

CRISTINA CORSI DIB

Utilização de uma técnica rápida para o isolamento de *Mycobacterium*
bovis a partir de amostras de leite experimentalmente inoculadas

São Paulo

2005

CRISTINA CORSI DIB

Utilização de uma técnica rápida para isolamento de *Mycobacterium bovis* a partir de amostras de leite experimentalmente inoculadas

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof^ª. Dra. Sônia Regina Pinheiro

São Paulo

2005

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

8/
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
17/10/05

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1572
FMVZ

Dib, Cristina Corsi

Utilização de uma técnica rápida para isolamento de *Mycobacterium bovis* a partir de amostras de leite experimentalmente inoculadas / Cristina Corsi Dib. – São Paulo : C. C. Dib, 2005.
115 f. : il.

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

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profª. Dra. Sônia Regina Pinheiro.

1. Tuberculose. 2. *Mycobacterium bovis*. 3. Leite. 4. Middlebrook. 5. Isolamento. I. Título.



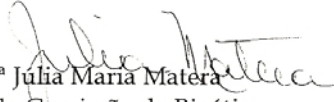
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Utilização de uma técnica rápida para isolamento de *Mycobacterium bovis* a partir de amostras de leite e validação desta técnica frente a outras usualmente empregadas" Protocolo nº 303/2003, utilizando apenas amostras de leite, sob a responsabilidade da Profª Drª Sonia Regina Pinheiro, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Utilization of the fast technical to isolation *Mycobacterium bovis* from milk samples and validation of this technique when compare to usually others one" protocol number 303/2003, utilizing just samples of milk, under the responsibility of Profª Drª Sonia Regina Pinheiro, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Biotic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum").

São Paulo, 29 de abril de 2003


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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: DIB, Cristina Corsi

Título: Utilização de uma técnica rápida para isolamento de *Mycobacterium bovis* a partir de amostras de leite e experimentalmente inoculadas

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

Data: ___ / ___ / ___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Instituição: _____

Dedico

*À minha família,
por todo amor, apoio e incentivo,
em todos os anos de minha vida.*

*Ao Dani,
pelo imenso carinho e paciência,
em todas as etapas desta longa
jornada.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Sônia Regina Pinheiro, pela orientação, amizade, confiança e incentivo mesmo nas etapas mais difíceis deste projeto.

Ao Professor Nilson Benites pelos valiosos conselhos e sugestões durante a realização do experimento.

À Dra. Eliana Roxo pelas sugestões e informações, e pelo breve mas precioso período passado em seu laboratório.

Ao Professor Silvio Arruda Vasconcellos pelo acolhimento no Laboratório de Zoonoses Bacterianas, e eterna luta junto às agências de fomento, por bolsas de pós-graduação, que permitiram a realização desta pesquisa.

Ao Professor Marcos Amaku pelo apoio na análise estatística dos resultados.

Ao Professor Raul José da Silva Gírio pelo incentivo ao ingresso na pós-graduação e na pesquisa.

À Zenaide e à Gisele pela ajuda essencial na realização de todo o experimento, pelo aprendizado, dedicação, sugestões e principalmente pela paciência.

À todos os colegas do Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Eugênia, Daniela, Simone, Paty, Rosana, Fabiana, Pancho, Lara, Vanessa, Dona Odete, e aos estagiários e residentes que passaram por lá.

Ao Leandro, amigo e companheiro de laboratório, pelas sugestões e troca de informações.

Aos amigos: Vanessa, Eliana, Simone, Cris Brito, Tati, Leslie, Iara, Luís Ivan, Maurício, Letticie, Adriano, Ricardo, Richard, Alexandre, Silvio, Renata Paixão, Sandra, Danival, Cristina, Virginia, Bispo e Tânia pelo companheirismo, apoio e incentivo, e por todos os inúmeros momentos de diversão.

À Ana e a Paula (Spiga) pela amizade e carinho, mesmo à distância, por todos estes anos de convivência.

Ao Instituto de Zootecnia pelo apoio na etapa final de conclusão, principalmente aos pesquisadores e funcionários da CAPTA- Bovinos de Leite, pela paciência, compreensão e incentivo.

À Capes Demanda Social pela concessão da bolsa de mestrado, e apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Aos funcionários da Biblioteca pelas sugestões e ajuda crucial na conclusão deste trabalho.

RESUMO

DIB, C. C. **Utilização de uma técnica rápida para o isolamento de *Mycobacterium bovis* a partir de amostras de leite experimentalmente inoculadas**. [Utilization of the fast technique of isolation of *Mycobacterium bovis* from milk samples experimentally inoculated]. 2005. 115 f. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

A técnica de camada delgada em placas com meio de Middlebrook 7H11 foi comparada com a técnica padrão de cultura em 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, utilizando-se da gordura (**técnica 1**) e do sedimento (**técnica 2**), descontaminadas pelo método de Petroff modificado (adicionado de Tween 80) e confrontadas com a técnica do leite total submetida ao método de Petroff e semeadas nos dois meios. Os resultados destas técnicas (**1 e 2**) foram comparados entre si pelo teste não paramétrico de Wilcoxon, e entre os resultados obtidos na técnica de leite total submetida ao método tradicional de Petroff, por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Posteriormente, amostras de leite nas diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} foram então submetidas às mesmas técnicas de processamento e descontaminação para averiguação de sensibilidade. Os resultados obtidos demonstraram que: 1) a técnica de cultivo de micobactérias em amostras de leite no meio de Middlebrook 7H11 se mostrou viável frente à tradicional; 2) a técnica de camada delgada permitiu a visualização precoce das micobactérias quando comparadas ao meio de Stonebrink; 3) as **técnica 1 e 2** forneceram maior recuperação de micobactérias e maior proporção de cultivos positivos nos dois empregados; 4) a técnica de camada delgada em meio de Middlebrook 7H11 modificado

pode ser usada como uma técnica complementar aos métodos tradicionais de diagnóstico da tuberculose bovina em amostras de leite para fins de vigilância epidemiológica.

Palavras –chaves: Tuberculose. *Mycobacterium bovis*. Leite. Middlebrook. Isolamento.

ABSTRACT

DIB, C. C. **Utilization of the fast technique of isolation of *Mycobacterium bovis* from milk samples experimentally.** [Utilização de uma técnica rápida para o isolamento de *Mycobacterium bovis* a partir de amostras de leite experimentalmente inoculadas]. 2005. 115 f. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

The modified thin layer Middlebrook 7H11 cultivation technique was compared to the traditional culture technique using the Stonebrink in order to evaluate the sensibility and the time for the detection of positive cultures of mycobacteria in milk samples, experimentally inoculated by *Mycobacterium bovis* (strain AN5), 10^{-2} dilution, were submitted by two types of procedures named **technique 1** (milk fat) and **2** (milk sediment), decontaminated by modified Petroff 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 within each other by the non-parametric Wilcoxon test, and within the results of standard milk submitted by the traditional Petroff method, by the non-parametric Mann-Whitney. Milk samples were diluted to 10^{-3} , 10^{-4} and 10^{-5} and submitted by the techniques **1** and **2** decontaminated by the modified Petroff method, and total milk by traditional Petroff method to averiguate the sensibility. The results found in this experiment demonstrated that 1) the modified thin layer technique of isolation of mycobacteria in milk samples was practicable against the traditional one; 2) the time needed for the detection of mycobacteria colonies was slightly less with the thin layer technique than the traditional culture method; 3) **techniques 1** and **2** gave more number of colonies and more proportion of positive culture than the traditional one in all media used; 4) this technique should be used as a complementary method to the traditional one in the

diagnostic of bovine tuberculosis from milk samples in order to improve epidemiologic vigilance.

Key-words: Tuberculosis. *Mycobacterium bovis*. Milk. Middlebrook. Isolation.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Esquema da marcação feita nas placas para a delimitação dos campos de leitura. No detalhe vê-se o local exato das leituras com a apresentação do retículo.....	41
Figura 2 - Colônia de <i>M. bovis</i> 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.....	48
Figura 3 - Colônia de <i>M. bovis</i> aos 14 dias de cultivo em meio de Middlebrook 7H11 modificado, obtida pela Técnica 1 (gordura). Visualização sob microscopia óptica com aumento de 100x.....	48
Figura 4 - Colônia de <i>M. bovis</i> aos 17 dias de cultivo em meio de Middlebrook 7H11 modificado, obtida pela Técnica 2 (sedimento). Visualização sob microscopia óptica com aumento de 100x.....	49

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Proporções de cultivo com crescimento de micobactérias, segundo a técnica de processamento, o cultivo adotado (tubos e placas) e o momento de leitura. São Paulo, 2005.....	47
Tabela 2 - Resultado da contagem média de U. F. C. do <i>M. bovis</i> (estirpe AN5) do total de placas, segundo a técnica de processamento adotada, e o momento da leitura. São Paulo, 2005.....	50
Tabela 3 - Proporções de cultivos com crescimento de micobactérias, segundo a técnica de processamento, o cultivo adotado, (tubos e placas) e a diluição do inóculo. São Paulo, 2005.....	52
Tabela 4 - Proporções de cultivos com crescimento de micobactérias, segundo a técnica de processamento, o cultivo adotado (placas e tubos) e o momento de leitura na diluição 10^{-3} do inóculo. São Paulo, 2005.....	55
Tabela 5 - Proporções de cultivo com crescimento de micobactérias, segundo a técnica de processamento, o cultivo adotado (placas e tubos) e o momento de leitura na diluição 10^{-4} do inóculo. São Paulo, 2005.....	56
Tabela 6 - Proporções de cultivo com crescimento de micobactérias, segundo a técnica de processamento, o cultivo adotado (placas e tubos) e o momento de leitura na diluição 10^{-5} do inóculo. São Paulo, 2005.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS:	Acquired Immunodeficiency Syndrome
CMT:	Califórnia Mastitis Test
HIV:	Human Immunodeficiency virus
OIE:	Oficina Internacional de Epizootias
OMS:	Organização Mundial de Saúde
PNCBET:	Programa Nacional de Combate e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
U.F.C.:	Unidades Formadoras de Colônias
UHT:	Ultra High Temperature
q.s.p:	Quantidade suficiente para
p.s.:	pós-semeadura
g:	Gramma
cm:	centímetro
mL:	Mililitro
mm:	milímetro
μm^2 :	Micrômetro quadrado
μL :	Microlitro
%:	Por cento
DNA:	Ácido desoxirribonucléico
MAPA:	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
OADC:	Oleic Acid Albumin Dextrose Catalase
P.C.R.:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RNA:	Ácido ribonucléico

SUMÁRIO

SUMÁRIO

	Pág.
1	INTRODUÇÃO 16
2	OBJETIVOS 34
3	MATERIAL E MÉTODOS 36
3.1	SUSPENSÃO DOS MICRORGANISMO TESTES..... 37
3.2	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE LEITE..... 38
3.3	MEIOS DE CULTURA..... 38
3.4	TÉCNICAS..... 39
3.4.1	Técnica de descontaminação 39
3.4.2	Técnica de qualificação das Unidades Formadoras de Colônias (U.F.C) para leitura do crescimento nos tubos com meio de cultura 39
3.5	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS..... 41
3.5.1	Primeira etapa 41
3.5.2	Segunda etapa 42
3.5.3	Terceira etapa 43
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 44
4	RESULTADOS 45
4.1	PRIMEIRA ETAPA..... 46
4.2	SEGUNDA ETAPA..... 47
4.3	TERCEIRA ETAPA..... 52
5	DISCUSSÃO 58
5.1	PRIMEIRA ETAPA..... 59

5.2	SEGUNDA ETAPA.....	62
5.3	TERCEIRA ETAPA.....	67
6	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS.....	73
	APÊNDICES.....	82

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma das doenças mais antigas de que se tem conhecimento, habitando entre nós desde os tempos pré-históricos (LEÃO, 1999). É uma doença infecciosa que evoluiu de forma crônica e é acompanhada de processos inflamatórios específicos, podendo infectar o homem, da mesma forma que a todos os mamíferos e aves (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

Do século XIX em diante, a natureza exata da tuberculose bovina e sua relação com a tísica no homem foi assunto para considerável debate. Em 1846, Klencke observou que a linfadenite tuberculosa era mais comum em crianças que se alimentavam de leite de vaca do que entre aquelas que ingeriam leite materno e incriminou o leite de vaca como fonte desta doença. Pouco tempo depois, Villemin (1868), inoculando coelhos com material tuberculoso proveniente de vacas doentes observou que eles desenvolviam tuberculose; observou incidentalmente que o material infectado do gado era mais virulento para coelhos do que o material análogo proveniente de humanos (COLLINS; GRANGE, 1983).

De 1901 a 1911, a Comissão Real de Tuberculose, criada na Inglaterra, conduziu trabalhos experimentais que não só estabeleceram firmemente o risco da tuberculose bovina para a saúde humana, mas confirmaram que o leite era vetor de transmissão da tuberculose extra-pulmonar, principalmente em crianças; foi também pioneira em técnicas que mais tarde foram usadas para erradicar a doença no gado e determinaram significativas contribuições à bacteriologia da tuberculose (FERREIRA NETO; BERNARDI, 1997; GRANGE ; YATES, 1994).

Os quatro agentes etiológicos da tuberculose dos mamíferos pertencem ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*: *Mycobacterium bovis* (tuberculose bovina), *M. tuberculosis* (tuberculose humana), *M. africanum* (tuberculose humana na África Tropical) e *M. microti* (tuberculose dos roedores) (ACHA; SZYFRES, 2001; MODA et al., 1996).

Segundo Cosivi et al. em 1998 a tuberculose era a principal causa de morte provocada por um único agente entre adultos em todo o mundo, tendo o *M. tuberculosis* como causa mais comum de tuberculose humana, mas havia uma proporção desconhecida de casos provocados pelo *M. bovis*. Nos países industrializados, os programas de controle e erradicação da tuberculose animal, juntamente com a pasteurização do leite, haviam diminuído drasticamente a incidência da doença causada pelo *M. bovis* no homem e nos bovinos. Contudo, nos países em desenvolvimento, além da tuberculose animal estar amplamente distribuída, as medidas de controle não eram aplicadas ou eram aplicadas inadequadamente e a pasteurização era praticada restritamente.

Em 1997 um estudo patrocinado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) detectou 7,96 milhões de casos novos de tuberculose em seres humanos de todo o mundo, sendo que 44% corresponderam a formas pulmonares com baciloscopia positiva, que são as formas infectantes da doença. Na época foram estimados em 16,2 milhões o número de casos existentes da doença e em 1,87 milhões o número de mortes. Trinta e dois por cento da população mundial foi considerada infectada pelo bacilo da tuberculose. Oitenta por cento de todos os casos de tuberculose foram encontrados em 22 países (LEÃO, 1999).

A informação epidemiológica sobre o impacto da tuberculose zoonótica provocada pelo *M. bovis* no homem, na América Latina, é escassa ou limitada a algumas regiões (KANTOR; RITACCO, 1994; ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD, 1992). Há necessidade de um trabalho conjunto entre profissionais da área humana e veterinária pois, o *M.*

bovis tem particularidades que dificultam o seu isolamento quando feito sem uma solicitação específica por parte do médico junto ao laboratório de análise (PINHEIRO, 1999). Mesmo assim, o bacilo bovino tem sido diagnosticado como agente causador da tuberculose em 1 a 6% dos casos totais em humanos tanto na forma pulmonar como nas extrapulmonares, assumindo caráter de doença profissional em 64% dos casos (ROXO, 1999).

A pandemia da síndrome de imunodeficiência adquirida, AIDS, está associada a infecções oportunistas, principalmente tuberculose e doenças causadas pelo complexo *Mycobacterium avium* (FREITAS et al., 2001). A tuberculose é a principal infecção oportunista em pessoas HIV-positivas e a maioria das pessoas duplamente infectadas pelo *M. bovis* e pelo vírus HIV vive em países em desenvolvimento. A epidemia de infecção pelo HIV nestes países, particularmente naqueles em que a infecção por *M. bovis* está presente nos animais e há condições favoráveis à transmissão desta zoonose, pode fazer da tuberculose zoonótica uma séria ameaça de saúde pública para populações de risco (COSIVI et al., 1998). Na década de 90, a tuberculose atingiu pessoas infectadas pelo HIV com uma severidade alarmante, causando uma doença rapidamente disseminada que envolvia vários órgãos (MILLER; PAIGE, 1998).

