



Instituto Politécnico
de Castelo Branco

Instituto Politécnico de Castelo Branco

Martins, Maria Helena Dias da Silva

Comparação de métodos de cultura de micobactérias com importância na segurança alimentar

<https://minerva.ipcb.pt/handle/123456789/122>

Metadados

| | |
|---------------------------|---|
| Data de Publicação | 2011 |
| Resumo | A cultura de bactérias a partir de amostras de fezes e tecidos é o único método disponível para obtenção de isolamentos de estirpes de micobactérias. No entanto este método requer semanas ou mesmo meses de incubação até obter crescimento de colónias. Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis distingue-se de outras espécies de micobactérias pela dependência de micobactina J. No presente trabalho fez-se a comparação entre os meios de cultura Löwenstein-Jensen® com e sem micobactina J e o... |
| Editor | IPCB. ESA |
| Palavras Chave | Micobactérias, Cultura, Esfregaço, Coloração, Paratuberculose |
| Tipo | report |
| Revisão de Pares | Não |
| Coleções | ESACB - Nutrição Humana e Qualidade Alimentar |

Esta página foi gerada automaticamente em 2024-05-06T15:51:19Z com informação proveniente do Repositório

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE CULTURA DE MICOBACTÉRIAS COM IMPORTÂNCIA NA SEGURANÇA ALIMENTAR

Maria Helena Dias da Silva Martins

Relatório apresentado ao Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciatura em Nutrição Humana e Qualidade Alimentar, realizado sob a orientação científica da Professora Ana Cristina Outeiro Correia de Matos, Professora da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco e Professora Doutora Ana Cláudia Correia Coelho do Departamento das Ciências Veterinárias da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

AGRADECIMENTOS

Terminado este trabalho agradeço

À Escola Superior Agrária, na pessoa do Senhor Director, Professor Doutor Celestino de Almeida, por todos os meios disponibilizados para a realização deste trabalho.

À Professora Ana Cristina Matos minha orientadora, por toda a disponibilidade, amizade, orientação no trabalho e revisão do texto.

À Professora Doutora Ana Cláudia Coelho, Professora do Departamento das Ciências Veterinárias da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, por ter aceite ser co-orientadora deste trabalho e por toda a sua preciosa ajuda.

Ao Professor Doutor Manuel Martins por toda a disponibilidade e ajuda preciosa no tratamento estatístico dos dados e interpretação dos resultados.

Às minhas amigas pela amizade e cumplicidade partilhada ao longo destes anos. À Manuela, D. Fernanda, São Amaro e Telma, também pela ajuda nas tarefas do laboratório.

Ao meu amigo Paulo Mateus por toda a ajuda na preparação das amostras e marcação de lâminas.

À Luísa, minha amiga, pela ajuda na revisão do abstract.

À Marta, minha colega de turma por ser uma boa amiga.

À minha amiga Susana por tudo, pelos apontamentos sempre a horas, pelas horas que dispensou a estudar comigo e pelas conversas pela noite dentro. Sem a ajuda dela não teria conseguido chegar ao fim.

Aos meus pais pelo amor, incentivo, carinho e confiança em mim.

Ao Quim e à Inês, a quem dedico este trabalho, pelo amor, incentivo e enorme paciência.

A TODOS O MEU MUITO OBRIGADO

Comparação de métodos de cultura de micobactérias com importância na segurança alimentar.

RESUMO

A cultura de bactérias a partir de amostras de fezes e tecidos é o único método disponível para obtenção de isolamentos de estirpes de micobactérias. No entanto este método requer semanas ou mesmo meses de incubação até obter crescimento de colônias.

Mycobacterium avium subespécie *paratuberculosis* distingue-se de outras espécies de micobactérias pela dependência de micobactina J.

No presente trabalho fez-se a comparação entre os meios de cultura Löwenstein-Jensen® com e sem micobactina J e o Middlebrook® 7H11 com OADC®, utilizados no isolamento de micobactérias.

A presença de bacilos álcool-ácido resistentes compatíveis com *Mycobacterium* spp. foi pesquisada usando a coloração de Ziehl-Neelsen.

Os métodos de cultura e de Ziehl-Neelsen foram avaliados com recurso ao programa WinEpiscope 2.0®. Os resultados obtidos sugerem a cultura em Löwenstein-Jensen® com glicerol, em paralelo com Löwenstein-Jensen® com glicerol e micobactina J para microrganismos da espécie *Mycobacterium avium*, com uma sensibilidade de 81,8% e um valor Kappa igual a 0,9. Para microrganismos da espécie *Mycobacterium bovis* o método mais eficaz foi a cultura em Löwenstein-Jensen® com piruvato em paralelo com o Middlebrook® 7H11 com piruvato, com uma sensibilidade de 100% e um valor Kappa de 0,7 para as duas espécies em estudo.

