

<https://doi.org/10.31533/pubvet.v18n06e1612>

Avaliação do soro fetal bovino como fonte de enriquecimento em meio de cultura sintético para o isolamento de *Mycobacterium bovis*

Cristina Corsi Dib^{1*}, Luara Lucena Cassiano²

¹Pesquisador Científico, Instituto Biológico, São Paulo, São Paulo, Brasil.

²Instituto de Pesca, São Paulo, São Paulo, Brasil

*Autor para correspondência, e-mail: criscdib@sp.gov.br

Resumo. O meio de Middlebrook 7H10 adicionado de 0,2% de glicose e Soro Fetal Bovino (SFB) nas concentrações 5, 10 e 15% foi comparado com o meio de Middlebrook 7H11 enriquecido com OADC comercial para avaliação do crescimento de *Mycobacterium bovis* AN5 nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} realizadas a partir da escala 1 de McFarland. Os resultados demonstraram crescimento micro e macroscópico das micobactérias em todas as concentrações de SFB utilizadas, duas semanas pós-semeadura, em maior número quando comparado ao Meio 7H11 suplementado com OADC comercial. A análise estatística, demonstrou uma redução significativa do grupo Middlebrook 7H11 quando comparado com o grupo de concentração 15% de SFB nas diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . Os resultados apresentados permitiram concluir que o SFB pode ser utilizado como fonte de enriquecimento do Meio de Middlebrook 7H10 em camada delgada, para isolamento de *Mycobacterium bovis*, com a vantagem de ser mais acessível e barato que o meio comercial.

Palavras-chave: Cultivo, diagnóstico, Middlebrook, OADC, tuberculose bovina

*Evaluation of fetal bovine serum as a source of enrichment in synthetic culture medium for the isolation of *Mycobacterium bovis**

Abstract. A Middlebrook 7H10 medium added with 0.2% glucose and Fetal Bovine Serum (FBS) at concentrations of 5, 10, and 15% was compared with a Middlebrook 7H11 medium enriched with commercial OADC to evaluate the growth of *Mycobacterium bovis*, strain AN5, in the dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4} performed from the McFarland scale 1. The results demonstrated micro and macroscopic growth of mycobacteria in all concentrations of SFB two weeks after inoculation, and in greater numbers when compared to Middlebrook 7H11 supplemented with commercial OADC. Statistical analysis found a significant reduction in the Middlebrook 7H11 group when compared to the 15% SFB concentration group in dilutions 10^{-2} , 10^{-3} , and 10^{-4} . The results presented allowed us to conclude that FBS can be used as a source of enrichment for a Middlebrook 7H10 Medium in a thin layer, for isolation of *Mycobacterium bovis*, with the advantage of being more accessible and cheaper than the commercial medium.

Keywords: Culture, diagnosis, Middlebrook, OADC, bovine tuberculosis

Introdução

A tuberculose bovina é uma doença economicamente importante e amplamente disseminada em bovinos, causada principalmente pelo *Mycobacterium bovis* (Arnot & Michel, 2020; Grange & Yates, 1994; Pérez-Lago et al., 2014; Zimpel et al., 2020), que acomete uma ampla gama de animais domésticos e selvagens (Borham et al., 2022; OMSA, 2022; Poester et al., 2009; Valente et al., 2011). Também chamada de tuberculose dos mamíferos, é uma enfermidade granulomatosa crônica dos animais e do homem, que resulta da infecção com os membros patogênicos do complexo *Mycobacterium tuberculosis*

(MTBC), principalmente, o *M. bovis* (OIE, 2022). Possui marcada importância econômica decorrente das perdas na produtividade, morbidade, mortalidade, condenação de carcaças em abatedouros, embargos ao comércio de produtos no mercado internacional, custos com programa de controle e erradicação, ameaça à saúde pública e de espécies protegidas em risco de extinção (Borham et al., 2022; Carneiro et al., 2019; Dib, 2023; Hoffmann et al., 2022; Krajewska-Wedzina et al., 2018). É uma doença infecciosa crônica caracterizada pela formação de granulomas nodulares conhecidos como tubérculos, que podem afetar qualquer órgão ou tecido, embora acometam com mais frequência linfonodos (principalmente de cabeça e tórax), pulmões, intestinos, fígado, baço, pleura e peritônio (Admassu et al., 2015; Nascimento & Nardi Júnior, 2022; Neves et al., 2017; OIE, 2018; Teppawar et al., 2018).