No Reino Unido, quando os rebanhos leiteiros se tornaram relativamente livres de tuberculose, a doença no homem, devido ao *M. bovis*, pareceu desaparecer. Infelizmente, este desaparecimento foi um engano, sendo principalmente devido à falha dos técnicos de laboratório em identificar a estirpe bovina (COLLINS; GRANGE, 1983; DABORN; GRANGE, 1993).

Em países em desenvolvimento, especialmente na África, há uma substancial falta de conhecimento da distribuição, padrões epidemiológicos e implicações zoonóticas desta

importante zoonose. Considerando o rebanho bovino e populações ligadas à produção de leite, 50 % dos casos de doença causada por *M. bovis*, são encontrados em países sem nenhuma medida de controle para a tuberculose e, aproximadamente 10 % são encontrados em países onde a tuberculose bovina é doença notificável e onde o teste tuberculínico e abate sanitário dos positivos são realizados (ZOOTIC, 1994).

Uma investigação realizada no distrito de Monze no Zâmbia, na década de 90 revelou 7,4 % de animais positivos no teste de tuberculina comparada, em 33 rebanhos, com uma prevalência nos rebanhos de 32 % de tuberculose bovina. No distrito de Dangme-West, região sudeste do Ghana, em 1999, a prevalência da tuberculose bovina foi calculada em 13,8 % (BONSU et al., 2000).

Na década de 90, de aproximadamente 300 milhões de cabeças que constituíam a população bovina na América Latina e Caribe, 80 milhões se encontravam em países onde as taxas de infecção por *M.bovis* eram muito baixas ou nulas. Os remanescentes 220 milhões encontravam-se em países com moderada ou alta prevalência, ou onde nenhuma informação recente havia sido avaliada (ABRAHÃO, 1998; KANTOR; RITACCO, 1994; O' RELLY; DABORN, 1995; ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD, 1992).

Segundo a Organização Mundial de Saúde em 1993, no Brasil, suspeitava-se que o *M. bovis* fosse responsável por aproximadamente 4.000 dos 80.000 casos de tuberculose registrados por ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1993).

Na Argentina a perda de produção de leite por vacas tuberculosas foi de 18% em consequência do atraso na primeira lactação e do decréscimo no número e duração das lactações, quando comparada com animais saudáveis (KANTOR; RITACCO, 1994).

Hernandez e Dan Baca (1998) calcularam em 4 % o decréscimo na produção de leite das vacas classificadas como positivas pelo teste da prega caudal em um rebanho da Baja Califórnia, México.

Dhinakaran, Nedunchelliyar e Appajirao (1993), encontraram na Índia um decréscimo de 39 % nos valores de produção de leite; de 32 % na persistência de lactação; 10 % na perda de peso corporal e de 34 % nos pesos dos bezerros ao nascimento, em vacas consideradas positivas ao exame cervical simples para o diagnóstico da tuberculose; estes dados foram obtidos quando se comparou com a produção das vacas negativas da mesma propriedade.

O bovino elimina o bacilo da tuberculose no leite, no ar expirado, no corrimento nasal, nas fezes, urina, leite, nas secreções vaginais e uterinas, e pelo sêmen (ABRAHÃO, 1998; CORRÊA, 1975; RADOSTITS, et al. 2000). Na maioria dos casos a transmissão de bovino para bovino é a de ocorrência mais freqüente, facilitando a disseminação e persistência do *M. bovis* na população (HADDAD et al., 2004).

A tuberculose no bovino é principalmente uma doença pulmonar, e as vacas podem transmiti-la através da rota aerógena (GRANGE; YATES, 1994). A aquisição da infecção devida ao *M. bovis*, por meio da inalação de aerossóis contendo o bacilo, pode ocorrer sobretudo em grupos ocupacionais de maior exposição à doença, como tratadores de rebanhos, ordenhadores e seus familiares, trabalhadores da indústria de carne (açougueiros, pessoal de matadouros e frigoríficos) e veterinários, além de membros da comunidade rural que vivem em estreito contato com seus animais (ABRAHÃO, 1998; MODA et al., 1996; ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD, 1992; ROXO, 1996).

Em geral, a incidência de infecções humanas por *M. bovis* é maior nas áreas rurais em rebanhos infectados (MODA et al., 1996).

A frequência da infecção é mais alta em vacas leiteiras do que em bovinos de corte, porque sua vida econômica útil é mais prolongada, e estes animais apresentam um maior contato quando eles se reúnem para a ordenha (ACHA; SZYFRES, 2001). Animais criados em sistemas de manejo intensivo ou confinamento estão mais predispostos a desenvolver a doença. Quanto maior o contato entre os animais, maior é a chance da doença ser transmitida (RADOSTITS, et al., 2000).

Embora a rota respiratória seja considerada a mais importante para o bacilo da tuberculose, a rota alimentar desempenha um papel importante na disseminação desta doença, porque o leite carrega microrganismos para áreas urbanas principalmente se a população tem o hábito de ingerir leite cru (PARDO et al., 2001).

A infecção por *M. bovis* foi problema de saúde pública quando o leite não era pasteurizado, permitindo assim a ingestão do bacilo ao se beber leite de vacas doentes (COLLINS; GRANGE, 1983; O' REILLY; DABORN, 1995). Inicialmente, pensava-se na tuberculose bovina como uma doença de criança já que a doença envolvia tanto os linfonodos cervicais, como o trato intestinal ou as meninges. A entidade clínica, caracterizada pelo aumento e descarga de micobactérias dos linfonodos do pescoço era conhecida como escrófula (O' REILLY; DABORN, 1995).

Segundo Besser et al. (2001), um terço de todos os isolados de casos de tuberculose infantil em San Diego (Califórnia), região de fronteira com o México, eram *M. bovis*. Entre os fatores de risco associados com a presença do teste de Mantoux positivo, estavam as viagens para o México e o consumo de leite cru, evidenciando a importância das regiões de fronteira na epidemiologia da doença e a necessidade de parcerias de trabalho entre os dois países no processo de erradicação desta enfermidade.

No Brasil, a polêmica sobre a transmissão da tuberculose bovina ao homem pelo leite de vacas doentes teve início no começo do século XX, mobilizando o meio médico paulistano, a imprensa diária, a esfera legislativa municipal e o serviço de saúde pública. Foi apenas a partir de 1903, que o médico e inspetor sanitário Victor Godinho apresentou um relatório à Sociedade de Medicina e Cirurgia de São Paulo onde respondia às questões emergentes sobre a transmissão da tuberculose bovina ao homem. Este fato desencadeou uma convicção preponderante no meio médico, quanto à necessidade das medidas de controle sanitário do leite (ANTUNES et al., 2002).

Diferenças culturais na preparação e uso do leite, afetam profundamente a transmissão da tuberculose bovina. Em muitas culturas, manteigas e cremes de leite são produzidos com leites não fervidos, tornando-se uma fonte de *M. bovis*. No mundo todo, a prática de se beber leite cru está associada com o hábito e o modo de vida da população rural e aumenta o risco de infecção, principalmente em crianças (PRITCHARD, 1988).

Segundo Torrance (1937) e McKay (1941) a mastite proveniente da tuberculose, praticamente em todos os casos, é uma extensão da doença proveniente das cavidades torácica ou abdominal, que chega à glândula mamária por meio da corrente sanguínea ou linfática e raramente, embora seja possível, pelo canal do teto. Na maioria dos casos há um aumento de volume do linfonodo supramamário e o úbere se encontra clinicamente normal.

O leite de vacas tuberculosas não aparece alterado de forma visível quando a glândula mamária não está acometida, nem quando a enfermidade desta se encontra no começo. Por isto, a vaca pode estar expulsando *M. bovis* com o leite durante muito tempo. Há diminuição paulatina na quantidade do leite, que se faz mais fluído e de aspecto mais aquoso e transparente (LERCHE, 1969). Pequenos coágulos e uma secreção âmbar se tornam evidentes e a contagem de células somáticas é a mesma observada em mastites crônicas (PARDO et al., 2001).

Quando o leite de uma vaca com tuberculose se mistura com o de um grupo de vacas sadias, as alterações se tornam irreconhecíveis (LERCHE, 1969). Uma só vaca pode excretar bacilos viáveis suficientes para contaminar todo o leite misturado, proveniente de 100 vacas (ABRAHÃO, 1998).

Appaji Rao, Rajaraman e Manickam (1995) na Índia, mostraram indícios de infecção pré-natal, quando analisaram os dados de uma fazenda com alta prevalência de tuberculose bovina e observaram sua ocorrência em bezerros desmamados ao nascimento e mantidos isolados das outras categorias animais. Os resultados do estudo ainda sugeriram que estes animais, nascidos de mães reatoras à tuberculina, poderiam servir como fonte de infecção para bezerros saudáveis que conviviam na mesma baía.

Durante um período de aproximadamente sete meses, Wetzstein e Greenfield em 1992 no Canadá, identificaram 18 casos de mastites causadas pelo *Mycobacterium* sp, sendo 17 dos casos identificados como *M. fortuitum* e um dos casos identificado como *M. chelonae*.

Evangelista e De Anda (1996) demonstraram que o risco de exposição ao *Mycobacterium bovis* aumentou em 33% em um grupo de bezerros alimentados com colostro e leite cru de vacas das quais não se conhecia a resposta ao teste de tuberculina, comparado a um aumento de 11% em um grupo de bezerros alimentados com leite em pó e colostro de vacas negativas ao teste de tuberculina, em uma fazenda com histórico de tuberculose na Baja Califórnia, México.

Em um trabalho realizado por Pardo (2001) em seis fazendas do Estado de São Paulo, dos 52 animais considerados positivos ou suspeitos pelo teste de Stormont, 19 (36,54%) apresentaram *Mycobacterium* spp no leite. A avaliação da eliminação padrão da micobactéria durante os 15 dias de colheita de amostras, mostrou uma característica intermitente e irregular. Também não foi observada nenhuma influência dos estágios de lactação na recuperação dos microrganismos. *M.*

bovis, *M. fortuitum* e *M. avium* foram identificadas em respectivamente, 5,26; 10,52; e 5,26% das 19 amostras estudadas.

A prevalência da tuberculose nos caprinos parece ser baixa. Nos países que têm avançado na erradicação da tuberculose bovina, atenção é dada a infecção nos caprinos, já que esta espécie é susceptível ao *M. bovis*, sofre com certa frequência de tuberculose pulmonar e pode reinfectar os bovinos. As cabras também têm mastite proveniente da tuberculose e seu leite pode constituir um perigo para o consumidor. Assim mesmo, os caprinos são susceptíveis a *M. avium* e a *M. tuberculosis*, e às vezes ocorrem processos generalizados por este último agente (ACHA; SZYFRES, 2001).

O leite de cabra é comumente utilizado para alimentar crianças alérgicas ao leite de vaca (VAN DEN HEEVER, 1984). A tuberculose em cabras usualmente ocorre quando estes animais pastejam juntamente com o gado bovino infectado (COUSINS et al., 1993). A mastite crônica consequência da tuberculose, é muito semelhante à que ocorre nos bovinos, apresentando usualmente um nódulo caseoso circunscrito no úbere. Os microrganismos estão presentes na secreção láctea desde o começo, e a excreção de micobactéria no leite de cabras tuberculina-positivas, sem evidências clínicas de mastite, já foi relatada. Cabras que viveram ou vivem com gado bovino infectado, devem ser considerados como fonte de infecção da tuberculose bovina, para os consumidores do seu leite, assim como, para o gado em geral (VAN DEN HEEVER, 1984).

A obrigatoriedade da pasteurização do leite em nosso país estabeleceu-se em 1952, (BRANDÃO, 1994) e ainda hoje acredita-se que aproximadamente 50% de todo o leite consumido, não é pasteurizado, aumentando-se o risco de infecção por *M. bovis* (LEITE et al., 2003).

A inativação do *M. bovis* pelo processo de pasteurização lenta, que consiste no aquecimento do leite a 62 – 65°C por 30 minutos, e a pasteurização de curta duração, que consiste no aquecimento do leite a 72-75°C por 15 a 20 segundos (BRANDÃO, 1994) promove uma considerável margem de segurança para o tempo requerido para a destruição do *M. bovis* por estes métodos, assumindo-se uma concentração máxima de 10⁴/mL (KELLS; LEAR, 1960). O *M. bovis* inoculado a 10⁵ U.F.C./mL também não foi recuperado de amostras após a pasteurização por 63,5°C por 20 minutos (GRANT et al., 1996).

Segundo Caffrey (1994), os programas de controle e erradicação da tuberculose bovina avançaram com a criação da Comunidade Européia, onde foram estabelecidas normas de tráfego, entre os países membros, que por sua vez impulsionaram os métodos para a criação e manutenção de rebanhos oficialmente livres de tuberculose. Nesta época, a prevalência da tuberculose nos bovinos variou entre 0,37 e 0 % entre os países membros com exceção da Espanha com 10,8 % de prevalência, da Irlanda com 8,8 % e da Itália com 3,71 %.

Essey e Koller (1994), estimaram a prevalência da tuberculose bovina nesta época em 0,003% nos Estados Unidos; nesta mesma época, das dez províncias políticas que constituíam o Canadá, oito eram consideradas áreas livres de tuberculose.

Segundo dados da Oficina Internacional de Epizootias (OIE) de 2004 , alguns países como a Dinamarca (considerada livre pelas regras da União Européia desde 1988) e os Países Baixos (onde não há histórico da doença desde 2002) são exceções embora as campanhas de controle e erradicação tenham avançado em muitos países contribuindo para a manutenção de baixas taxas na Grécia, Alemanha e Portugal. (WORD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2005).

Desde a década de 90, a maior complicação tem sido a emergência do reconhecimento de reservatórios do bacilo em diversas espécies de animais silvestres (KEET et al., 1994; MORRIS

et al., 1994). Em alguns países a presença de animais silvestres, que atuam como reservatórios de *M. bovis*, torna difícil a erradicação da doença em determinadas áreas as quais permanecem como áreas endêmicas, como é o caso do gambá na Nova Zelândia e do búfalo na Austrália (TWEDDLE; LIVINGSTONE, 1994) e do texugo na Irlanda e Inglaterra (GRANGE et al., 1990).

Em 1992, a situação epidemiológica da tuberculose bovina nas Américas variava de região para região. Em muitos países do Caribe não apareciam casos desde 1985; Cuba havia erradicado a tuberculose bovina em 1984 e na República Dominicana a prevalência da doença era de 0,5%. Na América Central, o Panamá não comunicava a presença de lesões em frigoríficos desde 1983, Costa Rica e Honduras apresentavam prevalências menores que 0,2%, El Salvador, Guatemala e Nicaragua, superior a 1% e no México a prevalência no gado de leite era de cerca de 2,1%. Na América do Sul, na Colômbia, Paraguai, Suriname, Uruguai e Venezuela as taxas de infecção mantinham-se muito baixas ou ausentes. Na Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Equador, Guiana e Peru, as prevalências eram maiores ou iguais a 1%. O Canadá e os Estados Unidos já haviam terminado com a tuberculose bovina como um problema sanitário, embora não tivessem conseguido erradicá-la por completo (ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD, 1992).

A prevalência média da tuberculose bovina no Brasil, segundo dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, era de 1,3 % no período de 1989 e 1998 (BRASIL, 2005).

No Brasil, em 2002, foi criado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), sob o qual os animais considerados positivos no teste de tuberculina, devem ser marcados a ferro candente com a letra “P” no lado direito da cara e enviados ao abate sanitário.