Palavra chave: Micobactérias, cultura, esfregaço, coloração, paratuberculose.

Comparison of methods for culture of mycobacteria with importance in food security

ABSTRACT

Culture of bacteria from faeces and tissues samples is the only method available to obtain strains of mycobacteria. However, this method require weeks or even months of incubation before colony growth occurs.

Mycobacterium avium subspécie *paratuberculosis* is distinguished from other mycobacterial species by its dependence on the mycobactin J.

In the present study was established a comparison between the culture media Löwenstein-Jensen® with and without micobactin J and Middlebrook® 7H11 with OADC®, used in the isolation of mycobacteria.

The presence of acid-fast bacilli compatible with *Mycobacterium* spp. was investigated using the Ziehl-Neelsen straining.

The culture method and Ziehl-Neelsen were evaluated using the program WinEpiscope 2.0®.

The results suggest for microrganisms of the specie *Mycobacterium avium*, with a sensivity of 81,8% and a Kappa value equal to 0,9 in samples of wild boars and deer, culture in Löwenstein-Jensen® with glycerol in parallel with Löwenstein-Jensen® with glycerol and mycobactin J. Microrganisms to the specie *Mycobacterium bovis* the most effective culture was in Löwenstein-Jensen® with piruvato in parallel with Middlebrook® 7H11 with piruvato, with a sensivity of 100% and a Kappa value of 0,7, for the two species under study.

Keywords: Mycobacterias, culture, smear, straining, paratuberculosis.

ÍNDICE GERAL

| | |
|---|------|
| Agradecimentos | iii |
| Resumo | iv |
| Abstract | v |
| Índice geral | vi |
| Índice de figuras | viii |
| Índice de tabelas | ix |
| Lista de abreviaturas | x |
| Índice de anexos | xi |
| 1 - Introdução | 1 |
| 2- Micobacterioses | 3 |
| 2.1 - Referência histórica | 3 |
| 2.2 - Etiologia | 4 |
| 2.2.1 - Género <i>Mycobacterium</i> spp. | 4 |
| 2.2.2 - Complexo <i>Mycobacterium avium</i> (MAC) | 5 |
| 2.3 - Transmissão da doença entre animais e medidas de controlo | 6 |
| 2.4 - Paratuberculose e saúde pública | 7 |
| 2.5 - Distribuição geográfica | 9 |
| 2.6 - Métodos de detecção | 9 |
| 2.6.1- Exame microscópico - Baciloscopia | 9 |
| 2.6.2 - Métodos bacteriológicos | 10 |
| 2.6.2.1 - Descontaminação das amostras | 10 |
| 2.6.2.2 - Isolamento nos meios selectivos | 10 |
| 2.6.2.3 - Dependência de micobactina J | 10 |
| 2.6.3 - Métodos moleculares | 11 |
| 3 - Material e métodos | 12 |
| 3.1 - Preparação das amostras | 12 |
| 3.2 - Exame microscópico | 12 |
| 3.2.1 - Método de Ziehl-Neelsen | 12 |
| 3.2.2 - Observação e interpretação | 13 |
| 3.3 - Meios de cultura usados no isolamento de micobactérias | 13 |
| 3.3.1 - Löwenstein-Jensen® | 14 |
| 3.3.2 - Middlebrook® 7H11 | 15 |
| 3.4 - Preparação da amostra para cultura microbiológica | 15 |
| 3.5 - Sementeira | 16 |
| 3.6 - Observação macroscópica das colónias | 17 |
| 3.6.1 - Observação no meio Middlebrook® 7H11 | 17 |
| 3.6.2 - Observação no meio Löwenstein-Jensen® | 17 |
| 3.7 - Confirmação das colónias | 18 |
| 3.7.1 - Löwenstein-Jensen e Middlebrook® 7H11 | 18 |