O isolamento do *M. bovis* de espécimes clínicos e post-mortem é o diagnóstico confirmatório definitivo da doença e é importante para estudos epidemiológicos e validação de imunoenaios (Corner et al., 2012; Issa et al., 2017). O *M. bovis* é uma bactéria de crescimento lento quando comparado com os padrões bacterianos gerais, requer um longo período de incubação, principalmente no primeiro isolamento, que pode demorar até 12 semanas (Corner et al., 2012). A maior parte dos meios de cultura utilizados no isolamento do bacilo da tuberculose, contém ovos ou contém ágar (Fonseca et al., 1985). O meio de Middlebrook 7H11 enriquecido com suplemento OADC (ácido oléico, albumina, dextrose e catalase), permite o isolamento precoce reduzindo o tempo de incubação para três semanas ou menos (Issa et al., 2017). Além disso, permite a visualização das microcolônias (colônias microscópicas) em estágios iniciais e a identificação preliminar baseada nas características morfológicas, quando utilizado em camada delgada (Dib et al., 2006; Marcondes et al., 2006; Mejia et al., 1999; Robledo et al., 2006; Rosário et al., 2014; Silva et al., 2007). No entanto, a baixa qualidade dos suplementos OADC comerciais disponíveis podem inibir o crescimento ideal dos bacilos (Issa et al., 2017), além das dificuldades inerentes a variação das taxas de dólara, e longos períodos necessários para importação, que reduzem as taxas de validade para sua utilização (Sabagh et al., 2012).

Recentemente, após o surgimento das técnicas moleculares nos anos 70, como a PCR, o sequenciamento e, mais particularmente a metagenômica, houve um favorecimento destas técnicas por parte dos microbiologistas, em detrimento da cultura (Bonnet et al., 2020). Uma vez que as análises genômicas de bactérias tornaram-se disponíveis como ferramenta de rotina, houve uma percepção arriscada de que o desenvolvimento da análise genômica é superior ou pode substituir métodos de cultivo devido a rapidez na análise e quantidade de dados produzidos (Gill, 2017). No entanto, muitas delas também apresentam desvantagens como: a impossibilidade de diferenciar o DNA pertencente a bactérias vivas daquelas já mortas (Bonnet et al., 2020), baixa especificidade de primers e sondas, levando a erros de identificação, altos níveis de especialização, altos custos de reagentes e equipamentos e no caso específico das micobactérias, grande dificuldade de extração do DNA devido as características da complexa parede celular micobacteriana, rica em lipídeos e da própria lesão granulomatosa resultante da infecção, que constitui mais uma espessa barreira nos processos de extração (Dib, 2023). A cultura não apenas permite a viabilidade dos microrganismos, mas é também necessária para estudos que exigem enumeração, muito utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica, avaliação de aspectos fenotípicos e resistência a antimicrobianos (Gill, 2017).

O enriquecimento nos meios de cultura tem sido usado por mais de 120 anos. Ele consiste em incubar uma amostra em um meio que estimula o crescimento do organismo de interesse (Bertollo & Montanha, 2022; Green, 2021), principalmente quando há um número pequeno de bactérias, que podem ser perdidas. O enriquecimento provê nutrientes, elementos essenciais e condições ambientais para o crescimento da bactéria (Bonnet et al., 2020). Desta forma, pode auxiliar no isolamento de colônias puras, a partir de amostras nas quais os microrganismos alvo representam apenas uma pequena porcentagem da flora total, ou aumentar a chance de um primeiro isolamento, quando um número relativamente pequeno de microrganismos está presente, o que acontece com frequência nas lesões de tuberculose bovina (OIE, 2022).

