

ESTUDO COMPARATIVO DE DOIS MÉTODOS DE DESCONTAMINAÇÃO NA PESQUISA DE MICOBACTÉRIAS

S.C. Balian¹, S.R. Pinheiro², J.L. Guerra³, Z.M. Morais⁴, F. Ferreira⁵, J.S. Ferreira Neto⁶

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-000, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: balian@usp.br

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo comparar o desempenho de dois métodos de descontaminação na pesquisa de micobactérias a partir de amostras de fezes. Utilizou o método de Petroff – método básico, empregando a solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 4%, e o método de Löwenstein-Jensen modificado – método ácido empregando a solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 4%. Doze hamsters fêmeas foram inoculadas pela via oral, com 10⁸ ufc/animal de *Mycobacterium avium* e examinadas suas fezes em 16 tempos experimentais, completando-se um total de 192 análises. Cada amostra foi submetida ao método de descontaminação básica e ácida. O método básico obteve sucesso em 62 oportunidades (32,3%) e o método ácido em 56 (29,2%). Obteve-se concordância moderada entre os dois métodos (valor “kappa” igual a 0,6). O método de Petroff pode ser utilizado para a descontaminação de fezes e há a necessidade de se testar soluções de ácido sulfúrico com concentrações superiores a 4%, com o intuito de se conseguir o menor comprometimento da viabilidade e capacidade de multiplicação das micobactérias e ao mesmo tempo a inativação da microbiota acompanhante.

PALAVRAS-CHAVE: *Mycobacterium avium*, descontaminação, bacteriologia.

ABSTRACT

TWO DECONTAMINATION METHODS FOR THE MYCOBACTERIA RESEARCH: A COMPARATIVE STUDY. The present work had for objective compare the performance of two methods of decontamination in mycobacteria isolation from feces. One of the protocols used the method of Petroff - basic method, using the solution of sodium hydroxide (NaOH) 4%, the other used Löwenstein-Jensen modified method - acid method with sulfuric acid solution (H₂SO₄) 4%. Thirty females hamsters were inoculated orally with 10⁸ cfu/animal of *Mycobacterium avium* and your feces were examined 192 different experimental moments. Each sample was submitted to the basic and acid method. Mycobacteria was isolated in 62 (32.3%) chances in the basic method and in 56 (29.2%) in the acid method. The “kappa” value was 0.6 demonstrating moderate agreement between them. The Petroff method can be utilized for the decontamination of feces and it is important to test others concentrations than 4% of the sulfuric acid solution in the fetching of the maximum decontamination of the sample and minor delay of the viability and capacity of multiplication of the mycobacteria.

KEY WORDS: *Mycobacterium avium*, Petroff method decontamination, bacteriology.

INTRODUÇÃO

As doenças ocasionadas por micobactérias constituem um importante capítulo das patologias infecciosas que acometem o homem e os animais, incluindo várias micobacterioses e ma das mais antigas doenças que se conhece, a tuberculose (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSES, 1979).

Além dos prejuízos, de longa data já registrados, tanto para a saúde humana quanto animal causados pelas micobactérias de crescimento lento SGM – *slowly*

growing mycobacteria, entre elas o *M. tuberculosis*, *M. bovis* e o complexo *M. avium*, tem sido observado também um aumento da ocorrência de doenças associadas às micobactérias de crescimento rápido RGM – *rapidly growing mycobacteria*, tanto em indivíduos imunocomprometidos, quanto em imunocompetentes (YARES *et al.*, 1997), levando a diferentes processos, como abscessos pulmonares, doença disseminada, osteomielite, artrite, linfadenite, otite média crônica e infecção da córnea (WALLACE, 1997; FALKINHAM, 1996; WRIGHTR & WALLACE, 1995; WALLACE *et al.*, 1998).

Nos programas de controle das micobacterioses a disponibilidade de recursos diagnósticos efetivos através de metodologias simples e eficazes que possibilitem o isolamento e identificação das espécies ocorrentes compreende condição fundamental (Román, 1990), especialmente quando se pretende instituir tratamento.