Esta mesma estratégia, já era utilizada no início do século XX, e levou a muitas divergências entre produtores e autoridades legislativas a respeito do pagamento de indenização de animais positivos, e à desconfianças no método diagnóstico (tuberculina) empregado (ANTUNES et al., 2002; BRASIL, 2002).

No bovino, a tuberculose é diagnosticada *in vivo* pelos sinais clínicos e pelo teste tuberculínico e após a morte, pelos exames *post mortem*, bacteriológicos, histopatológicos e mais modernamente, pelas sondas de DNA através da técnica de *polimerase chain reaction* (PCR) (ROXO, 1996).

Alguns animais, ainda que infectados, não respondem aos testes tuberculínicos. Neill et al. (1994) observou que em alguns casos pode haver a eliminação de *M. bovis* em bovinos não reagentes ao teste de tuberculina. Fatores como, infecção recente, final de gestação e desnutrição podem ocasionar resultados falso-negativos. Contudo, animais em estado avançado de infecção podem manifestar o fenômeno de anergia, definido como ausência de reatividade cutânea à tuberculina, cujo mecanismo ainda não está bem elucidado. A resposta nos bovinos aparece comumente aos 30 a 50 dias pós-infecção justificando, portanto, o fato de que animais recém-infectados podem não responder ao teste tuberculínico (MONAGHAN et al., 1994).

Reações inespecíficas são causadas por outras micobactérias que não o *M. bovis*, dificultando a interpretação do diagnóstico; podem mascarar focos de tuberculose e por outro lado, desacreditar rebanhos indenes quando estas falsas reações não são reconhecidas como tais, prejudicando os programas sanitários dos países com alta prevalência (na fase de controle) e dos países com baixa prevalência e já na fase de erradicação (LANGENEGGER et al., 1981).

A vigilância epidemiológica é um recurso diagnóstico que tem como propósitos básicos a obtenção contínua de conhecimentos acerca dos componentes envolvidos com a ocorrência de

doenças, visando oferecer elementos de apoio aos programas de prevenção, tanto a nível de controle como de erradicação dessas, devendo tais observações apresentar vinculações de carácter geográfico ou cronológico (CÔRTEZ, 1993). A ferramenta mais importante da vigilância epidemiológica é a notificação compulsória, que desencadeia o processo informação-decisão - ação (TEIXEIRA; RISI JUNIOR, 1999).

Os laboratórios, por serem locais de confirmação diagnóstica, constituem recursos valiosos para detectar casos de doenças sujeitas a notificação. Os dados laboratoriais de boa qualidade, na realidade, não só complementam as notificações compulsórias, mas também tem o carácter de recurso adicional, para as investigações epidemiológicas, visando a precisar o diagnóstico etiológico (PEREIRA, 2002).

O diagnóstico laboratorial é importante num programa de erradicação da tuberculose bovina para a confirmação do diagnóstico feito no campo ou no frigorífico e para a manutenção de uma forma de checagem na eficiência dos testes de tuberculina sob as condições de mudanças contínuas durante o período de erradicação (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1989).

O diagnóstico definitivo da tuberculose bovina é o isolamento do *M. bovis*. Este é padrão ouro para uso na avaliação de qualquer método diagnóstico (CORNER, 1994)

Estirpes de campo de *M. bovis* requerem um meio enriquecido para o seu crescimento no primeiro isolamento e condições de microaerofilia. Os meios usados são tanto aqueles à base de ovos (Stonebrink e Löwenstein-Jensen com adição de piruvato como fonte de carbono), ou à base de agar enriquecidos com soro ou sangue (meio Middlebrook 7H11 e meio agar sangue também chamado B83). Para o primeiro isolamento é recomendado que tanto os meios à base de ovos, como aqueles à base de ágar sejam empregados para cada espécime (CORNER, 1994).

O *M. bovis* tem dificuldade em se desenvolver em meios glicerinados, e por este motivo se desenvolve melhor no meio de Stonebrink, onde o glicerol é substituído pelo piruvato de sódio. Para o isolamento primário do *M. bovis* nos meios à base de ágar, recomenda-se uma pequena concentração de CO₂ (não superior a 5%), já que o *M. bovis* é microaerófilo (ABRAHÃO, 1998).

O isolamento de *Mycobacterium* spp em amostras de leite cru, de vacas suspeitas ou positivas à prova de tuberculina, foi realizada por Pardo (2001) em fazendas no Estado de São Paulo. Após um processo prévio de descontaminação as amostras foram inoculadas em meio de Stonebrink e Löwenstein-Jensen com reduzida concentração de glicerol (0,5%), e incubados à 37°C por pelo menos 90 dias, com observação inicialmente diária e depois semanal.

Do ponto de vista diagnóstico, principalmente de tuberculose provocada por *M. bovis*, as principais desvantagens da cultura são: a necessidade de cuidados na manipulação dos espécimes clínicos e 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., 1993).

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). Métodos radiométricos e de detecção do RNA realizados para aumentar a velocidade de detecção do *M. bovis* promoveram sucesso apenas parcial (COLLINS et al., 1994).

A detecção de DNA micobacteriano em amostras clínicas pela reação em *cadeia pela polimerase* (PCR) é uma promessa para o diagnóstico rápido da infecção tuberculosa. Contudo, os resultados da PCR, devem ser corrigidos para a presença de inibidores, assim como para a contaminação por DNA (GARG et al., 2003). O desenvolvimento e o refinamento destes ensaios são necessários antes que eles se tornem o método de escolha do diagnóstico *post-mortem*,

fazendo com que no futuro imediato o diagnóstico continue a ser baseado no cultivo bacteriológico (COLLINS et al., 1994), principalmente quando existir a necessidade da realização de testes de sensibilidade à drogas antimicrobianas.

Mejia et al. (1999), e Smoskovi e 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 a 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.

Um diagnóstico rápido da tuberculose é importante e necessário ao controle e prevenção, objetivando-se limitar a disseminação da doença, evitar a administração de uma terapia inadequada e reduzir os custos de hospitalização humana. A aplicação de métodos de amplificação de ácido nucléico, prometeu mudanças radicais pela possibilidade de estabelecer um diagnóstico em 1 a 2 dias. Infelizmente a rotina diagnóstica utilizada nesta técnica tem um grande número de obstáculos, em particular, a alta variação na sensibilidade e alto custo.

Portanto, o diagnóstico precoce baseado na observação de microcolônias de *Micobacterium* spp, em placas com uma camada delgada de meio de Middlebrook 7H11, frente ao método tradicional de cultivo em meio de Löwenstein Jensen, pode ser utilizado como uma alternativa diagnóstica por ser mais rápido que o método tradicional, e mais barato que o PCR (SOMOSKÖVI; MAGYAR, 1999).

Marcondes, em 2002, concluiu que a técnica de camada delgada em placas permitiu visualização precoce das micobactérias quando comparadas aos meios de Stonebrink e

Petragnani. Apesar do abundante crescimento de colônias com três dias de cultivo, as colônias puderam ser melhor visualizadas a partir do 5º e 6º dia, quando o fator corda passou a ser mais evidente. Além disso, a técnica da camada delgada permitiu a diferenciação morfológica entre as estirpes padrão *M. bovis* (AN5) e *M. tuberculosis* (H37Rv) aos 13 dias de cultivo.

A técnica da camada delgada oferece como principais vantagens resultados mais precoces e a possibilidade do estabelecimento de uma identificação preliminar da micobactéria isolada, baseando-se nas características morfológicas das colônias e, portanto, pode ser utilizada como um método complementar para o diagnóstico da tuberculose humana e animal (MARCONDES, 2002).

Os métodos utilizados para descontaminação de amostras de leite *in natura* já foram objeto de discussão por muitos autores (PARDO et al., 2001; PEREZ et al., 2002) e até hoje, não há um método de descontaminação específico para o leite.

Na maior parte dos trabalhos 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 (DUNN; HODGSON, 1982; KANTOR, 1976; PARDO et al., 2001; PEREZ et al., 2002). 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.

Até o presente momento não há registros na literatura pesquisada de um “método rápido” para cultura e isolamento de *M. bovis*, a partir de amostras de leite *in natura* e o processo de descontaminação das amostras pela técnica de Petroff não é específico para o leite. Por este motivo, 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.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

- 1- Padronizar a técnica de cultivo de micobactérias em camada delgada no meio de Middlebrook 7H11, em amostras de leite experimentalmente inoculado, empregando a estirpe padrão *Mycobacterium bovis* (AN5) e tendo como referência o resultado do cultivo clássico nos meios de Stonebrink.
- 2- Avaliar e comparar o crescimento das micobactérias (U.F.C.) processadas pela técnica de Petroff tradicional e a técnica modificada, em camada delgada no meio de Middlebrook 7H11 e no meio de Stonebrink.
- 3- Avaliar a sensibilidade da técnica de Petroff modificada frente à técnica tradicional, em amostras de leite de diferentes diluições.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia empregada para a suspensão dos microrganismos testes, obtenção das amostras de leite e meios de cultura, utilizados em todas etapas do experimento, foram descritas nos tópicos abaixo.

3.1 SUSPENSÃO DOS MICRORGANISMOS TESTES

As suspensões bacterianas foram obtidas raspando-se, da superfície do meio de cultura, 0,06 g de colônias (peso úmido) de *M. fortuitum* (primeira etapa) ou *M. bovis* (demais etapas) que foram diluídas em 1 mL de solução salina 0,85% com 0,05% de Tween 80¹ (polioxietilensorbato monooleato) (PINHEIRO et al. 1997).

O *Mycobacterium fortuitum*, com 32 dias de crescimento no meio de Petraghani, foi utilizado como inóculo na primeira etapa deste experimento por apresentar um crescimento rápido e ser menos patogênico; serviu para padronizar os melhores parâmetros de diluição a serem preconizados posteriormente. 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) (Apêndice A).

¹ DIFCO

3.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE LEITE

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 foram mantidas a menos -20°C até o dia do processamento.

3.3 MEIOS DE CULTURA

Na primeira etapa foi semeado o meio de Middlebrook 7H10 para o crescimento do *M. fortuitum* (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1979) (Apêndice B); para favorecer o crescimento do *M. bovis*, nas demais etapas, foram utilizados os meios de Stonebrink e de Middlebrook 7H11 modificado contendo piruvato de sódio como fonte de carbono (Apêndice C) (UNIVERSIDAD DE LAS NACIONES UNIDAS, 1998).

O meio de Stonebrink foi distribuído em tubos de vidro (18 x 180 mm) com tampa de algodão hidrófobo, em volume 7 mL por tubo e o meio de Middlebrook 7H11 modificado foi distribuído em placas de Petri (60 x 15 mm), no volume de 5 mL por unidade.

3.4 TÉCNICAS

As técnicas empregadas para descontaminação das amostras de leite, e quantificação das colônias nos meios de Stonebrink e Middlebrook 7H11 foram detalhadas nos tópicos abaixo.

3.4.1 Técnica de descontaminação

O método de Petroff foi escolhido para a descontaminação das amostras de leite contendo a solução do microrganismo teste (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1979).

3.4.2 Técnica de quantificação das Unidades Formadoras de Colônias (U.F.C.) nos tubos

As leituras de U.F.C. nos tubos contendo o meio de Stonebrink, foram semanais e terminaram na 6ª semana pós-semeadura; a área da superfície do meio de cultura foi demarcada contando-se 6 cm lineares a partir da extremidade inferior da superfície exposta, segundo o critério estabelecido por Pinheiro (2001):

0 = ausência de crescimento

1 = crescimento de uma U.F.C. a até 20% da superfície demarcada

2 = crescimento de 21 a 40% da superfície demarcada

3 = crescimento de 41 a 60% da superfície demarcada

4 = crescimento de 61 a 80% da superfície demarcada (colônias quase confluentes)

5 = crescimento de 81 a 100% da superfície demarcada (toda a superfície do meio tomada por colônias)

3.4.3 Técnica de quantificação das U.F.C. nas placas

As leituras de U.F.C. nas placas de camada delgada de Middlebrook 7H11, foram feitas duas vezes por semana até a 3ª semana pós-semeadura.

Para a contagem das microcolônias empregou-se um retículo² calibrado acoplado à lente ocular do microscópio óptico³ que, no aumento de 100 vezes, delimitava 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 (Fig. 1). Por placa foram destacados 10 quadrados, marcados com uma caneta de retroprojeter de cor diferente, em cujo centro era realizada a contagem. Desta forma foi possível acompanhar o crescimento das micobactérias e visualizar novas colônias. Ao fim de cada leitura o número total de U.F.C. obtido por placa foi dividido por dez.

² Retícula B 0509 Olympus – American Co.

³ Microscópio CBA – Olympus – American Co.

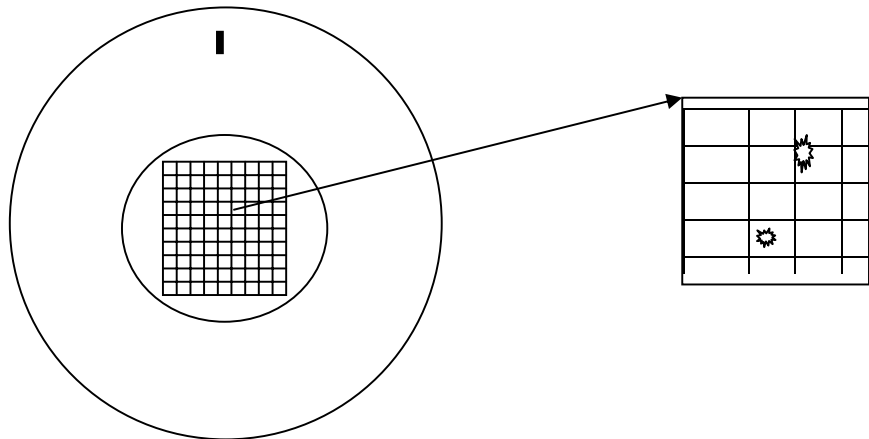


Figura 1 – Esquema da marcação feita nas placas para a delimitação dos campos de leitura. No detalhe vê-se o local exato das leituras com a representação do retículo

3.5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Todos os procedimentos experimentais adotados foram detalhados por etapa nos itens abaixo.

3.5.1 Primeira etapa

Na primeira fase experimental determinou-se os melhores parâmetros de diluição a serem utilizados nas etapas posteriores. Foram semeados com 100 μ L de inóculo, preparado com 0,06 g de colônias (peso úmido) de *M. fortuitum* diluído em 1 mL de salina 0,85% com 0,05% Tween

80, duas placas contendo meio de Middlebrook 7H10; o crescimento de U.F.C. foi avaliado para inóculos diluídos na razão 1:1, 1:10 e 1:100.

3.5.2 Segunda etapa

Uma vez determinada a melhor diluição do inóculo, procurou-se verificar se ocorria diferença no número de micobactérias recuperadas das diferentes fases do leite (gordura e sedimento) que se formam durante a utilização da técnica de descontaminação. Foram testados dois procedimentos posteriormente denominados de **técnica 1** (Petroff normal) e **técnica 2** (Petroff com adição de Tween 80 na amostra analisada). Também foi avaliado o período mínimo, em dias, necessário para o crescimento das U.F.C. após a semeadura nos meios de Stonebrink e Middlebrook 7H11 modificado.

Para certificação da ausência de micobactérias no leite utilizado em todo o experimento foram processadas quatro amostras de leite pela técnica tradicional de Petroff.

