura; com a técnica tradicional de Petroff, a grande quantidade de debrís celulares e de moléculas de gordura tornou difícil a visualização das micobactérias e pela técnica 2, quase não se observou a presença de debrís. Por meio das Figuras 1, 2 e 3 é possível visualizar o crescimento das micobactérias processadas pela técnica tradicional de Petroff e pelas técnicas 1 e 2 respectivamente, no meio de Middlebrook 7H11 modificado.

A técnica 2 forneceu as maiores médias de U.F.C. em todos os dias de leitura. Ao contrário, a técnica tradicional de Petroff forneceu as menores médias de U.F.C., provavelmente pelos mesmos fatores já discutidos em relação ao tempo requerido para o aparecimento das primeiras colônias (presença de grande quantidade de debrís celulares, homogeneização e a importância da submissão à força centrífuga). A média geral de crescimento nas 3 metodologias tendeu a estabilizar-se nos últimos dias de leitura onde a diferença estatística entre as medianas de crescimento não foi significativa.

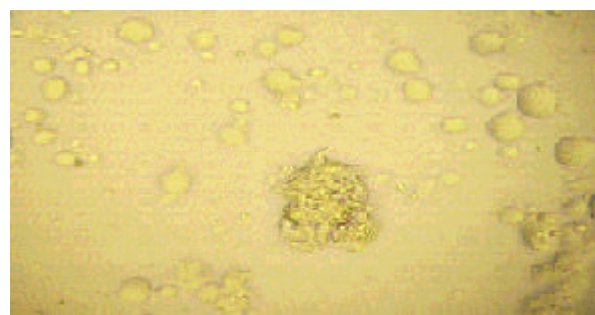


Fig. 1 – Colônia de *M. bovis* aos 14 dias de cultivo em meio de Middlebrook 7H11 modificado, obtida pela técnica tradicional de Petroff. Visualização sob microscopia óptica com aumento de 100x

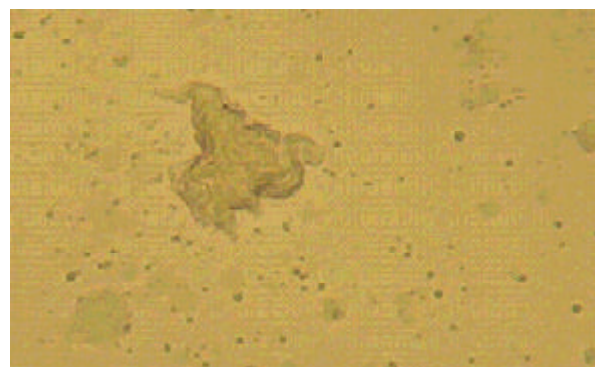


Fig. 2 – Colônia de *M. bovis* aos 14 dias de crescimento, em meio de Middlebrook 7H11 modificado, obtida da Técnica 1 (gordura). Visualização sob microscopia óptica com aumento de 100x

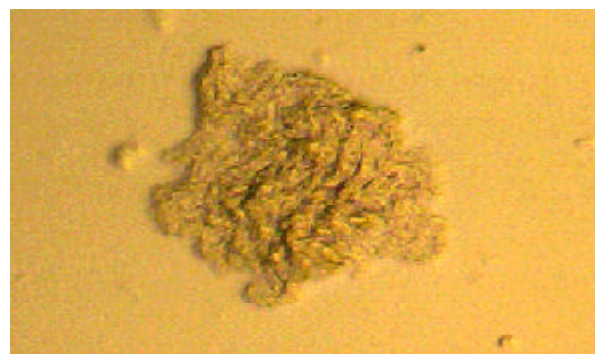


Fig. 3 – Colônia de *M. bovis* com 17 dias de crescimento, em meio de Middlebrook 7H11, obtida da Técnica 2 (sedimento). Visualização sob microscopia óptica com aumento de 100x

Poucos são os trabalhos encontrados na literatura que descrevem a metodologia empregada na quantificação das micobactérias. SMITH *et al.* (2003) avaliaram a técnica de semeadura em espiral pela contagem microscópica das colônias de *Mycobacterium paratuberculosis* em amostras de leite submetido ao processo de Ultra High Temperature (UHT) e compararam as contagens realizadas nos dias 14 e 28 e nos dias 8 e 27 pelo Teste t-pareado, não encontrando diferença estatística em nenhum dos casos.

A importância de se utilizar de métodos de diagnóstico de micobactérias em amostras de leite que tenham uma sensibilidade maior consiste no aprimoramento de estratégias de vigilância epidemiológica empregadas em estabelecimentos ligados à produção, armazenamento, distribuição e comercialização do leite.