O gênero *Mycobacterium* é altamente exigente no que se refere a nutrientes, quando comparados com outras bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e outras enterobactérias. Tais características facilitam a multiplicação anterior de contaminantes menos exigentes, tornando indispensável a aplicação de um tratamento das amostras previamente à tentativa de isolamento de micobactérias.

Em virtude dessa característica a descontaminação é um procedimento indispensável para amostras consideradas não estéreis ou contaminadas, tais como: urina, suco gástrico, lavados bronquiais, materiais de autópsias, secreções purulentas e fezes entre outras. Vários métodos são relatados como disponíveis na literatura, havendo para cada tipo de amostra a recomendação de utilização de um determinado método.

Pode-se citar a descontaminação com ácido oxálico e posterior semeadura em meio Löwenstein-Jensen (JORGENSEN, 1982) e meio Herrold clara de ovo; a descontaminação pelo método *hexadecil piridinium chloride* HPC (WHIPPLE *et al.*, 1991) e adição de um suplemento ao meio de cultura, o mycobactin J (MERKAL & McCULLOUGH, 1982). São encontrados protocolos que utilizam o lauril sulfato de sódio; o ácido oxálico a 5%, método de Corper e Stoner modificado (fostato trissódico a 23% e fosfato monossódico a 20%); o método de Kubica e Dye (N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sódio = NALC-NaOH); o método do cloreto de cetilpiridínio (CCP) e o método Löwenstein-Jensen (ácido sulfúrico a 15%) (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1973, 1979; DAVID *et al.*, 1994; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (BRASIL), 1994b; THOREL, 1994).

Constata-se uma ampla variedade de combinações de soluções e concentrações de substâncias químicas que buscam a máxima inativação de microbiota acompanhante das amostras e a mínima injúria às micobactérias presentes.

Para amostras de fezes, ROMÁN (1990) recomenda o método de Löwenstein-Jensen ou de Petroff, sendo que nos casos em que se necessita ação descontaminante mais intensa, sugere o método de Teepol.

O método de Petroff vem sendo utilizado no Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica da Universidade de São Paulo para a descontaminação de linfonodos, conteúdo de lesões granulomatosas, fígado, baço, pulmão entre outros espécimes como protocolo padrão.

Em virtude da utilização do método de Petroff na rotina da bacteriologia do laboratório, decidiu-se comparar este protocolo com o método de Löwenstein-Jensen modificado em relação à capacidade de recuperação de micobactérias e de inativação da microbiota acompanhante de amostras de fezes de hamsters inoculados experimentalmente.

Para tanto utilizou-se substâncias químicas diferentes para a descontaminação em concentrações similares, submetidas ao mesmo procedimento técnico e semeadas no meio sólido de Petragani. Um dos protocolos foi denominado método básico, refere-se ao método de Petroff, que se utiliza de solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 4% como agente descontaminante (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1979; ROSEMBERG *et al.*, 1990; DAVID *et al.*, 1994; SECRETARIA NACIONAL DE PROGRAMAS ESPECIAIS DE SAÚDE (BRASIL), 1994a; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (BRASIL), 1994b, 1995; THOREL, 1994) e o outro o método ácido ou método de Löwenstein-Jensen modificado (Román, 1990), utilizando-se a solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 4%.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 12 hamsters fêmeas adultas, inoculadas individualmente pela via oral, com 10⁸ ufc/0,5 mL/animal de *Mycobacterium avium*, isolado de suíno (BALIAN *et al.*, 1995). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, sobre cama de maravalha esterilizada, com suprimento de água e ração, *ad libitum*. Foram colhidas as fezes de cada animal, trocando-se as camas após cada colheita, no 10°, 21°, 31°, 36°, 50°, 56°, 71°, 72°, 77°, 78°, 84°, 85°, 91°, 92°, 99°, 105° dia pós-inoculação, completando-se um total de 16 tempos experimentais.