O procedimento desta etapa baseou-se em: a cada amostra de 4,5 mL de leite descongelada foi adicionado 0,5 mL do microrganismo teste na diluição 10^{-1} , portanto a diluição final de cada amostra de leite foi considerada 10^{-2} . Em seguida procedeu-se a homogeneização da amostra utilizando-se um aparelho do tipo Vortex[®]. Foram efetuadas 30 repetições e, de cada uma, 2 amostras de leite na diluição 10^{-2} foram processadas, uma pela técnica de Petroff tradicional e a outra foi centrifugada a 3000 rpm por 20 minutos; obtendo-se desta forma as duas fases do leite: gordura (**técnica 1**) e sedimento (**técnica 2**) que foram acondicionados em frascos diferentes. Tanto à gordura quanto ao sedimento, foi adicionado 1 mL de solução salina contendo 0,05% de Tween 80 e, em seguida procedeu-se à homogeneização destas amostras em aparelho

do tipo Vortex para depois efetuar a centrifugação a 3000 rpm por 20 minutos. Após o descarte do sobrenadante, ressuspendeu-se o sedimento com 1 mL de solução salina 0,85% para que finalmente, se efetuasse a descontaminação pela técnica de Petroff. Ao final deste procedimento foram semeadas duas 2 placas contendo meio Middlebrook 7H11 e dois tubos contendo meio Stonebrink para as **técnicas 1** (gordura), e **2** (sedimento) e também para a técnica tradicional.

As placas foram fechadas com fita adesiva Micropore e incubadas a 37°C, em condições de microaerofilia (Anexo 3), dentro de caixas plásticas do tipo “tuperware” vedadas com filme plástico (Parafilme). Durante a primeira semana, os tubos foram mantidos incubados a 37°C, semi-vedados e na posição horizontal. Depois deste período foram devidamente fechados com rolha de cortiça queimada para criar um meio de microaerofilia dentro dos tubos e guardados na posição horizontal.

As leituras das placas foram realizadas duas vezes por semana até o 21º dia, quando o crescimento das colônias começou a tornar difícil a individualização das mesmas. A leitura foi feita com o auxílio de um microscópio óptico (aumento de 100 vezes), obedecendo-se à técnica descrita anteriormente.

Nos tubos as leituras foram semanais até a 6ª semana pós-inoculação, não havendo necessidade de lupa para visualização das U.F.C.

3.5.3 Terceira etapa

Esta etapa teve por objetivo, avaliar a sensibilidade dos meios frente às amostras de leite, contendo suspensões bacterianas, nas diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} . Após a diluição das suspensões

bacterianas nas amostras de leite, o mesmo processamento adotado na segunda etapa, **técnica 1** (gordura) e **2** (sedimento) e técnica tradicional, foi realizado para cada diluição. Desta forma, foram feitas dez repetições de cada uma das três diluições e para cada repetição foram semeadas duas placas e dois tubos. As placas foram incubadas à 37°C em ambiente de microaerofilia sendo submetidas a leituras nos dias 3, 7, 11 e 14 pós-semeadura com auxílio de microscópio óptico (aumento de 100 vezes) equipado com retícula calibrada e nos locais marcados com caneta de retroprojeter descritos na segunda etapa. Os tubos foram incubados da mesma maneira descrita na etapa anterior e foram lidos semanalmente até a 6ª semana pós-semeadura.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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** à de Petroff, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, por meio do programa Minitab (Versão 3.1).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os resultados foram descritos por etapa, e resumidos em tabelas para uma melhor visualização.

4.1 RESULTADOS DA PRIMEIRA ETAPA

Das três diluições de suspensão bacteriana realizadas com *M. fortuitum*: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ; a diluição 10^{-2} foi a que apresentou o melhor padrão de contagem de U. F. C. nas placas contendo meio Middlebrook 7H10. O padrão 10^{-2} estaria representando uma leitura visual de um crescimento de aproximadamente 75 % da superfície da placa no 5 ° dia pós semeadura.

As primeiras U. F. C. foram observadas microscopicamente a partir do terceiro dia e o crescimento macroscópico foi possível de ser observado a partir do quinto dia. Durante esta etapa do experimento, não houve contaminação em nenhuma das placas.

4.2 SEGUNDA ETAPA

Nesta etapa foram semeadas em tubos e placas, micobactérias recuperadas das duas diferentes frações obtidas do leite centrifugado, posteriormente tratadas com Tween 80 e novamente submetidas à centrifugação (**técnica 1**: gordura e **técnica 2**: sedimento) e da técnica de Petroff tradicional que utilizou o sedimento do leite centrifugado, sem a adição do Tween 80.

Os resultados obtidos estão descritos nos Apêndices E a J e foram resumidos na Tabela 1. As Figuras 2 a 4 mostram as colônias de *M. bovis* (estirpe AN5) isoladas nesta etapa, segundo os diferentes métodos empregados com diferentes dias de crescimento.

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. São Paulo, 2005

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

* n° de positivos/n° de semeaduras

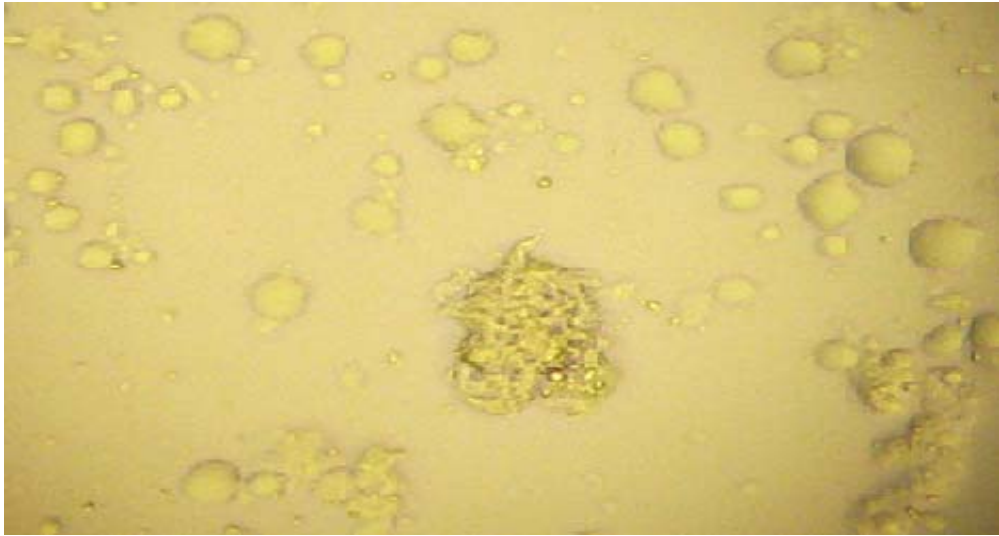


Figura 2 – Colônia de *M. bovis* aos 14 dias de cultivo em meio de Middlebrook 7H11 modificado, obtida pela técnica tradicional de Petroff . Visualização sob microscopia óptica com aumento de 100x

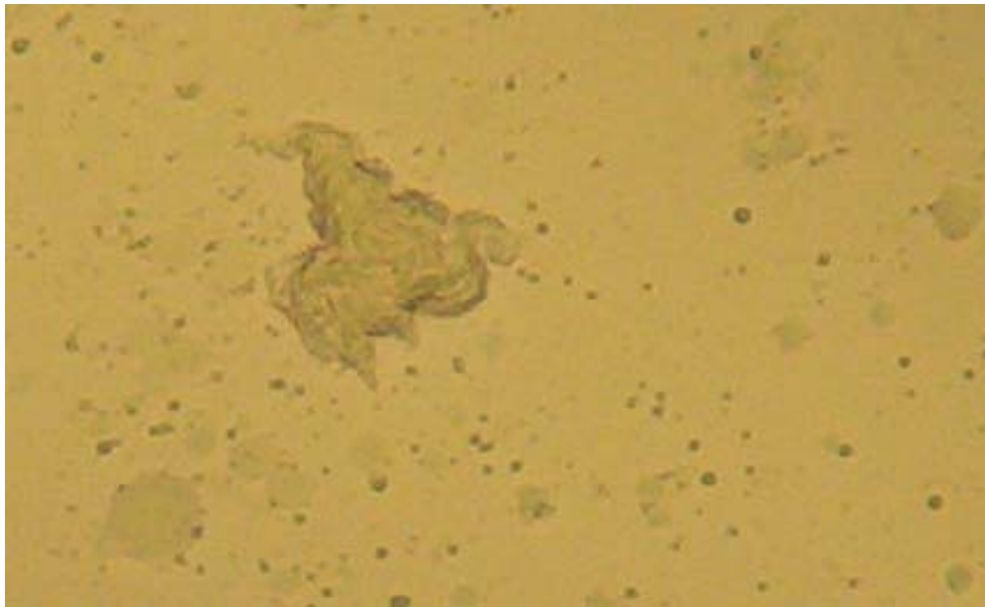


Figura 3 – Colônia de *M. bovis* aos 14 dias de crescimento, em meio de Middlebrook 7H11 modificado, obtida da **Técnica 1** (gordura). Visualização sob microscopia óptica com aumento de 100x



Figura 4 – 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

Das 60 placas semeadas com o material proveniente do leite inoculado experimentalmente, e processado pelo método tradicional de Petroff, em 42,3 % foram verificadas U.F.C. aos 11 dias pós-semeadura (p.s). Das restantes, vinte e seis (44,1 %) apresentaram crescimento entre o 11º e o 14º dia. Todas apresentaram crescimento até o 21º sendo que destas, sete placas (11,9 %) apresentaram crescimento entre o 14º e o 17º dia p.s. e em uma placa (1,7%) o crescimento só foi constatado no 21º dia.

Para os tubos semeados com este material, foram feitas leituras por observação visual do aparecimento das U.F.C. Em 10,2 % dos tubos as primeiras colônias foram visualizadas 21 dias p.s; 62,7 % (37) apresentaram crescimento entre o 21º e o 28º dia e em 25,4 % dos tubos restantes as primeiras U.F.C. foram verificadas a partir do 35º dia; em apenas um tubo (1,7 %) se observou contaminação.

O material obtido da **técnica 1** (gordura) também foi semeado em tubos e placas; para as placas 70,7% (41) apresentaram crescimento aos 11 dias, dez placas (17,2 %) entre o 11° e o 14° dia, e sete (12,1 %) apenas no 17° dia. Do total de tubos, trinta e dois (53,3 %) apresentaram crescimento no 28° dia e 25 % no 35° dia p. s.

As placas semeadas com material da **técnica 2** (sedimento) apresentaram crescimento, em sua maioria (91,5 %) no 11° dia de leitura. Quatro placas apresentaram as primeiras U.F.C no 14° dia e apenas uma no 17° dia p.s. A maior parte dos tubos (52,7 %) apresentou crescimento aos 28 dias p.s.; 12,7 % só apresentaram crescimento no 35° dia p.s. Do total, cinco (9,1 %) apresentaram contaminação.

A Tabela 2 foi originada dos dados referidos nos Anexos 05, 07 e 09 onde é possível comparar a média de crescimento de U.F.C. sobre o total das placas, nos diferentes dias de observação.

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. São Paulo, 2005

Técnica	Placas (dias pós-semeadura)					
	3°	7°	11°	14°	17°	21°
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

A média de crescimento em U.F.C. obtida pela técnica de Petroff tradicional, foi inferior em todos os dias, à média obtida pelas **técnicas 1 e 2**. Na **técnica 2**, onde se processou o sedimento tratado com Tween 80, 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. cinco 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.

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.

Pelos resultados do teste não-paramétrico de Wilcoxon, foi verificada diferença estatística entre as medianas de crescimento de U.F.C. obtidas pela **técnica 1 e 2** aos 11 e aos 14 dias p.s., sendo esta diferença maior para a **técnica 2** do que para a **1**. A partir do 17º dia p.s., 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 entre as medianas de crescimento de U.F.C. obtidos pelas **técnicas 1 e 2** quando comparadas aos resultados da técnica de Petroff tradicional, aos 11, 14, 17 e 21 dias p.s. Foi possível verificar que o resultado da **técnica 2** foi superior aos das demais técnicas empregadas na mesma diluição.

4.3 TERCEIRA ETAPA

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 nos Anexos 11 a 28 e condensados na Tabela 3.

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. São Paulo – 2005

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

* n° de positivos/ n° de sementeiras

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

A diluição 10^{-5} foi a única entre as diluições, utilizadas na técnica de Petroff tradicional, onde não se observou o crescimento de U.F.C. nas placas contendo o meio de Middlebrook (Apêndice O). Com esta técnica, na diluição 10^{-3} foi verificado crescimento de U.F.C. em seis (30%) de um total de vinte placas semeadas (Apêndice K). Três placas (50 %) apresentaram o crescimento à partir do 11 ° dia.

Na diluição 10^{-3} dezoito tubos com o meio de Stonebrink, semeados com a técnica de Petroff tradicional, apresentaram crescimento de U.F.C. (Apêndice L). Destes tubos, em dois (11,1 %) o início do crescimento foi observado a partir do 21° dia, em dez (55,5 %) a partir do 28° dia, em um a partir do 35° dia e em cinco (27,7 %), no último dia de observação (42° dia p.s.). Com a diluição 10^{-4} (Anexo 14), nenhum tubo obteve crescimento em U.F.C. antes dos 21 dias p.s.; em apenas três (15 %) foi observado crescimento aos 28 dias, seis (30 %) a partir do 35° dia e 5 (25 %) a partir do 42° dia. Em 30% dos tubos não houve crescimento.

Na diluição 10^{-5} (Apêndice P) cinco tubos (25%) apresentaram crescimento de U.F.C. Dos cinco, em apenas um tubo pode-se observar o crescimento de U.F.C. aos 28 dias. Os demais tubos, apresentaram crescimento aos 42 dias, último dia de leitura.

Nas placas semeadas com **técnica 1** foi observado crescimento em todas as diluições. Sendo que, para a diluição 10^{-3} , em dezenove placas (95%) se observou crescimento de U.F.C. Em dezessete das dezenove placas (89%) o início do crescimento de colônias foi observado no 11° dia p.s.

Nas placas semeadas com inóculo na diluição 10^{-4} proveniente da **técnica 1**, apenas nove placas contendo meio Middlebrook, apresentaram crescimento (Apêndice S). Do total, oito placas (89%) iniciaram o crescimento de U.F.C. até os 11 dias e apenas uma apresentou crescimento no 14° dia. Na diluição de 10^{-5} (Apêndice U), duas placas apresentaram crescimento em U.F.C. e em apenas uma o início de crescimento foi observado aos 11 dias p.s.

Todos os tubos semeados com inóculo na diluição 10^{-3} proveniente da **técnica 1**, apresentaram crescimento até o último dia de observação (Apêndice R). Do total, em doze (60 %) o início do crescimento pode ser visualizado aos 28 dias, e em oito (40 %) aos 35 dias. Na diluição 10^{-4} (Apêndice T) o crescimento de U.F.C. foi primeiramente visualizado aos 28 dias em cinco dos tubos (29,4 %) com crescimento. Entre o dia 28° e o 35° dia p.s. mais sete tubos (41,2 %) apresentaram crescimento, e cinco (29,4 %) tiveram crescimento entre o dia 35 e o dia 42 p.s. Do total, em apenas três tubos não foi observado crescimento de U.F.C. Com a diluição 10^{-5} (Apêndice V), em três (30 %) tubos pode-se observar crescimento de U.F.C. até os 21 dias. Entre o 28° e o 35° dia de observação iniciou-se o crescimento de U.F.C. em mais cinco (50 %) tubos. Apenas dois tubos apresentaram crescimento entre o 35° e o 42° dia. Do total de tubos, dez tubos (50 %) não apresentaram crescimento.

Na **técnica 2** e diluição 10^{-3} , dezesseis placas (80 %) foram consideradas positivas. Destas, doze (75 %) iniciaram o crescimento em U.F.C. até os 11 dias. A diluição 10^{-5} obteve positividade em apenas quatro placas no total, sendo que todas obtiveram crescimento em U.F.C. aos 11 dias de leitura (Apêndice Aa). Na diluição 10^{-4} (Apêndice Y), apenas quatro placas apresentaram crescimento e destas, duas aos 11 dias.

Com a **técnica 2** e diluição 10^{-3} (Apêndice X), oito (42,1 %) dos 19 tubos apresentaram crescimento aos 28 dias p.s., dez tubos (52,6 %) aos 35 dias e apenas um tubo aos 42 dias. Em apenas um tubo, não foi observado crescimento. Na diluição 10^{-4} (Apêndice Z) a primeira observação de crescimento se deu em dois (20%) tubos aos 28 dias p.s., em cinco tubos (50 %) aos 35 dias de crescimento e em três tubos (30 %) aos 42 dias. Em 50 % dos tubos semeados não foi observado crescimento de U.F.C. em nenhum dos dias de observação.