Os resultados do crescimento bacteriano nas placas e tubos semeados com inóculos nas diluições 10^3 , 10^4 e 10^5 e oriundo do material processado pelas três técnicas anteriormente estudadas estão apresentados na Tabela 3.

Os resultados desta etapa foram obtidos somente até o 14º dia pós-semeadura para as placas e até o 42º dia para os tubos tendo em vista que, conforme foi observado nas etapas anteriores a partir 17º dia o crescimento de U.F.C das placas passa a ser macroscópico, e o tamanho das colônias dificulta a visualização de colônias novas.

Pela tabela é possível observar que a técnica 1 (gordura) apresentou em geral, a maior proporção de cultivos positivos nas diluições 10^3 e 10^4 , nos dois meios empregados. A técnica de Petroff apresentou um número de cultivos positivos no meio de Middlebrook 7H11 muito inferior aos obtidos nas técnicas 1 e 2, embora este resultado não tenha sido o mesmo para o meio de Stonebrink, onde a proporção de cultivos positivos foi superior em todas as diluições de todas as técnicas à aquela obtida nas placas. Como foi demonstrado anteriormente, esta técnica apresentou um crescimento mais lento e um menor número de colônias recuperadas frente às técnicas 1 e 2, este fato que somado a técnica de quantificação empregada, onde são visualizados apenas 10 campos microscópicos, podem ter influenciado com a baixa porcentagem de positivos e ausência de crescimento nas demais diluições.

Apesar da diminuição no número de dias necessários para o isolamento de *M. bovis* no meio de Middlebrook 7H11 a proporção de cultivos positivos apresentada pelo meio de Stonebrink nesta etapa, foi superior em todas as diluições à proporção de placas positivas obtidas no meio de Middlebrook. Estes resultados sustentam as afirmações dos autores MARCONDES (2002) e CORNER & NICOLACOPOULUS (1988), de que o método de Middlebrook 7H11 modificado

deve ser utilizado simultaneamente com os métodos tradicionais de cultivo.

COUSINS *et al.* (1989) observaram que, apesar da precocidade em dias para o isolamento do *M. bovis* no meio de Middlebrook 7H11 modificado, o número de colônias recuperadas foi inferior aos outros 4 meios empregados (2 variações do meio de Stonebrink; meio de Löwenstein-Jensen e B83). Este resultado poderia ser um dos fatores a explicar a menor proporção de cultivos obtidos no meio de Middlebrook 7H11 nesta etapa do experimento, onde foram empregados inóculos mais diluídos.

O método de contagem padronizado na segunda etapa deste experimento, pode ter dificultado a detecção de colônias de *M. bovis* quando empregado para a leitura das placas semeadas com inóculos em diluições maiores, já que se limitando o número de campos microscópicos e o espaço necessário para a visualização das colônias, limita-se a probabilidade de encontrá-las pela superfície do meio de cultura, diminuindo desta maneira, as chances de se obter um diagnóstico positivo, o que dificilmente acontece no meio de Stonebrink onde o espaço delimitado para quantificação das colônias foi mais abrangente.

A restrição do tempo para apenas duas semanas, também pode ser um dos fatores responsáveis pela baixa sensibilidade encontrada no meio de Middlebrook 7H11 em relação ao meio de Stonebrink (Tabelas 4, 5 e 6). CORNER & NICOLACOPOULOS (1988) realizaram a contagem macroscópica das colônias e mesmo desta maneira ainda conseguiram demonstrar diferença em dias para o primeiro isolamento, em relação aos métodos tradicionais.

A superioridade observada das técnicas 1 e 2 em relação à técnica de Petroff tradicional, para recuperação de colônias de *M. bovis* de amostras de leite *in natura*, e a precocidade do meio de Middlebrook 7H11 modificado em relação ao meio de Stonebrink, demonstram a possibilidade de sua utilização como método complementar para o isolamento de micobactérias no leite. Devido às dificuldades observadas na contagem microscópica de colônias no meio de Middlebrook, há a necessidade de serem realizados mais estudos para o aprimoramento desta técnica em relação à sua sensibilidade.

CONCLUSÕES

As técnicas 1 (gordura) e 2 (sedimento) foram mais sensíveis frente à técnica de Petroff tradicional aos 14 dias de crescimento. O meio de Middlebrook 7H11 modificado permitiu a visualização precoce das micobactérias quando comparadas aos meios de Stonebrink, e portanto pode ser utilizado como uma técnica complementar aos métodos tradicionais de

diagnóstico da tuberculose bovina em amostras de leite para fins de vigilância epidemiológica.