Optou-se em comparar os métodos A e B a partir do 10° dia pós-inoculação por ter sido observado que entre o 1° e o 10° dia a eliminação de micobactérias nas fezes possibilitou resultados coincidentes entre os métodos A e B.

De cada amostra pesou-se 1g de fezes que foram homogeneizadas com 9,0 mL de solução salina 0,85% estéril em gral e pistilo estéreis. A seguir filtrou-se o conteúdo para um tubo de centrifuga estéril. Manteve-se o tubo em repouso por dez minutos, pipetando-se então 2,0 mL assim distribuídos: 1,0 mL em cada um, de dois tubos de centrifuga designados por tubo A e tubo B; sendo o tubo A submetido ao método de descontaminação básico e o tubo B submetido ao método de descontaminação ácido.

No tubo A colocou-se 1,0 mL de solução de hidróxido de sódio a 4% e duas gotas de vermelho de fenol, agitou-se e em seguida incubou-se a 37°C por 20 minutos (a suspensão adquire cor vermelha). Após este período acrescentou-se solução de ácido clorídri-

co (HCl) a 1N até a mudança de cor do vermelho para a cor tijolo e estabilização do pH entre 6,5 e 7,0.

No tubo B colocou-se 1,0 mL de solução de ácido sulfúrico a 4% e duas gotas de vermelho de fenol, agitou-se e incubou-se a 37°C por 20 minutos (a suspensão adquire cor amarela). Após este período acrescentou-se solução de hidróxido de sódio a 4% até a viragem de cor do amarelo para cor tijolo e estabilização do pH entre 6,5 e 7,0.

Em seguida, os tubos A e B, hermeticamente tampados foram centrifugados a 1000 g^(*) por 20 minutos. Desprezados os sobrenadantes, ressuspendeu-se os sedimentos com 2,0 mL de solução salina estéril em cada um dos tubos. Utilizou-se agitador do tipo vortex para a homogeneização da suspensão e em seguida a partir de cada um dos tubos A e B, semeou-se 2 a 3 gotas em meio Petragnani, em tubos com tampa rosqueada, e em duplicata. Os tubos foram então incubados em estufa a 37°C, em posição inclinada sob um ângulo de aproximadamente 30° com a superfície e mantidos com as tampas semi-abertas até a secagem da superfície do meio. Em seguida foram mantidos em estufa, na posição vertical, fazendo-se a observação semanal e a leitura aos 32 dias de incubação.

(*) Obtenção do valor $g = 1,12 \cdot r \cdot (\text{mm}) \cdot (\text{rpm})$
onde r = raio da centrífuga 1000

Tratamento estatístico

A concordância dos sucessos no isolamento de MAC foi verificada através do cálculo de “kappa” (PEREIRA, 1995), utilizando-se somente os resultados obtidos entre o 10º e o 105º dias pós-infecção, uma vez que até o décimo dia os dois métodos apresentaram capacidade idêntica em recuperar o agente a partir das fezes. A frequência de contaminações foi verificada através do teste de duas proporções, utilizando-se todos os resultados. O teste de duas proporções foi executado pelo programa Epi Info.

RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta os resultados dos sucessos no isolamento de *M. avium* para os dois métodos de descontaminação empregados.

O “kappa” calculado foi de 0,6, demonstrando concordância moderada entre os dois métodos, embora em números absolutos o método básico tenha obtido sucesso em 62 oportunidades, contra 56 do ácido.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os dois métodos de descontaminação empregados apresentaram uma concordância moderada quan-

Tabela 1 - Desempenho de dois métodos de descontaminação método básico - Petroff e método ácido - Löwenstein-Jensen e frequência de isolamento de micobactérias e não isolamento mais contaminados a partir de amostras de fezes de hamster. São Paulo - 2001

	Método Básico		
	Isolamento + contaminado	Não isolamento	Total
Método ácido	33	23	56 (29,2%)
Não isolamento + contaminado	29	107	136 (70,8%)
Total	62(32,3%)	130 (67,7%)	192