A diluição 10^{-5} (Apêndice Bb) apresentou crescimento em apenas 50 % dos tubos. Destes dez tubos onde foram observadas U.F.C., em três (30 %), elas foram observadas aos 28 dias, em cinco (50 %) aos 35 dias e em mais dois tubos aos 42 dias p.s.

A proporção de cultivos positivos nos tubos e placas na diluição 10^{-3} está representada na Tabela 4. Este resultado demonstra uma maior sensibilidade do meio de Stonebrink (tubo) frente ao meio Middlebrook 7H11 modificado (placa) entre as diferentes técnicas empregadas na diluição 10^{-3} , verificada principalmente na técnica de Petroff tradicional.

Tabela 4 – Proporções de cultivos com crescimento de micobactérias, segundo a técnica de processamento, o cultivo adotado (placas e tubos) e o momento de leitura na diluição 10^{-3} do inóculo. São Paulo, 2005

Técnica	Placas	Tubos
	Dias pós-semeadura	
	14°	42°
Petroff tradicional	6/20	18/20
Técnica 1 (gordura)	19/20	20/20
Técnica 2 (sedimento)	16/20	19/20

A Tabela 5 resume os resultados obtidos na diluição 10^{-4} . Apenas a **técnica 1** obteve uma maior sensibilidade no meio de Middlebrook 7H11 modificado, das placas aos 14 dias de leitura, embora tenha tido uma maior proporção de cultivos positivos no meio de Stonebrink (dos tubos).

Tabela 5 – Proporções de cultivos com crescimento de micobactérias, segundo a técnica de processamento, o cultivo adotado (placas e tubos) e o momento de leitura na diluição 10^{-4} do inóculo. São Paulo, 2005

Técnica	Placas	Tubos
	Dias pós-semeadura	
	14°	42°
Petroff	2/20	14/20
Técnica 1 (gordura)	9/20	17/20
Técnica 2 (sedimento)	4/20	13/20

A Tabela 6 resume os resultados obtidos na diluição 10^{-5} . Nesta diluição, diferentemente das anteriores a **técnica 2** forneceu maior proporção de cultivos positivos no meio de Middlebrook 7H11 modificado (das placas) aos 14 dias de leitura, embora a **técnica 1** tenha fornecido o mesmo número de tubos positivos.

Tabela 6 – Proporções de cultivos com crescimento de micobactéria, segundo a técnica de processamento, o cultivo adotado (placas e tubos) e o momento de leitura na diluição 10^{-5} do inóculo. São Paulo, 2005

Técnica	Placas	Tubos
	Dias pós-semeadura	
	14°	42°
Petroff tradicional	0/20	5/20
Técnica 1 (gordura)	2/20	10/20
Técnica 2 (sedimento)	4/20	10/20

O leite total inoculado submetido à técnica tradicional de Petroff forneceu as menores proporções de cultivos positivos no meio de Middlebrook 7H11 modificado (placas) sendo superior apenas à **técnica 2** no meio de Stonebrink (tubos) na diluição 10^{-4} . A **técnica 1** forneceu as maiores proporções de cultivos positivos no meio de Middlebrook 7H11 modificado e no meio de Stonebrink, com exceção da diluição 10^{-5} .

5 DISCUSSÃO

Os aspectos relacionados a cada etapa do experimento foram discutidos separadamente para melhor análise dos resultados.

5.1 PRIMEIRA ETAPA

Na primeira etapa, foi padronizada a diluição do inóculo a ser utilizado em todo o experimento. O padrão 10^{-2} serviu para determinar a intensidade de crescimento das micobactérias provenientes de um inóculo suficientemente diluído para produzir colônias individuais nas placas, facilitando a leitura das U.F.C.

Assim como foi observado por Marcondes (2002), utilizando a estirpe AN5 de *M. bovis*, das diluições feitas a partir da suspensão bacteriana inicial preconizada por Pinheiro (1992), a que apresentou melhores resultados foi a de 1:100, ou seja, 0,0006 g/% de colônias (peso úmido) com 32 dias de crescimento raspados da superfície do meio de cultivo. Uma suspensão bacteriana muito concentrada poderia trazer problemas para a individualização e contagem das U.F.C. com poucos dias de cultivo.

A escolha do *Mycobacterium 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 de testes de

desinfetantes, antes de usar a estirpe patogênica *M. bovis*, 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).

Outros fatores determinaram a escolha do *M. fortuitum* como cepa teste desta primeira etapa: além de poder causar doença no homem e nos animais (GRANGE, 1980), ela já foi considerada a micobactéria de crescimento rápido mais comumente associada com mastite, tendo sido identificada como causadora de mastite por Wetzstein e Greenfield (1992), em dezessete casos.

Dunn e Hodgson (1982) encontraram micobactérias atípicas em 45, das 103 amostras de leite cru, provenientes de tanques de armazenamento e tanques transportadores, alguma descritas como potentes patógenos para o homem, como o *M. fortuitum*, demonstrando a importância de aprimorar os métodos de cultivo de micobactérias para a prevenção de doenças na população.

Pardo et al. (2001), observaram *Mycobacterium* spp no leite de 19 (36,54%) das 52 vacas estudadas, sendo classificadas por cromatografia de camada delgada, tempo e temperatura de crescimento, características e aspectos das colônias em *M. avium* (5,26%), *M. fortuitum* (10,52%), *M. bovis* (5,26%) e *Mycobacterium* spp (78,95%).

O meio de Middlebrook 7H10, que é um meio ágar transparente, foi desenvolvido por Middlebrook e Cohn (1958). Na época os autores descreveram igual sensibilidade do Middlebrook 7H10 *versus* Löwenstein–Jensen quando comparados os números de culturas positivas das amostras semeadas.

Sommers e Russell (1967) já relatavam as vantagens de se utilizar meios de cultura “ágar transparentes” no primo isolamento de micobactérias pois os bacilos poderiam ser visualizados, em média, dentro de 10 a 14 dias pós semeadura e drogas poderiam ser adicionadas em concentrações exatas pois o meio não sofre a ação da temperatura para ficar solidificado.

O *M. fortuitum* cresceu em todas as placas semeadas e pode ser visualizado microscopicamente com apenas três dias e macroscopicamente, com cinco dias no meio de Middlebrook 7H10. Não foi observada contaminação nesta etapa.

A utilização do meio de Middlebrook 7H10, formando uma monocamada em placa, possibilitou a visualização precoce das U.F.C. vantagem esta, descrita por Reed (1953) que atribuía à técnica de monocamada a precocidade de um diagnóstico positivo. Pagel et al. (1964) relataram dificuldades de se obter culturas positivas nesta técnica, quando o material contém poucos microrganismos, entretanto, a principal desvantagem desta técnica se baseia no fato de se disponibilizar pouco material para futuras caracterizações bioquímicas. Marcondes (2002) trabalhando com placas de Petri de vidro, observou uma viabilidade de apenas duas semanas no meio de Middlebrook 7H11, diferentemente do observado neste experimento onde foram utilizadas placas descartáveis que permitiram um melhor encaixe entre as partes superior e inferior e conseqüentemente uma melhor proteção do meio, evitando seu ressecamento e permitindo que a leitura fosse realizada por três semanas.

Na etapa seguinte houve a necessidade de se trabalhar com o Middlebrook 7H11 para se obter o crescimento do *M. bovis* que é exigente com relação aos meios de cultura e necessita de um certo ambiente de microaerofilia para seu primo isolamento (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1985). O 7H10 difere do 7H11 somente por este último conter 0,1% do hidrolisado de caseína, um aditivo que melhora a velocidade e o rendimento de crescimento das micobactérias resistentes à isoniazida (INH) (KONEMAN et al., 2001)

O crescimento do *M. fortuitum* no meio de Middlebrook 7H10 sem a necessidade de adição do enriquecimento (OADC) e da manutenção das placas num ambiente de microaerofilia, diminuiu os custos e a contaminação que pode ser atribuída tanto ao enriquecimento

propriamente dito, como à umidade formada dentro das caixas plásticas mantidas na estufa, em consequência do ambiente necessário para a manutenção da microaerofilia.

5.2 SEGUNDA ETAPA

Para avaliar e comparar as duas metodologias empregadas (**técnica 1 e 2**) quanto à sensibilidade, frente à técnica tradicional de Petroff, nos dois diferentes meios de cultura, utilizou-se o *M. bovis* estirpe AN5 preparado na diluição 1:100, padronizada na primeira etapa experimental.

O *M. bovis* cresceu tanto nos meios de Middlebrook 7H11 modificado quanto no meio de Stonebrink. A grande maioria das placas apresentou crescimento no 11º ou 14º dia de leitura, para 28 dias apresentados pela maioria dos tubos (Tabela 1).

Nesta etapa foi observado que o crescimento exuberante da *M. bovis* impedia a individualização das U.F.C. e dificultava a contagem a partir da segunda semana, fato este que fez com que, a partir da terceira etapa do experimento a contagem fosse realizada até a segunda semana (14 dias p.s.).

Os tubos semeados com *M. bovis*, apresentaram colônias visíveis já a partir do 21º dia de cultivo mas, a grande maioria foi a partir do 28º dia (Tabela 1), sendo que Koneman et al. (2001) citou o tempo médio para o crescimento de amostras de campo como sendo de 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.

O *M. bovis* (estirpe AN5) cresceu nas placas de Middlebrook 7H11 semeadas. Isto poderia ser explicado pelo fato desta estirpe padrão já estar adaptada a meios de cultura (ABRAHÃO, 1998), embora fosse a primeira vez que tivesse sido semeada em meio de Middlebrook 7H11 modificado e que continha glicerol ao invés de piruvato de sódio. A pequena quantidade de glicerol (0,5%) no meio de Middlebrook (UNIVERSIDAD DE LAS NACIONES UNIDAS, 1998) e a tolerância do *M. bovis* AN5 a esta fonte de carbono (CORNER; NICOLAPOULOS, 1988) também podem ter contribuído para esse resultado.

Os meios de Middlebrook permitem a detecção precoce do crescimento, ou seja, após 10 a 12 dias, em vez dos 18 a 24 dias de incubação requeridos em outros meios. Em parte, isso se deve à inclusão de biotina e catalase para estimular o restabelecimento de bacilos danificados nas amostras clínicas. A albumina é adicionada, também, para fixar quantidades tóxicas de oleato ou outros compostos que poderiam ser liberados a partir da hidrólise espontânea do Tween 80. A albumina não parece ser metabolizada pelo bacilo (KONEMAN et al., 2001).

A visualização das U.F.C. das estirpes de *M. bovis* foi facilitada nas placas quando comparadas à visualização nos tubos. Vale a pena salientar que o meio de Middlebrook 7H11 modificado, por ser transparente, permite a observação das placas ao microscópio, possibilitando a visualização das colônias mais precocemente. A precocidade de detecção de colônias de *M. bovis* no meio de Middlebrook 7H11 no primeiro isolamento, foi observada por Cousins et al. (1989), avaliando 5 meios diferentes (B83, Middlebrook 7H11, 2 variações do meio de Stonebrink e o meio de Löwenstein-Jensen). O meio de Middlebrook 7H11 obteve a taxa de crescimento mais precoce embora tenha obtido o menor número de colônias isoladas.

Corner e 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 dias de crescimento 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. Convém ressaltar que as leituras das placas com Middlebrook não foram feitas ao microscópio, mas sim a olho nu.

A precocidade para o aparecimento das primeiras U.F.C foi observada principalmente nas placas semeadas com a **técnica 2**. Devido ao processo de homogeneização das amostras com 1 mL de Tween 80, seguida de utilização do aparelho tipo Vortex, 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, 1985).

A importância da força centrífuga na recuperação de micobactérias pode ser devida ao alto conteúdo de lipídios de sua parede celular (até 20% 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).

Kantor, em 1976, trabalhando com amostras de sedimentos de centrifugação industrial de leite cru, provenientes de rebanhos controlados pela prova tuberculínica, encontrou 62 estirpes de micobactérias identificadas por provas bioquímicas, entre elas, duas identificadas como *M. bovis*.

Hosty e Durmont (1974) utilizaram o sedimento das amostras de leite cru obtidas de 28 plantas produtoras de leite, e isolaram 64 estirpes 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 por muitos pesquisadores, conforme descrito anteriormente. 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* (estirpe BCG). O organismo foi isolado do sedimento, mas não foi observado o seu desenvolvimento em amostras de fase aquosa e nem na gordura.

O processo de homogeneização seguida de centrifugação das amostras com posterior eliminação do sobrenadante permitiu uma melhor eliminação dos debrís celulares e exposição das micobactérias ao meio, levando a uma maior taxa de crescimento e, portanto, uma visualização mais nítida do que foi observado por Marcondes (2002) que trabalhou com fragmentos de tecido enviados ao laboratório para isolamento e identificação das micobactérias.

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 conforme o mostrado na Figura 3; com a técnica tradicional de Petroff, a grande quantidade de debrís celulares e de moléculas de gordura tornou difícil a visualização das micobactérias (Figura 2) e pela **técnica 2**, quase não se observou a presença de debrís (Figura 4).

Marcondes (2002), utilizando a técnica de monocamada e o meio de Middlebrook 7H11 teve dificuldade de observação das colônias em crescimento em meio a debrís celulares e restos tissulares, provenientes do processo de descontaminação, ressaltando a necessidade de uma filtração mais eficiente das amostras depois de macerada a fim de diminuir esses artifícios de técnica.

Em relação à média de colônias obtidas em cada metodologia, a **técnica 2** forneceu as maiores médias de U.F.C em todos os dias de leitura (Tabela 2). 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 debris celulares, homogeneização e a importância da submissão à força centrífuga). A média geral de crescimento nas três metodologias tendeu a estabilizar-se nos últimos dias de leitura onde a diferença estatística entre as medianas de crescimento não foi significativa.

A metodologia empregada para a contagem das colônias foi diferente da empregada por Marcondes (2002), devido à dificuldade em visualizar as colônias na região central do meio de cultura, e a maior proximidade com o número real de colônias crescidas na placa, obtida devido a contagem de um maior número de campos microscópicos.

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, e não encontrando diferença estatística em nenhum dos casos.

Uma grande porcentagem de placas desta etapa apresentou contaminação, entretanto, o que pode ser observado microscopicamente é que a contaminação do meio de cultura não pareceu interferir com o crescimento das micobactérias, uma vez que foi possível visualizar a contaminação sobreposta a colônia e acompanhar seu crescimento, embora tenham sido consideradas como contaminadas e não tenham sido contabilizadas para fins de quantificação.

Na maioria das placas as contaminações ocorreram nas bordas do meio de cultura, não interferindo com a visualização e a contagem das colônias. Este padrão de contaminação pode ser explicado com o acúmulo de gotículas de água formadas no calor da estufa.

Embora esta contaminação tenha ocorrido com suspensão bacteriana pura de micobactérias, obtida posteriormente ao processo de descontaminação de Petroff e teoricamente livre de qualquer outro agente, a sensibilidade do meio e falhas na manipulação das placas favoreceram a contaminação. A presença de 0,0025% de verde de malaquita no meio de Middlebrook 7H11 modificado como agente inibidor de contaminações não foi suficiente para impedir a contaminação justificando, nos laboratórios que trabalham com esse meio, a prática corrente da adição de antibióticos (KONEMAN et al., 1993; MEJIA et al., 1999; UNIVERSIDAD DE LAS NACIONES UNIDAS, 1998).

Esta diferença poderia ser explicada em função de que o inóculo utilizado na segunda etapa foi o leite, ao invés da solução salina utilizada na primeira etapa, e, por se tratar de um inóculo muito rico em nutrientes e ter sofrido maior manipulação, poderia se contaminar com mais facilidade. Mas esta hipótese pode ser parcialmente aceita já que todas as amostras passaram pelo processo de descontaminação de Petroff, e que este mesmo padrão de contaminação não foi observado nos tubos contendo meio de Stonebrink.

