

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