*contaminação ou não isolamento

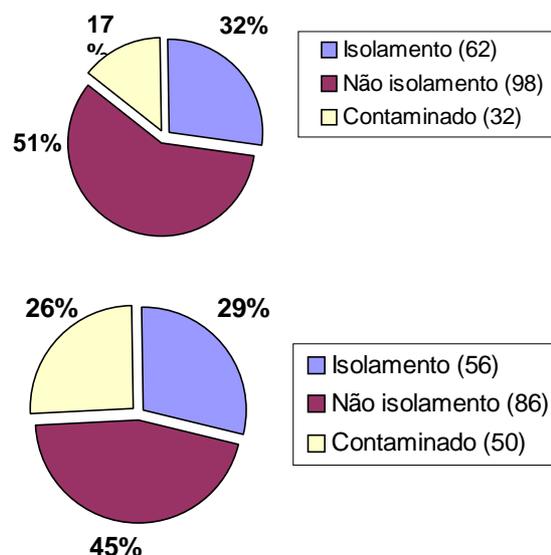


Gráfico 1 - Porcentagens de isolamento de micobactéria, de não isolamento e de cultivos contaminados utilizando o método de descontaminação de Petroff (a) e utilizando o método de descontaminação de Löwenstein-Jensen (b) de amostras de fezes de hamsters. São Paulo - 2001.

to a capacidade de isolamento de *M. avium*, apesar de que o método ácido apresentou uma maior frequência de ocorrências de contaminações. O menor poder descontaminante deste método pode estar associado ao fato de ter sido utilizado solução de ácido sulfúrico a 4%, enquanto que a literatura recomenda o uso de soluções a 15% para amostras altamente contaminadas, como por exemplo fezes (ROMÁN, 1990).

Tanto o método ácido quanto o básico apresentaram a mesma capacidade de sucesso, isto é, revelar isolamento de micobactérias, em contra partida, na categoria de não isolamentos - insucesso, pôde-se obter menor ocorrência de contaminações com o método de Petroff.

Deve-se considerar na interpretação destes resultados que a concentração do agente nas fezes dos animais pode interferir na eficácia de recuperação em ambos os métodos, isto é, quando presente em altas concentrações as injúrias que a descontaminação causa às micobactérias pode desempenhar menor comprometimento da capacidade de revelação do teste, não podendo se dizer o mesmo quando há quantidades escassas de micobactérias ou estas estão em estado de injúria.

No presente trabalho, os resultados obtidos devem ser analisados considerando tratar-se de uma infecção experimental, na qual os animais foram inoculados com alta concentração (108 ufc de micobactérias/animal) em uma única dose, situação pouco provável na natureza, onde os susceptíveis são mais frequentemente expostos a pequenas concentrações do agente, em repetidas vezes.

Concluindo, sugere-se preferencialmente o método de Petroff para a descontaminação de fezes e a realização de ensaios utilizando-se soluções de ácido sulfúrico com concentrações maiores que 4%, com o intuito de se conseguir o menor comprometimento da viabilidade e capacidade de multiplicação das micobactérias e ao mesmo tempo a inativação da microbiota acompanhante