A contaminação dos tubos foi controlada com o início da esterilização por meio da autoclave das rolhas empregadas no processo de microaerofilia. A ausência de contaminação nos tubos, uma vez que a suspensão bacteriana foi a mesma utilizada nas placas, provavelmente se deve à maior concentração de verde de malaquita neste meio (0,25%) e a uma melhor manipulação dos tubos.

5.3 TERCEIRA ETAPA

A importância de se utilizar 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 de leite. Diante desta premissa, esta etapa teve por objetivo, verificar a sensibilidade das técnicas de processamento utilizadas na etapa anterior frente às diferentes diluições da suspensão de microrganismos, e compará-las quanto à positividade nos meios de Stonebrink e Middlebrook 7H11 modificado.

O número de dias de para o estabelecimento do diagnóstico nesta etapa do trabalho foi diminuído para 14 dias pós-semeadura, já que a partir do 14º dia foi possível observar crescimento macroscópico das colônias, e um dos objetivos do trabalho era justamente diminuir o tempo para o diagnóstico. Em relação aos tubos contendo meio de Stonebrink, em se tratando da mesma estirpe, este tempo foi diminuído para 42 dias dos 60 dias exigidos pelas normas laboratoriais (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1985); pode ser observado na segunda etapa, que o crescimento das colônias foi atingido em quase todos os tubos até o 35º dia p. s. (Tabela 1)

A diluição 10^{-3} da técnica tradicional de Petroff, apresentou positividade, embora em um pequeno número de placas (30%) (Tabela 3). Como foi demonstrado anteriormente, esta técnica apresentou um crescimento mais lento e um menor número de colônias recuperadas frente às **técnicas 1 e 2**, fato este que somado a técnica de quantificação empregada, onde são visualizados apenas dez campos microscópicos, podem ter influído 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); Corner e Nicolacopoulos (1988), de que o método de Middlebrook 7H11 modificado deve ser utilizado simultaneamente com os métodos tradicionais de cultivo.

A **técnica 1** resultou numa grande positividade de placas na diluição 10^{-3} , diminuindo gradualmente de 45% de positividade na diluição 10^{-4} para apenas 10% de placas positivas na diluição 10^{-5} (Tabela 3). A maior parte das placas já havia apresentado crescimento a partir do 11º dia de diluição, conforme pode ser visualizado no Apêndices Q, S demonstrando maior sensibilidade e precocidade em relação à técnica tradicional de Petroff (Apêndices K, M). Este resultado gradual também pode ser observado nos tubos contendo meio de Stonebrink onde, a positividade foi de 100% na diluição 10^{-3} , 85% na diluição 10^{-4} e 50% na diluição 10^{-5} , confirmando a superioridade da **técnica 1** frente à técnica de Petroff nos dois meios empregados e em todas as diluições utilizadas, o que já havia sido demonstrado na segunda etapa deste experimento.

A **técnica 2**, que obteve os melhores resultados em número de dias para o aparecimento das primeiras colônias e número de colônias recuperadas na segunda etapa deste experimento, não apresentou o mesmo padrão de resultados nesta etapa, tendo obtido 80% de placas positivas na diluição 10^{-3} e apenas 20% nas diluições 10^{-4} e 10^{-5} (Tabela 3). Ainda assim a maior parte do total de placas positivas desta etapa, apresentou crescimento de colônias já aos 11 dias de leitura (Apêndices W e Aa), confirmando novamente a precocidade desta técnica em relação à técnica tradicional de Petroff.

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 limitando-se o número de campos microscópicos e o espaço necessários 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 e Nicolacopoulos (1988) realizam a contagem macroscópica das colônias e mesmo desta maneira ainda conseguem 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.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos e analisados, segundo a metodologia empregada, possibilitaram as seguintes conclusões:

1. A técnica de cultivo de micobactérias em camada delgada no meio de Middlebrook 7H11, em amostras de leite experimentalmente inoculado, empregando a estirpe padrão *Mycobacterium bovis* (AN5) se mostrou viável quando comparada às técnicas tradicionais.
2. A técnica de camada delgada em placas permitiu a visualização precoce das micobactérias quando comparadas ao meio de Stonebrink.
3. As **técnica 1 e 2** mostraram maior recuperação de micobactérias em U.F.C. no meio de camada delgada, na diluição 10^{-2} , e maior proporção de cultivos positivos em todas as demais diluições.
4. A técnica de camada delgada em meio de Middlebrook 7H11 modificado pode ser utilizada como uma técnica complementar aos métodos tradicionais de diagnóstico da tuberculose bovina em amostras de leite para fins de vigilância epidemiológica.

REFERÊNCIAS*

ABRAHÃO, R. M. C. M. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. 1998. 273 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Tuberculosis zoonotica. In: _____. **Zoonosis transmissibles comuns al hombre y a los animales**. Washington: Organizacion Panamericana de la Salud, 2001.

ANTUNES, J.L.F.; MORAES, M.; BIAZEVIC, M.G.H.; WALDMAN, E.A.; CORRÊA, M.O.A. Tuberculose e leite: elementos para a história de uma polêmica. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, v. 9, n. 3, p. 609-623, 2002.

APPAJI RAO, V.N.; RAJARAMAN, E.D.; MANICKAM, R. Tuberculosis in calves. **Indian Veterinary Journal**, v. 72, n. 5, p. 523-525, 1995.

BESSER, R.E.; PAKIZ, B.; SCHULTE, J.M.; ALVARADO, S.; ZELL, E.R.; KENYON, T.A.; ONORATO, I.M. Risk factors for positive Mantoux tuberculin skin tests in children in San Diego, California: evidence for boosting and possible foodborne transmission. **Pediatrics**, v. 108, n. 2, 2001. Disponível em: <<http://www.pediatrics.org/cgi/content/full/108/2/305>>. Acesso em: 08 out. 2001.

BONSU, O.A.; LAING, E.; AKANMORI, B.D. Prevalence of tuberculosis in cattle in the Dangme-West district of Ghana, public health implications. **Acta Tropica**, v. 76, n. 1, p. 9-14, 2000.

BRANDÃO, S.C.C. Leite: legislação, responsabilidade e saúde pública. **Balde Branco**, v. 30, n. 360, p. 68-71, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa n. 2, 10 de janeiro de 2001. Regulamento técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 jan. 2001. p. 11-17.

* Conforme as diretrizes para apresentação de dissertações e teses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4. ed. São Paulo: FMVZ-USP. 2003. 84 p.

CAFFREY, J.P. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 1-4, 1994.

CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. **Bacteriología de la tuberculosis humana y animal**. Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud, 1979. 63 p. (Series de Monografías Científicas y Técnicas).

CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. **Guide for tuberculosis projects**. Buenos Aires: Pan American Health Organization, 1989. 45 p.

COLLINS, C. H.; GRANGE, J. M. The bovine tubercle bacillus. **Journal of Applied Bacteriology**, v.55, n. 1, p. 13-29, 1983.

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

CORRÊA, O. Tuberculose. In: _____. **Doenças infecciosas dos animais domésticos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1975, p. 20-69.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. Infecções por micobactérias. In: _____. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Medsi, 1992, p. 261-275.

CORTÊS, J. A. Vigilância Epidemiológica. In: _____. **Epidemiologia. Conceitos e princípios fundamentais**. São Paulo: Livraria Varela, 1993. p. 139-142.

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

COUSINS, D.V.; FRANCIS, B.R.; CASEY, R.; MAYBERRY, C. *Mycobacterium bovis* infection in a goat. **Australian Veterinary Journal**, v. 70, n. 7, p. 262-263, 1993.

DABORN, C.J.; GRANGE, J.M. Hiv/Aids and its implications for the control of animal tuberculosis, **British Veterinary Journal**, v. 149, n. 5, p. 405-417, 1993.

DHINAKARAN, M.; NEDUNCHELLIYAN, S.; APPAJIRAO, V.N. Effects on certain economic traits in cattle due to tuberculosis. **Indian Veterinary Journal**, v. 70, n. 11, p. 1143-1145, 1993.

DUNN, B.L.; HODGSON, D.J. "Atypical" mycobacterial in milk. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 52, n. 3, p. 373-376.

EVANGELISTA, T.B.R.; DE ANDA, J.H. Tuberculosis in dairy calves: risk of *Mycobacterium* spp. exposure associated with management of colostrum and milk. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 27, n. 1-2, p. 23-27, 1996.

ESSEY, M.A.; KOLLER, M.A.; Status of bovine tuberculosis in North America. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 15-22, 1994.

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

FREITAS, J.A.; PANETTA, J.C.; CURCIO, M.; UEKI, S.Y.M. Isolamento de cepas de *Mycobacterium avium* em búfalos abatidos para consumo. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 3, p. 315-317, 2001.

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

GRANGE, J.M. The species of mycobacteria. In: _____. **Mycobacterial diseases**. 1. ed. New York: Elsevier, 1980, p. 20-55.

GRANGE, J.M.; COLLINS, J.D.; O' RELLY, L.M.; COSTELLO, E.; YATES, M.D. Identification and characteristics of *Mycobacterium bovis* isolated from cattle, badgers and deer in the Republic of Ireland. **Irish Veterinary Journal**, v. 43, n. 2, p. 33-35, 1990.

GRANGE, J.M.; YATES, M.D. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 137-151, 1994.

GRANT, I.R.; BALL, H.J.; ROWE, M.T. Thermal inactivation of several *Mycobacterium* spp. In milk by pasteurization. **Letters in Applied Microbiology**, v. 22, p. 253-256, 1996.

HADDAD, N.; MASSELOT, M.; DURAND, B. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. **Research in Veterinary Science**, v. 76, n. 1, p. 1-18, 2004.

HERNADEZ, J.; BACA, D. Effect of tuberculosis on milk production in dairy cows. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 6, p. 851-854, 1998.

HOSTY, S.H.; McDURMONT, C.I. Isolation of acid-fast organisms from milk and oysters. **Health Laboratory Science**, v. 12, p. 16-9, 1975.

KANTOR, I.N. Micobacterias aisladas de muestras de leche en Buenos aires, Argentina. **Revista Argentina de Tuberculosis y Enfermedades Pulmonares**, v. 37, n. 1-4, p. 57-59, 1976.

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

KEET, D.F.; KRIEK, N.P.J.; HUCHZERMEYER, H.; BENGIS, R.G. Advanced tuberculosis in an african buffalo (*Syncerus caffer sparrman*). **South African Veterinary Association**, v. 65, n. 2, p. 79-83, 1994.

KELLS, H.R.; LEAR, S.A. Thermal death time curve of *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* in artificially infected milk. **Applied Microbiology**, v. 8, p. 234-236, 1960.

KOEHNE, G.; MADDUX, B.S.; BRITT, J. Rapidly growing mycobacteria associated with bovine mastitis. **American Journal Veterinary Research**, v. 42, n. 7, p. 1238-1239, 1981.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; LANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JUNIOR, W.C. Micobactérias. In _____. **Diagnóstico microbiológico. Texto e atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Medsi, 2001, p. 903-963.

LAKE, R.; HUDSON, A.; CRESEY, P. Risk profile: *Mycobacterium bovis* in milk. Institute of Environmental Science & Research Limited. Christchurch: 2002. 25 p.

LANGENEGGER, J.; LANGENEGGER, C.H.; MOTA, P.M.P.C.; LEITE, R.C. Reações inespecíficas no diagnóstico alérgico da tuberculose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 1, n. 4, p. 145-149, 1981.

LEÃO, S.C. Panorama atual da tuberculose no homem. **Biológico**, São Paulo, v. 61, n. 2, p. 135-141, 1999.

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

LERCHE, M. **Inspeccion Veterinária de la leche**: Obtención Higiénica de la leche. Zaragoza: Editora Acribia, 1969. 375 p.

MARCONDES, A.G., **Padronização da técnica de cultivo em camada delgada de Agar Middlebrook 7H11 para isolamento de *Mycobacterium bovis***. 2002. 115 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MCKAY, W.M. Bovine tuberculous mastitis. **Veterinary Record**, v. 58, n. 3, p. 563-567, 1941.

MIDDLEBROOK, G.; COHN, M.L.; Bacteriology of tuberculosis laboratory methods. **American Journal of Public Health**, v. 48, n. 7, p. 844, 1958.

MILLER, M.A.; PAIGE, J.C. Other food borne infections. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 14, n. 1, p. 71-89, 1998.

MODA, G.; DABORN, C.J.; GRANGE, J.M.; COSIVI, O. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. **Tubercle and Lung Disease**, v. 77, n. 1, p. 103-108, 1996.

MONAGHAN, M.L.; DOHERTY, M.L.; COLLINS, J.D.; KAZDA, J.F.; QUINN, P.J: The tuberculin test. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 111-124.

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

MORRIS, R.S.; PFEIFFER, D.U.; JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 153-177, 1994.

NEILL, S.D.; CASSIDY, J.; HANNA, J.; MACKIE, D.P.; POLLOCK, J.M.; CLEMENTS, A.; WALTON, E.; BRYSON, D.G. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. **Veterinary Record**, v. 135, n. 6, p. 134-135, 1994.

NEILL, S.D.; HANNA, J.; O' BRIEN, J.J.; MCCRACKEN, R.M. Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. **Veterinary Record**, v. 123, n. 13, p. 340-343, 1988.

NEILL, S.D.; POLLOCK, J.M.; BRYSON, D.B.; HANNA, J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 41-52, 1994.

O' RELLY, L.M.; DABORN, C.J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and men: a review. **Tubercle and Lung Disease**, v. 76, p. 1-46, 1995. Supplement 1.

PARDO, R.B.; LANGONI, H.; MENDONÇA, L.J.P.; CHI, K.D. Isolation of *Mycobacterium* spp. do leite de vacas suspeitas e positivas para tuberculose. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 284-287, 2001

PEREIRA, M.G. Vigilância Epidemiológica. In:_____. **Epidemiologia, teoria e prática**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 2002. p. 449-482.

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. **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**. 91 f., v. 42. Tese (Livre Docência) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

PINHEIRO, S.R. Controle da tuberculose bovina versus tratamento. **Biológico**, v. 61, n. 2, p. 139-142, 1999.

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.; CÔRTEZ, 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**, v. 64, n. 1, p. 11-22, 1997.

PRITCHARD, D.G. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. **Journal of Comparative Pathology**, v. 99, n. 4, p. 357-396, 1988.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. In: _____. **Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. London: W. B. Saunders, 2000. p. 909-917.

REED, R. W. Slide culture of tubercle bacilli. **Canadian Journal of Medicine Science**, v. 31, n. 5, p. 367-376, 1953.

ROXO, E. **Avaliação da resposta imunoalérgica cutânea à tuberculina em bubalinos (*Bubalus bubalis*)**. 1996. 55 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

ROXO, E. Importância da medicina veterinária nos programas de combate à tuberculose. **Biológico**, v. 61, n. 2, p. 143-144, 1999.

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.

SMOSKÖVI, 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.

TEIXEIRA, M. G.; RISI JUNIOR, J. B. Vigilância Epidemiológica. In: ROUQUAYROL, M. Z.; ALMEIDA FILHO, N. **Epidemiologia e Saúde**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1999. p. 301-317.

TORRANCE, H. L. The paths of infection in udder tuberculosis. **Veterinary Record**, v. 49, n. 5, p. 1441-1445, 1937.

TWEDDLE, N. E.; LIVINGSTONE, P.; Bovine tuberculosis control e eradication programs in Australia and New Zealand. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 23-39, 1994.

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

VAN DEN HEEVER, L. W. Tuberculosis in milch goats. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 55, n. 4, p. 219-220, 1984.

VITALE, F.; CAPRA, G.; MAXIA, L.; REALE, S.; VESCO, G.; CARACAPPA, S.; Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in cattle by PCR using, lymph node aspirates, and nasal swabs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 1050-1055, 1998.