O soro fetal bovino (SFB) é a fração líquida do sangue coagulado de fetos bovinos, desprovido de células, fibrinas e fatores de coagulação, mas contendo um grande número de nutrientes e macromoléculas essenciais para o crescimento e manutenção celular (Fonseca et al., 1985; Jochems et al., 2002; Lee et al., 2022; Pilgrim et al., 2022). Além disso, contém uma variedade de pequenas moléculas como aminoácidos, açúcares, lipídeos e hormônios. Estes aspectos fazem com que ele seja

utilizado em uma ampla gama de aplicações, com destaque para o cultivo de células eucarióticas, onde atua facilitando a sobrevivência e proliferação das células ([Jochems et al., 2002](#); [Lee et al., 2022](#); [Pilgrim et al., 2022](#); [Rauch et al., 2011](#)).

[Fonseca et al. \(1985\)](#) demonstraram o potencial do soro fetal bovino acrescido de glicose, como enriquecimento para o Meio de Middlebrook 7H10, no crescimento de micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), apresentando resultados comparáveis ao OADC. O soro fetal bovino (SFB) é um produto muito utilizado em laboratório para o cultivo de células e tecidos. Além disso, a aquisição é mais econômica e acessível, tornando-se uma alternativa ao suplemento comercial ([Ahuja et al., 1967](#); [Marcondes et al., 2006](#)). Desta forma, este trabalho teve por objetivo, avaliar o Meio de Middlebrook 7H10 acrescido de 0,2% de glicose e enriquecido com soro fetal bovino nas concentrações 5, 10 e 15%, frente ao meio tradicional de Middlebrook 7H11 modificado enriquecido com OADC comercial, para o isolamento de *M. bovis* estirpe AN5 em diluições seriadas 10^{-1} a 10^{-4} .

Material e métodos

O meio de Middlebrook 7H10 acrescido de soro fetal bovino (SFB) ([Fonseca et al., 1985](#)) nas concentrações 5; 10 e 15% e glicose 0,2%, foi comparado ao Meio de Middlebrook 7H11 modificado enriquecido com 10% de OADC ([Universidad de Las Naciones Unidas, 1998](#)), para avaliação de crescimento de *Mycobacterium bovis* estirpe AN5. Foram realizadas diluições seriadas na base 10 em água destilada estéril, a partir da escala 1 de McFarland. As diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} foram inoculadas num volume de 100 microlitros por placa, em três placas de 7H10 para cada concentração de soro fetal bovino e três placas de Middlebrook 7H11 modificado, para cada diluição, como exemplificado na [tabela 1](#)

Tabela 1. Número de placas semeadas contendo meio Middlebrook 7H10 acrescidas de soro fetal bovino e meio de Middlebrook 7H11 modificado para diluição de *Mycobacterium bovis* AN5.

Diluição de <i>M. bovis</i> AN5	Nº de placas	Nº de placas	Nº de placas	Nº de placas
	Middlebrook 7H10 5%SFB	Middlebrook 7H10 10%SFB	Middlebrook 7H10 15%SFB	Middlebrook 7H11 Modificado
10^{-1}	3	3	3	3
10^{-2}	3	3	3	3
10^{-3}	3	3	3	3
10^{-4}	3	3	3	3

Os meios de Middlebrook 7H10 e 7H11 foram dispostos em camada delgada, em um volume de aproximadamente 10 ml, em placas de Petri descartáveis, de 60 x 15 mm. Após a semeadura, as placas foram vedadas individualmente com parafilm e acondicionadas em caixas plásticas contendo uma pastilha do tipo Alka Seltzer em uma placa de Petri aberta, em um dos cantos da caixa. No outro canto, uma placa contendo um chumaço de palha de aço, molhada com cinco ml de uma solução de sulfato de cobre, para gerar um ambiente de microaerofilia necessário ao crescimento das micobactérias.

As placas foram incubadas em estufa a 37 °C e observadas duas vezes por semana, microscopicamente durante duas semanas, e macroscopicamente durante aproximadamente seis semanas. Para avaliação das médias de contagem, foram considerados apenas os valores aos 14 dias pós-semeadura, uma vez que após este período o aumento de tamanho das colônias faz com que elas possam convergir umas sobre as outras dificultando sua individualização para contagem.