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. *Bacteriología de la tuberculosis humana y animal*. Ramos Mejia, Buenos Aires, 1979. (Série de Monografias Científicas y Tecnicas, C.P.Z., 11).
- CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. *Manual de normas e procedimientos técnicos para la bacteriología de la tuberculosis*. Buenos Aires, 1985. 25p. (Nota técnica, 27).
- CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. *Métodos de laboratorio de microbiología veterinária para el aislamiento e identificación de micobacterias*. Ramos Mejia, Buenos Aires, 1973. (Série de Monografias Científicas y Tecnicas, C.P.Z., 6).
- CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. *Bacteriología de la tuberculosis humana y animal*. Ramos Mejia, Buenos Aires, 1979. 63p. (Serie de monografias científicas y tecnicas, C.P.Z., 11)
- CHASE, W. & BOWN, F. *General Statistics*. 2.ed. John Willey & Sons: New York, 1992.
- DAVID, H.; BRUM, L.; PRIETO, E. *Manual de micobacteriología em Saúde Pública. Princípios e métodos*. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical, 1994.
- FALKINHAM, J.O. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Vet.*, v.9, p.177-215, 1996.
- FERREIRA NETO, J.S.; PINHEIRO, S.R.; MORAIS, Z.M.; SINHORINI, I.L.; ITO, F.H.; VASCONCELLOS, S.A. Avaliação quantitativa da concentração de micobactérias em órgãos e humores de hamsters experimentalmente infectados com *Mycobacterium bovis*, estirpe AN5. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.31, n.2, p.131-139, 1994.
- MASAKI, S.; SHIMIZU, K.; CHO, N.; HIROSE, T. Isolation of mycobacteria from lymphonodes of pigs and their environment. *Jap. J. Vet. Sci.* n.44, p.213-221, 1982.
- MERKAL, R.S. & McCULLOUGH, W.G. A new mycobactin J, from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Curr. Microbiol.*, v.7, p.333-335, 1982.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (BRASIL). Centro de Referência Professor Hélio Fraga. *Manual de bacteriología da tuberculose*. 2 ed. Rio de Janeiro: FNS, 1994.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (BRASIL). Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária. *Manual de normas para o controle da tuberculose*. 4 ed. Brasília, 1995. (Série A: Normas e Manuais Técnicos, 13).
- SECRETARIA NACIONAL DE PROGRAMAS ESPECIAIS DE SAÚDE (BRASIL). Divisão de Pneumologia Sanitária. Campanha Nacional contra a Tuberculose. *Controle da Tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço*. 4 ed. Brasília, 1994.
- PEREIRA, M.G. *Epidemiologia teoria e prática*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1995. 365p.
- PINHEIRO, S.R. Influência da origem da estirpe AN5 de *Mycobacterium bovis*, da temperatura de contato e da matéria orgânica sobre a atividade micobactericida do hipoclorito de sódio ou de aldeídos. São Paulo, 1994. 55p. [Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo].
- 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. *Braz. J. Vet. Res. Anim.*, v.29, n.1, 51-60, 1992.
- ROMÁN, M.C. *Microbiología Clínica de las enfermedades por micobacterias (Tuberculosis, Lepra y Micobacteriosis)*. Universidad de Cordoba, Facultad de Medicina, 1990. 233p.
- ROSEMBERG, J.; TARANTINO, A.B.; PAULA, A. Tuberculose. In: TARANTINO, A.B. *Doenças Pulmonares*. 3 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1990. p.233-297.
- THOREL, M.F. Le rôle du laboratoire dans le contrôle de la tuberculose chez les animaux. *Point Vétérinaire*, v.26, n.159, p.35-40, 1994.
- WALLACE, R.J. JR.; GLASSROTH, J.; GRIFFITH, D.E.; OLIVER, K.N.; COOK, J.L.; GORDIN, F. American Toracic Society: Diagnosis and tratment of disease caused by non tuberculous mycobacteria. *Resp. Crit. Care. Med.*, v.156, S1-S25, 1997. Suppl.
- WALLACE, R.J. JR.; BROWN, B.A.; GRIFFITH, D.E. Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks, caused by nontuberculous mycobacteria. *Ann. Vet. Microbiol.*, v.52, p.453-490, 1998.
- WRIGHR, P.W. & WALLACE, R.J. JR. Syndromes, diagnosis, and treatment of rapidly growing mycobacteria, In: ROOMAN, M.D. & MACGREGOR, R.R. (Eds.). *Tuberculosis: Clinical Management and new challenges*. New York : McGraw-Hill, 1995. p.373-389.
- YARES, M.D.; POZNIAK, A.; UTTLEY, A.H.C.; CLARKE, R.; GRANGE, J.M. Isolation of environmental mycobacteria from clinical specimens in south-east England: 1973-1993. *Int. J. Tubercle Lung Dis.*, v1, p.75-80, 1997.

Recebido em 26/12/01

Aceito em 24/4/02