| | |
|--|----|
| 3.7.2 - Middlebrook® 7H9 | 18 |
| 3.7.3 - Extracção do DNA das células | 18 |
| 3.8 - Crioconservação das culturas a -80°C | 19 |
| 3.9 - Análise de dados | 19 |
| 4 - Resultados e discussão | 20 |
| 4.1 - Resultados da cultura | 20 |
| 4.2 - Resultados dos esfregaços directos dos tecidos e fezes | 26 |
| 4.3 - Discussão | 27 |
| 5 - Considerações finais | 30 |
| 6 - Referências Bibliográficas | 31 |
| 7 - Anexos | 33 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | Possíveis vias de transmissão e infecção de MAC entre o meio ambiente, animais selvagens, animais de produção e o Homem. | 5 |
| Figura 2 | Identificação dos animais em estudo. | 12 |
| Figura 3 | Coloração de esfregaços pelo método de Ziehl-Neelsen. | 13 |
| Figura 4 | Preparação do meio de cultura Löwenstein-Jensen®. | 15 |
| Figura 5 | Esquema do protocolo de cultura em Löwenstein-Jensen® e Middlebrook® 7H11. | 17 |
| Figura 6 | Procedimento de confirmação e crioconservação das colónias isoladas. | 18 |
| Figura 7 | Kit de Extracção de DNA. | 19 |
| Figura 8 | Incubação a 100°C. | 19 |
| Figura 9 | Crioconservação das culturas. | 19 |
| Figura 10 | Resultados positivos (nº de tubos com crescimento) obtidos das amostras de javalis e veados nos diferentes meios de cultura. | 20 |
| Figura 11 | Diferentes tipos de colónias isoladas no meio LJ e observação microscópica das colónias. | 21 |
| Figura 12 | Aparência macroscópica das colónias de micobactérias no meio Middlebrook® 7H11 com OADC®. | 21 |
| Figura 13 | Resultados positivos em cultura e esfregaço por espécie animal (veado e javali). | 22 |
| Figura 14 | Bacilos álcool-ácido resistentes compatíveis com MAP observados em esfregaços (Ziehl-Neelsen x 1000). | 26 |
| Figura 15 | Resultados positivos BAAR (+) dos esfregaços directos, dos órgãos e fezes de javalis e veados. | 27 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabela 1 | Formas de transmissão da paratuberculose. | 7 |
| Tabela 2 | Meios de cultura utilizados no isolamento de micobactérias. | 14 |
| Tabela 3 | Relação entre o número de tubos inoculados e o número de tubos com crescimento positivo nos diferentes meios de cultura. | 20 |
| Tabela 4 | Resultados da cultura microbiológica expressos em número e percentagem dos tubos com e sem crescimento. | 22 |
| Tabela 5 | Médias dos períodos de incubação (meses) nos diferentes meios de cultura. | 22 |
| Tabela 6 | Avaliação do método de cultura em amostras de javalis. | 23 |
| Tabela 7 | Avaliação do método de cultura em amostras de veados. | 24 |
| Tabela 8 | Concordância dos métodos utilizados no isolamento de micobactérias em amostras de javalis. | 25 |
| Tabela 9 | Concordância dos métodos utilizados no isolamento de micobactérias em amostras de veados. | 25 |
| Tabela 10 | Resultados positivos BAAR (+) dos esfregaços directos corados pelo método de Ziehl-Neelsen em javalis e veados. | 27 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| BAAR | Bacilos álcool-ácido resistentes |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| EFSA | Autoridade Europeia de Segurança Alimentar |
| G | Força centrífuga |
| HIV | Vírus da imunodeficiência adquirida |
| HPC | Cloreto de hexadecil piridínio |
| HTST | High temperature short time |
| LJ | Löwenstein-Jensen® |
| LJ+G+M | Löwenstein-Jensen® com glicerol e micobactina |
| LJ+G | Löwenstein-Jensen® com glicerol |
| LJ+P | Löwenstein-Jensen® com piruvato |
| MAA | <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i> |
| MAC | Complexo <i>Mycobacterium avium</i> |
| MAH | <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> |
| MAP | <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> |
| <i>M. avium</i> | <i>Mycobacterium avium</i> |
| <i>M. bovis</i> | <i>Mycobacterium bovis</i> |
| NAOH | Hidróxido de sódio |
| OADC | Ácido oleico, dextrose, albumina e catalase |
| OIE | Organização Mundial de Sanidade Animal |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PCR | Reacção em cadeia polimerase |
| pH | Concentração de hidrogeniões |
| rpm | Rotações por minuto |
| subsp. | Subespécie |
| TTE | Tris-Triton-EDTA |
| UFC | Unidades formadoras de colónias |
| 7H11+G | Meio de Middlebrook® 7H11 com glicerol |
| 7H11+P | Meio de Middlebrook® 7H11 com piruvato |
| ZN | Ziehl-Neelsen |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | | |
|-------------|--|----|
| Anexo I | Modo de preparação do descontaminante (HPC) cloreto hexadecil piridínio a 0,75%. | 33 |
| Anexo II | Preparação do meio de cultura Middlebrook® 7H11. | 34 |
| Anexo III | Modo de preparação do meio de cultura Löwenstein-Jensen®. | 35 |
| Anexo IV | Modo de preparação do meio de cultura Middlebrook® 7H9 Broth. | 36 |
| Anexo V | Quantidades de agentes selectivos a adicionar aos meios de cultura. | 37 |
| Anexo VI | Protocolo para descontaminação de amostras e concentração de bactérias para inoculação nos meios de cultura. | 38 |
| Anexo VII | Modo de preparação dos corantes utilizados na Coloração de Ziehl-Neelsen. | 39 |
| Anexo VIII | Modo de extracção de DNA com solução Tris-Triton-EDTA, segundo Parra <i>et al.</i> (2003). | 40 |
| Anexo IX | Modo de Extracção de DNA com o kit Mo Bio UltraClean™ Microbial DNA Isolation. | 41 |
| Anexo X | Avaliação e concordância do método de cultura 7H11+G/ <i>M. avium</i> em amostras de javalis. | 43 |
| Anexo XI | Avaliação e concordância do método de cultura LJ+G+M/ <i>M. avium</i> em amostras de javalis. | 44 |
| Anexo XII | Avaliação e concordância do método de cultura LJ+G/ <i>M. avium</i> em amostras de javalis. | 45 |
| Anexo XIII | Avaliação e concordância do método de cultura LJ+P/ <i>M. bovis</i> em amostras de javalis. | 46 |
| Anexo XIV | Avaliação e concordância do método de cultura 7H11P/ <i>M. bovis</i> em amostras de javalis. | 47 |
| Anexo XV | Avaliação e concordância do método de coloração ZN/ <i>M. avium</i> em amostras de javalis. | 48 |
| Anexo XVI | Avaliação e concordância do método de coloração ZN/ <i>M. bovis</i> em amostras de javalis. | 49 |
| Anexo XVII | Avaliação e concordância do método de cultura LJ+G+M/7H11G - <i>M. avium</i> em amostras de javalis. | 50 |
| Anexo XVIII | Avaliação e concordância do método de cultura LJ+G+M/LJ+G - <i>M. avium</i> em amostras de javalis. | 51 |
| Anexo XIX | Avaliação e concordância do método de cultura LJ+G/7H11G- <i>M. avium</i> em amostras de javalis. | 52 |
| Anexo XX | Avaliação e concordância do método de cultura LJ+P/7H11P- <i>M. bovis</i> em amostras de javalis. | 53 |