Para análise estatística foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para comparação de três grupos ou mais. Quando os testes de Kruskal-Wallis produziram valores de p estatisticamente significativos, foi aplicado o teste post hoc de comparações múltiplas de Duun ([Dinno, 2015](#)). Os valores de P correspondentes foram ajustados usando a correção de Benjamini-Hochberg (False Discovery Rate – FDR) para os vários testes. Todas as análises estatísticas foram realizadas no pacote estatístico GraphPad Prism 5.1. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de $P < 0,05$.

Resultados e discussão

O *M. bovis* AN5 cresceu tanto no meio de Middlebrook 7H11 modificado, quanto no meio de Middlebrook 7H10, acrescido de soro fetal bovino e glicose. Na análise microscópica, realizada durante as primeiras duas semanas pós-semeadura, as microcolônias (colônias microscópicas) foram observadas em todas as diluições e placas contendo Middlebrook 7H10 e Middlebrook 7H11 em camada delgada, sendo mais frequentes nas menores diluições, 10^{-1} e 10^{-2} e mais raras nas maiores diluições, 10^{-3} e 10^{-4} , onde foi necessário a observação de vários campos microscópicos para visualização de colônias.

A utilização do Middlebrook 7H11 modificado em camada delgada para visualização precoce de micobactérias já foi realizada em outros estudos ([Dib et al., 2006](#); [Marcondes et al., 2006](#); [Mejia et al., 1999](#); [Robledo et al., 2006](#); [Rosário et al., 2014](#); [Silva et al., 2007](#)). O tempo médio para detecção macroscópica das micobactérias em camada delgada, variou entre 12 e 25 dias pós-semeadura, resultado inferior ao normalmente obtido nos meios tradicionais à base de ovos, que podem demorar entre dez a doze semanas ([OIE, 2022](#)). [Rosário et al. \(2014\)](#) utilizaram a avaliação microscópica associada a PCR (Polimerase Chain Reaction) para diagnóstico de *M. bovis*, em amostras positivas de tuberculose bovina. Os autores detectaram microcolônias com apenas oito dias pós-semeadura. No entanto, este é o primeiro estudo, de acordo com a literatura científica consultada, que demonstra a associação do soro fetal bovino e glicose como enriquecimento do meio de Middlebrook 7H10 para a detecção de *M. bovis*. Os resultados das contagens de colônias macroscópicas em UFC/mL para os dois meios de cultura utilizados, aos catorze dias pós-semeadura, estão descritos na [Tabela 2](#).

Tabela 2. Contagem de UFC/mL de colônias macroscópicas de *M. bovis* estirpe AN5 em diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} em Meio de Middlebrook 7H10, acrescido de Soro Fetal Bovino nas concentrações de 5%, 10% e 15% e Meio de Middlebrook 7H11 modificado após duas semanas pós-semeadura

Diluição de <i>M. bovis</i>	7H10 5%SFB, UFC/mL			7H10 10%SFB, UFC/mL			7H10 15%SFB, UFC/mL			Middlebrook 7H11 modificado, UFC/mL		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
AN5												
10^{-1}	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	162	148	158
10^{-2}	112	98	102	185	190	205	350	334	342	39	47	49
10^{-3}	38	42	43	40	47	41	110	100	102	3	6	1
10^{-4}	11	20	23	18	27	33	38	40	39	3	1	5