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/VPH/84.4 1984. 49 p.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Handistatus for bovine tuberculosis**. 2005. Disponível em <http://www.oie.int/hs2/report.asp?lang=en>> Acesso em: 03 set 2005.

ZOONOTIC tuberculosis (*Mycobacterium bovis*): Memorandum from a WHO meeting with the participation of FAO. **Bulletin of World Health Organization**, v. 72, p. 851-857, 1994.

APÊNDICE A – Método de preparo do meio de Stonebrink

Base de sais

Fosfato monopotássico (KH_2PO_4).....	3,5 g
Fosfato dissódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....	2,0 g
Piruvato de sódio.....	6,25 g
Água destilada q.s.p.	500 mL

OBS: caso se utilize fosfato dissódico com 12 moléculas de H_2O , utilizar 4,0 g. se for o fosfato dissódico anidro, utilizar 1,59 g.

Conteúdo de \approx 20 ovos (suspensão).....	1000 mL
Solução aquosa de verde de malaquita a 2%.....	20 mL

Dissolver os sais na água destilada e autoclavar a 121°C por 15 minutos. Aguardar esfriar a base e acrescentar os ovos e o verde de malaquita. Homogeneizar em agitador magnético por uma hora. Filtrar em gaze estéril (dobrada em 4) e distribuir nos tubos. Coagular¹ a 80°C por 30 minutos.

¹Coaguladora vertical ELETROLAB – Câmara climática

APÊNDICE B – Método de preparo do Meio de Middlebrook 7H11 modificado

Middlebrook 7H10 ágar.....	18,0 g
Hidrolizado de caseína (digestão pancreática de caseína).....	1,0 g
Glicerol (glicerina).....	5 mL
Água destilada.....	900 mL
Enriquecimento OADC ²	100 mL

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

OBS:

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

² BBLtm – Middlebrook OADC Enrichment – Becton Dickson Microbiology Systems – Sparks, MD 21152

APÊNDICE C – Método de preparo do meio de Middlebrook 7H10

Middlebrook 7 H10 ágar.....	19,0 g
Glicerol (glicerina).....	5 mL
Água destilada.....	1000 mL

Misturar no Erlenmeyer o agar e o glicerol. Acrescentar a água destilada pelas paredes para evitar a formação de espuma. Depois de tudo misturado, agitar lentamente para que o glicerol se misture com a solução. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Distribuir em placas e após a solidificação proceder aos testes de esterilidade por no mínimo 48 horas.

OBS:

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

APÊNDICE D – Preparo do ambiente de microaerofilia para incubação das placas com meio

Middlebrook 7H11 modificado

Preparo da solução de sulfato de cobre

CuSO ₄ 5H ₂ O.....	25 g
H ₂ O (destilada).....	500 mL
H ₂ SO ₄ (PA).....	1,6 mL
Tween 80 ⁴	1,0 mL

Depois de secas e vedadas, as placas são colocadas nas caixas tipo “tuperware” com a tampa para baixo. Em um dos cantos da caixa é colocada uma placa de Petri vazia (aberta) contendo um chumaço de palha de aço comum (Bombril[®]) e no outro canto outra placa vazia contendo uma pastilha de antiácido efervescente Alka Seltzer⁵. Em seguida, a palha de aço é molhada com 5 ml da solução de sulfato de cobre. A caixa então deve ser lacrada rapidamente com a película plástica⁶ para evitar a entrada de ar.

⁴DIFCO

⁵Alka Seltzer: Bayer do Brasil S. A.

⁶Parafilm M: American National CanTM – Chicago, IL 60631

APÊNDICE E – Resultado da contagem de U.F.C. das placas semeadas pelo método de Petroff segundo a repetição, a placa e os dias de leitura. São Paulo, 2005.

Repetição	Placa	Leitura (dias pós-semeadura)					
		4°	7°	11°	14°	17°	21°
1	1	C	C	C	C	C	C
	2	0	0	0	0	0,4	1,5
2	1	0	0	0,1	0,1	0,2	0,6
	2	0	0	0,1	0,2	0,3	0,9
3	1	0	0	0	0,3	0,4	0,7
	2	0	0	0,2	0,5	0,9	1,6
4	1	0	0	0	0	0,3	0,4
	2	0	0	0	0	0,1	0,2
5	1	0	0	0	0	0	0,7
	2	0	0	0,2	0,3	0,3	0,3
6	1	0	0	0	0	0,4	0,4
	2	0	0	0	0	0,7	0,7
7	1	0	0	0,2	0,2	0,2	0,2
	2	0	0	0,2	0,3	0,8	0,8
8	1	0	0	0,5	0,8	1,2	2,5
	2	0	0	0,3	0,8	1,6	2,1
9	1	0	0	0,3	0,7	1,2	1,7
	2	0	0	0,7	0,9	1,6	2,5
10	1	0	0	0,1	0,3	1,2	1,9
	2	0	0	0	0,1	1,1	1,6
11	1	0	0	0	0,3	1,1	1,6
	2	0	0	0	0	0,6	1,4
12	1	0	0	0	0,2	1,2	2,2
	2	0	0	0,1	0,2	1,3	2,2
13	1	0	0	1	1	3,8	4,1
	2	0	0	0,5	0,5	1,8	2,7
14	1	0	0	0,5	0,6	0,9	1,2
	2	0	0	0,5	0,5	1	1,8
15	1	0	0	0	0,3	0,6	0,9
	2	0	0	0,2	0,2	1	1,5

Repetição	Placa	Leitura (dias pós-semeadura)					
		4°	7°	11°	14°	17°	21°
16	1	0	0	0,6	0,9	2	2,6
	2	0	0	0,5	0,7	1,9	2,3
17	1	0	0	0	0,2	0,5	0,5
	2	0	0	0,1	0,3	0,9	1,1
18	1	0	0	0	0,5	1,4	1,7
	2	0	0	0	0,7	1,4	2
19	1	0	0	0	0,4	0,7	1
	2	0	0	0,1	0,3	0,9	1,1
20	1	0	0	0	1,1	1,4	2,2
	2	0	0	0	1	2,4	3,1
21	1	0	0	0	0,8	1,8	1,9
	2	0	0	0	0,7	1	1,8
22	1	0	0	0	0	0,8	1,5
	2	0	0	0	0,5	1,1	1,5
23	1	0	0	0	0,2	0,4	0,6
	2	0	0	0	0,7	1,3	2,7
24	1	0	0	0	0,4	0,6	1,7
	2	0	0	0	0,4	0,4	0,9
25	1	0	0	0	1	1,6	1,8
	2	0	0	0	0,5	0,5	0,6
26	1	0	0	0	0,7	0,9	1,6
	2	0	0	0	0,4	0,8	1
27	1	0	0	0	0,8	1,4	1,8
	2	0	0	0	0,6	0,6	1,3
28	1	0	0	0	0,4	0,8	1,7
	2	0	0	0	0,6	1,2	1,7
29	1	0	0	0,7	0,7	1,4	1,4
	2	0	0	0,4	0,9	1,1	1,2
30	1	0	0	0,7	0,9	1,1	1,2
	2	0	0	0,4	0,9	1,1	1,2

APÊNDICE F– Resultado da quantificação de U.F.C. dos tubos semeados pelo método de Petroff segundo a repetição, o tubo e os dias de leitura. São Paulo, 2005.

Repetição	Tubo	Leitura (dias pós-semeadura)					
		7°	14°	21°	28°	35°	42°
1	1	C	C	C	C	C	C
	2	0	0	0	2	3	3
2	1	0	0	0	2	3	3
	2	0	0	0	3	3	3
3	1	0	0	0	2	2	2
	2	0	0	0	1	2	2
4	1	0	0	0	2	4	4
	2	0	0	0	2	3	3
5	1	0	0	0	2	2	3
	2	0	0	0	3	3	3
6	1	0	0	0	2	3	3
	2	0	0	0	3	3	4
7	1	0	0	0	2	4	4
	2	0	0	0	3	4	4
8	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
9	1	0	0	0	0	1	3
	2	0	0	0	0	1	2
10	1	0	0	0	1	2	3
	2	0	0	0	0	2	3
11	1	0	0	0	1	3	3
	2	0	0	0	1	2	3
12	1	0	0	1	1	3	3
	2	0	0	0	1	3	3
13	1	0	0	0	1	2	2
	2	0	0	0	1	2	2
14	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	1	3	3
15	1	0	0	0	1	2	2
	2	0	0	0	1	2	2

Repetição	Tubo	Leitura (dias pós-semeadura)					
		7°	14°	21°	28°	35°	42°
16	1	0	0	0	1	2	3
	2	0	0	0	1	2	3
17	1	0	0	0	1	2	2
	2	0	0	0	1	1	2
18	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
19	1	0	0	0	1	1	2
	2	0	0	0	1	1	2
20	1	0	0	1	1	1	2
	2	0	0	0	0	1	2
21	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	1	1	1
22	1	0	0	1	1	1	1
	2	0	0	1	1	1	1
23	1	0	0	1	1	1	1
	2	0	0	0	1	1	1
24	1	0	0	0	1	2	2
	2	0	0	0	1	2	2
25	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	1	1	1	1
26	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	1	1	1
27	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
28	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
29	1	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	0	0	1	2
30	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	0	1	1

APÊNDICE G– Resultado da contagem de U.F.C. das placas semeadas pela **técnica 1** (gordura) segundo a repetição, a placa e os dias de leitura. São Paulo, 2005.

Repetição	Placa	Leitura (dias pós-semeadura)					
		4°	7°	11°	14°	17°	21°
1	1	0	0	0	0	0,4	0,6
	2	0	0	0,2	0,2	0,3	0,4
2	1	0	0	0	0	0,6	0,6
	2	0	0	0,1	0,1	0,4	0,8
3	1	0	0	0	0	0,8	1,1
	2	0	0	0,3	0,8	1,1	1,7
4	1	0	0	0	0	0,1	0,9
	2	0	0	0	0	0,2	0,3
5	1	0	0	0,3	0,3	0,4	1,2
	2	0	0	0,2	0,3	0,4	0,9
6	1	0	0	0,3	0,3	0,4	1,2
	2	0	0	0,2	0,3	0,4	0,9
7	1	0	0	1	1,3	1,9	1,9
	2	0	0	0,4	0,5	1,3	1,3
8	1	0	0	0,7	1	2	2,6
	2	0	0	0	1,4	1,8	2,9
9	1	0	0	0,8	0,8	2	3
	2	0	0	0	0	1,8	1,8
10	1	0	0	0,3	0,8	1,9	2,2
	2	0	0	0	0,9	1,8	1,8
11	1	0	0	0,6	1,2	2,1	2,3
	2	0	0	0,9	1,5	1,7	1,9
12	1	0	0	1,2	1,7	1,8	2,3
	2	0	0	0,4	1,4	1,6	1,6
13	1	0	0	1,3	1,6	2,1	2,1
	2	0	0	0,9	0,9	1,3	1,4
14	1	0	0	0,6	0,9	1,4	1,7
	2	0	0	0,5	0,7	1,4	1,4
15	1	0	0	1,5	1,6	1,9	2,3
	2	0	0	0,8	0,8	1,4	1,8

Repetição	Placa	Leitura (dias pós-semeadura)					
		4°	7°	11°	14°	17°	21°
16	1	0	0	1,7	1,7	2,3	3
	2	0	0	0	0	1,8	2,2
17	1	0	0	0,1	0,9	1,4	3
	2	0	0	0,7	1	2,2	2,6
18	1	0	0	0	1,2	1,6	1,9
	2	0	0	0,1	1,4	1,9	2,6
19	1	0	0	0,1	0,9	1,6	3,3
	2	0	0	0	1	2,6	4,1
20	1	0	0	0,6	0,9	1,1	1,5
	2	0	0	0	0,5	0,9	0,9
21	1	0	0	0,7	1,2	1,2	1,6
	2	C	C	C	C	C	C
22	1	0	0	0	0,6	0,6	1
	2	0	0	0	0,8	1,1	1,6
23	1	0	0	0	0,9	1,6	1,8
	2	0	0	0	0,8	1,6	2,5
24	1	0	0	0,5	0,8	1	1,1
	2	C	C	C	C	C	C
25	1	0	0	0,9	1,3	1,8	3
	2	0	0	0,6	0,9	1,2	1,8
26	1	0	0	0,2	0,5	0,9	1,2
	2	0	0	0	0,6	0,8	1,2
27	1	0	0	1,1	1,6	2,1	2,4
	2	0	0	0,7	1,1	1,7	2,2
28	1	0	0	0,6	1,2	2	2,6
	2	0	0	0,3	1,1	2	2,7
29	1	0	0	1,6	1,8	2,4	2,7
	2	0	0	1,8	2,2	2,4	2,4
30	1	0	0	0,7	0,7	2,1	2,2
	2	0	0	0,3	0,4	0,7	0,7

APÊNDICE H – Resultado da quantificação de U.F.C. dos tubos semeados pela **técnica 1** (gordura) segundo a repetição, o tubo e os dias de leitura. São Paulo, 2005.

Repetição	Tubo	Leitura (dias pós-semeadura)					
		7°	14°	21°	28°	35°	42°
1	1	0	0	0	2	2	2
	2	0	0	0	2	2	2
2	1	0	0	0	1	2	2
	2	0	0	0	2	2	2
3	1	0	0	1	2	2	2
	2	0	0	0	2	2	2
4	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	1	1	1
5	1	0	0	0	2	2	2
	2	0	0	1	2	2	2
6	1	0	0	0	3	4	4
	2	0	0	0	1	2	2
7	1	0	0	0	3	4	4
	2	0	0	0	3	4	4
8	1	0	0	0	0	1	2
	2	0	0	0	0	1	2
9	1	0	0	1	1	2	3
	2	0	0	1	1	1	2
10	1	0	0	0	0	1	2
	2	0	0	0	0	1	2
11	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	1	1	1	1
12	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
13	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
14	1	0	0	0	0	2	2
	2	0	0	1	2	2	2
15	1	0	0	1	1	2	2
	2	0	0	0	1	2	2

Repetição	Tubo	Leitura (dias pós-semeadura)					
		7°	14°	21°	28°	35°	42°
16	1	0	0	0	1	1	3
	2	0	0	1	1	2	2
17	1	0	0	1	1	2	2
	2	0	0	1	1	1	1
18	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	1	1	2
19	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
20	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	1	1	1
21	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
22	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	1	2	2
23	1	0	0	0	0	2	2
	2	0	0	0	1	2	2
24	1	0	0	1	1	1	1
	2	0	0	1	1	2	2
25	1	0	0	0	0	2	2
	2	0	0	0	1	2	2
26	1	0	0	0	1	2	2
	2	0	0	0	1	2	2
27	1	0	0	0	1	2	2
	2	0	0	1	1	1	2
28	1	0	0	0	1	2	2
	2	0	0	0	1	1	1
29	1	0	0	0	1	2	2
	2	0	0	0	1	2	2
30	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	1	2	2

APÊNDICE I – Resultado da contagem de U.F.C. das placas semeadas pela **técnica 2** (sedimento) segundo a repetição, a placa e os dias de leitura. São Paulo, 2005.