| | | |
|--------------|---|----|
| Anexo XXI | Avaliação do método de cultura e coloração LJ+G/ZN- <i>M.avium</i> em amostras de javalis. | 54 |
| Anexo XXII | Avaliação e concordância do método de cultura e coloração LJ+P/ZN- <i>M.bovis</i> em amostras de javalis. | 55 |
| Anexo XXIII | Avaliação e concordância do método de cultura LJ+G+M / <i>M.avium</i> em amostras de veados. | 56 |
| Anexo XXIV | Avaliação e concordância dos métodos de cultura LJ+G/ <i>M.avium</i> em amostras de veados. | 57 |
| Anexo XXV | Avaliação e concordância dos métodos de cultura 7H11G/ <i>M.avium</i> em amostras de veados. | 58 |
| Anexo XXVI | Avaliação e concordância do método de cultura LJ+P/ <i>M.bovis</i> em amostras de veados. | 59 |
| Anexo XXVII | Avaliação e concordância do método de cultura 7H11P/ <i>M.bovis</i> em amostras de veados. | 60 |
| Anexo XXVIII | Avaliação e concordância do método de coloração ZN/ <i>M.avium</i> em amostras de veados. | 61 |
| Anexo XXIX | Avaliação e concordância do método de coloração ZN/ <i>M.bovis</i> em amostras de veados. | 62 |
| Anexo XXX | Avaliação e concordância do método de cultura LJ+G /7H11G- <i>M.avium</i> em amostras de veados. | 63 |
| Anexo XXXI | Avaliação e concordância do método de cultura LJ+G+M /7H11G- <i>M.avium</i> em amostras de veados. | 64 |
| Anexo XXXII | Avaliação e concordância do método de cultura LJ+G+M/LJ+G- <i>M.avium</i> em amostras de veados. | 65 |
| Anexo XXXIII | Avaliação e concordância do método de cultura LJ+P/7H11P- <i>M.bovis</i> em amostras de veados. | 66 |
| Anexo XXXIV | Avaliação e concordância do método de cultura e coloração ZN/LJ+G - <i>M.avium</i> em amostras de veados. | 67 |
| Anexo XXXV | Avaliação e concordância do método de cultura e coloração ZN/LJ+P- <i>M.bovis</i> em amostras de veados. | 68 |