REFERÊNCIAS

- ANTUNES, J.L.F.; MORAES, M.; BAZEVIC, M.G.H.; WALDMAN, E.A.; CORRÊA, M.O.A. Tuberculose e leite: elementos para a história de uma polêmica. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos*, v.9, n.3, p.609-623, 2002.
- BRANDÃO, S.C.C. Leite: legislação, responsabilidade e saúde pública. *Balde Branco*, v.30, n.360, p.68-71, 1994.
- CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS *Bacteriología de la tuberculosis humana y animal*. Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud, 1979. 63p.
- 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. & NICOLAPOULOS, C. Comparison of media used for the primary isolation of *Mycobacterium bovis* by veterinary and medical diagnostic laboratories. *Australian Veterinary Journal*, v.65, n.7, p.202-204, 1988.
- COUSINS D.V.; FRANCIS, B.R.; GOW, B.L. Advantages of a new agar medium in the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Microbiology*, v.20, n.1, p.89-95, 1989.
- DUNN, B.L. & HODGSON, D.J. "Atypical" mycobacteria in milk. *Journal of Applied Bacteriology*, v.52, n.3, p.373-376, 1982.
- HOSTY, T.S. & McDURMONT, C.I. Isolation of acid-fast organisms from milk and oysters. *Health Laboratory Science*, v.12, n.1, p.16-19, 1975.
- KANTOR, I.N. Micobacterias aisladas de muestras de leche em Buenos Aires, Argentina. *Revista Argentina Tuberculose. y Enfermidades Pulmonares*, v.37, n.1/4, p.57-59, 1976.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; LANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JUNIOR, W.C. *Diagnóstico microbiológico. Texto e atlas colorido*. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora Medsi, 2001. 1465p. Capítulo 17 Micobactérias.
- LEITE, C.Q.F.; ANNO, I.S.; LEITE, S.R.A.; ROXO, E.; MORLOCK, G.P.; COOKSEY, R.C. Isolation and identification of *Mycobacteria* from livestock specimens and milk obtained in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.98, n.3, p.319-323, 2003.
- MARCONDES, A.G., *Padronização da técnica de cultivo em camada delgada de agar Middlebrook 7H11 para isolamento de Mycobacterium bovis*. 2002. 115p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- MEJIA, G.I.; CASTRILLON, I.; TRUJILLO, H.; ROBLEDO, J.A. Microcolony detection in 7H11 Thin layer culture is an alternative for rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v.3, n.2, p.138-142, 1999.
- PARDO, R.B.; LANGONI, H.; MENDONÇA, I.J.P.; CHI, K.D. Isolation of *Mycobacterium* spp. in milk from cows suspected or positive to tuberculosis. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.38, n.6, p.284-287, 2001.
- PEREZ, A., RENIERO, A.; FORTEIS, A.; MEREGALLI, S.; LÓPEZ, B.; RITACCO, V. Estudio de *Mycobacterium bovis* en leche mediante métodos bacteriológicos y reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Argentina de Microbiología*, v.34, n.1, p.45-51, 2002.
- 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 of Veterinary Research and Animal Science*, v.29, n.1, p.51-60, 1992.
- PINHEIRO, S.R.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.M.; FERREIRA NETO, J.S.; SINHORINI, I.L.; ITO, F.H.; CORTES, J.A. Padronização de teste "in vitro" para a avaliação da atividade micobactericida do hipoclorito de sódio e de uma combinação de aldeídos. Influência da passagem da estirpe teste (*Mycobacterium bovis* – AN5) em hamsters. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.64, n.1, p.11-22, 1997.
- PINHEIRO, S.R. *Avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes químicos sobre estirpes de Mycobacterium avium isoladas de suínos abatidos no estado de Santa Catarina, no ano de 1999*. 2001, 91p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- REED, R.W. Slide culture of tubercle bacilli. *Canadian Journal of Medicine Science*, v.31, n.5, p.367-376, 1953.
- SMITH, W.L.; MCGARVEY, K.L.; CULLOR, J.S. The use of spiral plating and microscopic colony counting for the rapid quantitation of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Letters in Applied Microbiology*, v.36, n.5, p.293-296, 2003.
- SMOSKÓVI, A. & MAGYAR, P. Comparison of the mycobacterial growth indicator tube with MB Redox, Löwestein – Jensen, and Middlebrook 7H11 media for recovery of mycobacteria in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.5, p.1366-1369, 1999.
- SOMMERS, H.M. & RUSSEL, J.P. Description of clinically significant mycobacteria. In: SOMMERS, H.M. (Ed.). *The clinically significant mycobacteria: recognition and identification*. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1967. p.3-15.
- WETZSTEIN, M. & GREENFIELD, J. Mastitis caused by a *Mycobacterium* sp. *Canadian Veterinary Journal*, v.33, n.9, p.826, 1992.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION *Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and control of zoonotic diseases*. Geneva: WHO, 1984. 49p. (WHO/VPH/84.4).

Recebido em 5/4/06

Aceito em 1/6/06