Repetição	Placa	Leitura (dias pós-semeadura)					
		4°	7°	11°	14°	17°	21°
1	1	0	0	0,1	0,3	0,6	0,7
	2	0	0	0,2	0,4	0,4	0,6
2	1	0	0	0,3	0,8	1	1,2
	2	0	0	0,5	0,7	1,1	1,2
3	1	0	0	0,2	0,3	0,4	0,9
	2	0	0	0,4	0,5	0,5	0,7
4	1	0	0	0,9	1	1,2	1,6
	2	0	0	0,3	0,4	0,4	1,3
5	1	0	0	0,3	0,3	0,8	1,1
	2	0	0	0,4	0,5	0,5	0,5
6	1	0	0	0,4	0,5	1,7	1,7
	2	0	0	0,6	0,8	1,6	1,6
7	1	0	0	0,4	0,5	1,7	1,7
	2	0	0	0,6	0,8	1,6	1,6
8	1	0	0	0	2	2	2,6
	2	0	0	0	1,6	2,1	2,8
9	1	0	0	1,1	2,2	2,2	2,3
	2	0	0	0	0	1,9	2,4
10	1	0	0	2,8	3,1	3,6	4,2
	2	0	0	1,8	1,9	1,9	1,9
11	1	0	0	1,1	1,4	1,9	1,9
	2	C	C	C	C	C	C
12	1	0	0	1,6	3,1	3,1	3,1
	2	0	0	2,1	2,5	2,7	2,7
13	1	0	0	1,4	2	2,2	2,4
	2	0	0	1,4	1,7	2,4	2,5
14	1	0	0	1,2	1,4	1,7	2,7
	2	0	0	0,9	0,9	1,5	1,4
15	1	0	0	2,8	2,8	3	3,1
	2	0	0	1,6	2,4	2,7	3

Repetição	Placa	Leitura (dias pós-semeadura)					
		4°	7°	11°	14°	17°	21°
16	1	0	0	1,5	2,3	0,6	2,3
	2	0	0	0,6	0,7	1,8	0,7
17	1	0	0	1,1	1,4	2,3	2,5
	2	0	0	1,1	1,8	1,8	2,3
18	1	0	0	0,7	1,1	2,3	2,3
	2	0	0	0,9	2,4	5,2	5,2
19	1	0	0	0,7	1,5	1,5	1,5
	2	0	0	0,9	1,3	1,6	2
20	1	0	0	0,6	1,2	1,3	1,6
	2	0	0	0,2	0,6	0,7	1
21	1	0	0	0,5	1,4	1,4	1,7
	2	0	0	0,8	1,6	2,2	2,6
22	1	0	0	1	1,3	1,5	2,1
	2	0	0	0,6	1,1	1,1	1,5
23	1	0	0	0,8	1,5	1,7	1,7
	2	0	0	0,5	1,1	1,5	1,7
24	1	0	0	1,2	1,2	1,3	1,7
	2	0	0	0	1,2	1,6	2,1
25	1	0	0	0,7	1	1,3	1,3
	2	0	0	1	1,2	1,4	1,7
26	1	0	0	0,4	1,1	1,5	1,8
	2	0	0	0,6	1,1	1,3	1,6
27	1	0	0	0,1	0,2	0,3	0,3
	2	0	0	0,2	0,3	0,3	0,6
28	1	0	0	1,3	0,9	0,7	1,2
	2	0	0	0	1,5	1,5	1,5
29	1	0	0	1	1,1	1,2	1,5
	2	0	0	1,1	0,8	0,8	0,9
30	1	0	0	1,5	1,8	2,1	2,1
	2	0	0	2,3	3,5	4,4	4,4

APÊNDICE J– Resultado da quantificação de U.F.C. dos tubos semeados pela **técnica 2** (sedimento) segundo a repetição, o tubo e os dias de leitura. São Paulo, 2005.

Repetição	Tubo	Leitura (dias pós-semeadura)					
		7°	14°	21°	28°	35°	42°
1	1	0	0	1	1	1	2
	2	0	0	0	1	2	2
2	1	0	0	1	3	3	3
	2	0	0	1	3	3	3
3	1	0	0	1	2	2	2
	2	0	0	0	2	2	2
4	1	0	0	1	3	3	3
	2	0	0	0	2	2	2
5	1	0	0	1	3	3	3
	2	0	0	0	2	2	2
6	1	0	0	1	3	3	4
	2	0	0	1	3	3	4
7	1	0	0	0	2	3	3
	2	0	0	1	2	3	3
8	1	0	0	1	1	1	1
	2	0	0	1	1	1	1
9	1	0	0	0	0	1	2
	2	0	0	0	1	2	3
10	1	0	0	1	1	1	2
	2	0	0	1	1	4	4
11	1	0	0	1	1	2	3
	2	0	0	1	1	2	3
12	1	0	0	0	1	4	4
	2	0		0	1	4	4
13	1	0	0	0	1	3	3
	2	0	0	0	1	3	3
14	1	C	C	C	C	C	C
	2	0	0	1	1	1	3
15	1	0	0	0	1	3	3
	2	0	0	0	1	3	3

Repetição	Tubo	Leitura (dias pós-semeadura)					
		7°	14°	21°	28°	35°	42°
16	1	0	0	0	1	3	3
	2	0	0	0	1	2	3
17	1	0	0	1	1	2	3
	2	0	0	0	1	2	2
18	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
19	1	0	0	0	0	1	2
	2	0	0	0	1	1	1
20	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	0	2	2
21	1	C	C	C	C	C	C
	2	C	C	C	C	C	C
22	1	0	0	1	1	2	2
	2	0	0	1	1	1	1
23	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	1	1	2
24	1	0	0	0	0	1	1
	2	C	C	C	C	C	C
25	1	0	0	0	1	1	2
	2	0	0	0	1	2	2
26	1	0	0	0	1	1	1
	2	C	C	C	C	C	C
27	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	1	1	1
28	1	0	0	0	1	2	2
	2	0	0	0	1	2	2
29	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	1	1	1
30	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	1	1	2

APÊNDICE K – Resultado da contagem de U.F.C das placas semeadas na terceira etapa pelo método de Petroff na diluição 10^{-3} segundo a repetição, a placa e os dias de leitura. São Paulo, 2005.

Repetição	Placa	Dias pós-semeadura			
		3°	7°	11°	14°
1	1	0	0	0	0,1
	2	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0
	2	0	0	0,1	0,1
3	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
4	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0,1
5	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
6	1	0	0	0	0
	2	0	0	0,1	0,1
7	1	0	0	0,1	0,1
	2	0	0	0	0
8	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
9	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
10	1	0	0	0	0,1
	2	0	0	0	0

APÊNDICE L – Resultado da quantificação das U.F.C. dos tubos semeados na terceira etapa pelo método de Petroff na diluição 10^{-3} segundo a repetição, o tubo e os dias de leitura. São Paulo, 2005.

Repetição	Tubo	Leitura (dias pós-semeadura)					
		7°	14°	21°	28°	35°	42°
1	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	1	1	1	1
2	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	1	1	1
3	1	0	0	0	1	1	2
	2	0	0	0	1	1	1
4	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	1	1	1	1
5	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	1	1	1
6	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	0	0	1
7	1	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	0	0	0	1
8	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
9	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	0	0	1
10	1	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	0	1	1	1

APÊNDICE M – Resultado da contagem de U.F.C das placas semeadas na terceira etapa pelo método de Petroff na diluição 10^{-4} segundo a repetição, a placa e os dias de leitura. São Paulo, 2005.

Repetição	Placa	Dias pós-semeadura			
		3°	7°	11°	14°
1	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
4	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
5	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
6	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
7	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
8	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
9	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
10	1	0	0	0	0
	2	0	0	0,1	0,1

APÊNDICE N – Resultado da quantificação das U.F.C. dos tubos semeados na terceira etapa pelo método de Petroff na diluição 10^{-4} segundo a repetição, o tubo e os dias de leitura. São Paulo, 2005.

Repetição	Tubo	Leitura (dias pós-semeadura)					
		7°	14°	21°	28°	35°	42°
1	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
2	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
3	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	1	1	1
4	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	1	1
5	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
6	1	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	0	0	1	1
7	1	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	0	0	0	0
8	1	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	0	0	0	0
9	1	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	0	1	1	1
10	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	1

APÊNDICE O – Resultado da contagem de U.F.C das placas semeadas na terceira etapa pelo método de Petroff na diluição 10^{-5} segundo a repetição, a placa e os dias de leitura. São Paulo, 2005.

Repetição	Placa	Dias pós-semeadura			
		3°	7°	11°	14°
1	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
4	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
5	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
6	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
7	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
8	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
9	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
10	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0

APÊNDICE P – Resultado da quantificação das U.F.C. dos tubos semeados na terceira etapa pelo método de Petroff na diluição 10^{-5} segundo a repetição, o tubo e os dias de leitura. São Paulo, 2005.

Repetição	Tubo	Leitura (dias pós-semeadura)					
		7°	14°	21°	28°	35°	42°
1	1	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	1	1	1
4	1	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	0	0	0	1
5	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
6	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	1
7	1	0	0	0	0	0	0
	2	C	C	C	C	C	C
8	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
9	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
10	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0

APÊNDICE Q – Resultado da contagem de U.F.C das placas semeadas na terceira etapa pela **técnica 1** (gordura) na diluição 10^{-3} segundo a repetição, a placa e os dias de leitura. São Paulo, 2005.

Repetição	Placa	Dias pós-semeadura			
		3°	7°	11°	14°
1	1	0	0	0,4	0,4
	2	0	0	0,6	0,6
2	1	0	0	0	0,1
	2	0	0	0,1	0,2
3	1	0	0	0,4	0,8
	2	0	0	0,2	0,4
4	1	0	0	0,2	0,4
	2	0	0	0	0,4
5	1	0	0	0,2	0,3
	2	0	0	0,2	0,5
6	1	0	0	0,2	0,5
	2	0	0	0,1	0,1
7	1	0	0	0,2	0,6
	2	0	0	0,2	0,4
8	1	0	0	0,3	0,3
	2	0	0	0,3	0,5
9	1	0	0	0,1	0,2
	2	0	0	0,1	0,2
10	1	0	0	0	0
	2	0	0	0,1	0,1

APÊNDICE R – Resultado da quantificação das U.F.C. dos tubos semeados pela **técnica 1** (gordura) na diluição 10^{-3} segundo a repetição, o tubo e os dias de leitura. São Paulo, 2005.

Repetição	Tubo	Leitura (dias pós-semeadura)					
		7°	14°	21°	28°	35°	42°
1	1	0	0	0	1	1	2
	2	0	0	0	1	1	2
2	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	1	1	1
3	1	0	0	0	1	2	2
	2	0	0	0	1	2	2
4	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	1	1	1
5	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	1	1	1
6	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
7	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
8	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
9	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	1	1	1
10	1	0	0	0	0	1	2
	2	0	0	0	0	1	1

APÊNDICE S – Resultado da contagem de U.F.C das placas semeadas na terceira etapa pela **técnica 1** (gordura) na diluição 10^{-4} segundo a repetição, a placa e os dias de leitura. São Paulo, 2005.

Repetição	Placa	Dias pós-semeadura			
		3°	7°	11°	14°
1	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
2	1	0	0	0,1	0,1
	2	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0
	2	0	0	0,2	0,2
4	1	0	0	0,2	0,2
	2	0	0	0,2	0,2
5	1	0	0	0,1	0,1
	2	0	0	0,1	0,2
6	1	0	0	0,1	0,1
	2	0	0	0	0
7	1	0	0	0	0
	2	0	0	0,1	0,1
8	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0,1
9	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
10	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0

APÊNDICE T – Resultado da quantificação das U.F.C. dos tubos semeados na terceira etapa pela **técnica 1** (gordura) na diluição 10^{-4} segundo a repetição, o tubo e os dias de leitura. São Paulo, 2005.

Repetição	Tubo	Leitura (dias pós-semeadura)					
		7°	14°	21°	28°	35°	42°
1	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	1
2	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	0	0	1
3	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
4	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	0	0	1
5	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
6	1	0	0	0	1	1	1
	2	C	C	C	C	C	C
7	1	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	0	0	0	1
8	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
9	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	1	1	1
10	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	0	0	0

APÊNDICE U – Resultado da contagem de U.F.C das placas semeadas na terceira etapa pela **técnica 1** (gordura) na diluição 10^{-5} segundo a repetição, a placa e os dias de leitura. São Paulo, 2005.

Repetição	Placa	Dias pós-semeadura			
		3°	7°	11°	14°
1	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
4	1	0	0	0,2	0,2
	2	0	0	0	0,1
5	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
6	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
7	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
8	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
9	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
10	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0

APÊNDICE V – Resultado da quantificação das U.F.C. dos tubos semeados na terceira etapa pela **técnica 1** (gordura) na diluição 10^{-5} segundo a repetição, o tubo e os dias de leitura. São Paulo, 2005.

Repetição	Tubo	Leitura (dias pós-semeadura)					
		7°	14°	21°	28°	35°	42°
1	1	0	0	1	1	1	1
	2	0	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
4	1	0	0	1	1	1	1
	2	0	0	1	1	1	1
5	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
6	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	1	1
7	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
8	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
9	1	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	0	0	0	1
10	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	0	1	1

APÊNDICE W – Resultado da contagem de U.F.C das placas semeadas na terceira etapa pela **técnica 2** (sedimento) na diluição 10^{-3} segundo a repetição, a placa e os dias de leitura. São Paulo, 2005.

Repetição	Placa	Dias pós-semeadura			
		3°	7°	11°	14°
1	1	0	0	0,1	0,1
	2	0	0	0,1	0,2
2	1	0	0	0	0,1
	2	0	0	0,1	0,2
3	1	0	0	0,1	0,1
	2	0	0	0	0
4	1	0	0	0,2	0,3
	2	0	0	0,2	0,4
5	1	0	0	0,1	0,1
	2	0	0	0,4	0,6
6	1	0	0	0,3	0,3
	2	0	0	0,1	0,2
7	1	0	0	0	0
	2	0	0	0,2	0,2
8	1	0	0	0,1	0,2
	2	0	0	0	0,2
9	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0,1
10	1	0	0	0	0,2
	2	0	0	0	0

APÊNDICE X – Resultado da quantificação das U.F.C. dos tubos semeados pela **técnica 2** (sedimento) na diluição 10^{-3} segundo a repetição, o tubo e os dias de leitura. São Paulo, 2005.

Repetição	Tubo	Leitura (dias pós-semeadura)					
		7°	14°	21°	28°	35°	42°
1	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	1	1	2
2	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	1	1	1
3	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	1	1	1
4	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
5	1	0	0	0	1	1	2
	2	0	0	0	0	1	1
6	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	1	1
7	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
8	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
9	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
10	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	0	0	1

APÊNDICE Y – Resultado da contagem de U.F.C das placas semeadas na terceira etapa pela **técnica 2** (sedimento) na diluição 10^{-4} segundo a repetição, a placa e os dias de leitura. São Paulo, 2005.

Repetição	Placa	Dias pós-semeadura			
		3°	7°	11°	14°
1	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0,1
4	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
5	1	0	0	0	0
	2	0	0	0,1	0,1
6	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
7	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0,2
8	1	0	0	0,1	0,1
	2	0	0	0	0
9	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
10	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0

APÊNDICE Z – Resultado da quantificação das U.F.C. dos tubos semeados pela **técnica 2** (sedimento) na diluição 10^{-4} segundo a repetição, o tubo e os dias de leitura. São Paulo, 2005.

Repetição	Tubo	Leitura (dias pós-semeadura)					
		7°	14°	21°	28°	35°	42°
1	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
2	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
3	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	1	1
4	1	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	0	0	0	0
5	1	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	0	1	1	1
6	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	1
7	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
8	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
9	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	0	0	0
10	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0

APÊNDICE Aa– Resultado da contagem de U.F.C das placas semeadas na terceira etapa pela **técnica 2** (sedimento) na diluição 10^{-5} segundo a repetição, a placa e os dias de leitura. São Paulo, 2005.

Repetição	Placa	Dia pós-semeadura			
		3°	7°	11°	14°
1	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
3	1	0	0	0,3	0,3
	2	0	0	0,4	0,6
4	1	0	0	0,1	0,1
	2	0	0	0	0
5	1	0	0	0,1	0,1
	2	0	0	0	0
6	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
7	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
8	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
9	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
10	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0

APÊNDICE Bb – Resultado da quantificação das U.F.C. dos tubos semeados pela **técnica 2** (sedimento) na diluição 10^{-5} segundo a repetição, o tubo e os dias de leitura. São Paulo, 2005.

Repetição	Tubo	Leitura (dias pós-semeadura)					
		7°	14°	21°	28°	35°	42°
1	1	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	0	0	1	1
2	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	1	1
4	1	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	0	0	0
5	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	1	1	1
6	1	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	0	0	0	0
7	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	0	0	0
8	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	0	1	1
9	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
10	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0