As análises estatísticas foram baseadas na contagem relativa aos catorze dias pós-semeadura, já que após este período, o crescimento das colônias impossibilita a individualização das mesmas ([Dib et al., 2006](#)). Na diluição 10^{-1} , a partir de duas semanas pós-semeadura, todas as placas contendo 7H10 e soro fetal bovino, em todas as concentrações, apresentaram extensivo crescimento, com colônias macroscópicas em toda a superfície do meio e sem possibilitar a contagem. Nas placas contendo 7H11 suplementadas com OADC, foram observadas macrocolônias (colônias macroscópicas) em quantidades menores que nas placas de SFB, que ocupavam toda a superfície do meio ([Figura 1](#)). Ainda na diluição 10^{-1} , nas placas contendo 10 e 15% de SFB, algumas colônias macroscópicas puderam ser observadas precocemente na primeira semana pós-semeadura. Este resultado pode estar relacionado à adaptação da estirpe AN5 às condições de laboratório, nas quais foi submetida a repiques periódicos para garantir sua manutenção, à baixa diluição da estirpe e, principalmente à alta concentração de soro fetal bovino, garantindo grande aporte de nutrientes ao meio. Apesar do crescimento precoce no meio de Middlebrook 7H11 modificado em camada delgada também já ter sido relatado por [Rosário et al. \(2014\)](#), em amostras de lesões suspeitas de tuberculose, em até oito dias pós-semeadura, os valores em UFC/mL obtidos neste estudo, se mostraram mais altos nas placas de SFB, quando comparadas às suplementadas com OADC, de mesma diluição, demonstrando vantagem na recuperação de micobactérias em relação ao enriquecimento comercial.

Após as duas primeiras semanas todas as placas contendo soro fetal bovino em todas as concentrações e diluições de *M. bovis* AN5 utilizadas, apresentaram crescimento de colônias micro e macroscópicas. As placas com maiores concentrações de SFB apresentaram maior número de colônias macroscópicas e maior diâmetro aparente em relação as placas com menor concentração de SFB, quando semeadas com a mesma diluição de *M. bovis* AN5 ([Tabela 2](#), [Figura 2](#)).

A diluição 10^{-1} apresentou as maiores contagens de UFC/mL em todas as concentrações de SFB utilizadas e no meio de Middlebrook 7H11 enriquecido com OADC comercial. O expansivo crescimento de micobactérias nesta contagem tornou impossível a contagem, mesmo na menor concentração de soro

fetal bovino (5%), superando a contagem do enriquecimento comercial. A diluição 10^{-2} , apresentou a segunda maior média de contagem para as placas enriquecidas com SFB ou OADC (Tabela 2). Neste caso, assim como na diluição 10^{-3} , foi possível observar que o número de UFC/mL foi maior nas placas de maior concentração de SFB e menor nas placas de 7H11 enriquecidas com OADC, mesmo na menor concentração de SFB (5%). A diluição 10^{-4} apresentou as menores contagens, em todas as concentrações, e meios utilizados. Assim, de acordo com a tabela 2, é possível observar que os valores de contagens aumentaram com o aumento da concentração do SFB, chegando ao valor máximo nas concentrações de SFB 15% e menores no meio comercial. Na análise estatística, foi encontrada uma redução significativa do grupo Middlebrook 7H11 Modificado, quando comparado com o grupo de concentração 15% de SFB nas diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . Por outro lado, não foi encontrado diferenças significativas entre o grupo Middlebrook 7H11 modificado e os grupos enriquecidos com 5% e 10% de SFB. Este fato pode ser explicado devido ao pequeno número de placas utilizadas para cada meio/concentração, que pode ter interferido com a sensibilidade do teste estatístico realizado.

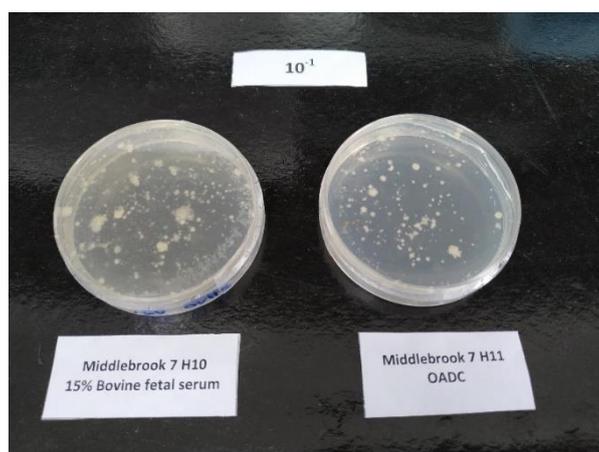


Figura 1. Foto das placas de Middlebrook 7H10 suplementadas com 15% de SFB, e Middlebrook 7H11 suplementado com OADC na diluição 10^{-1} , 14 dias pós-semeadura.

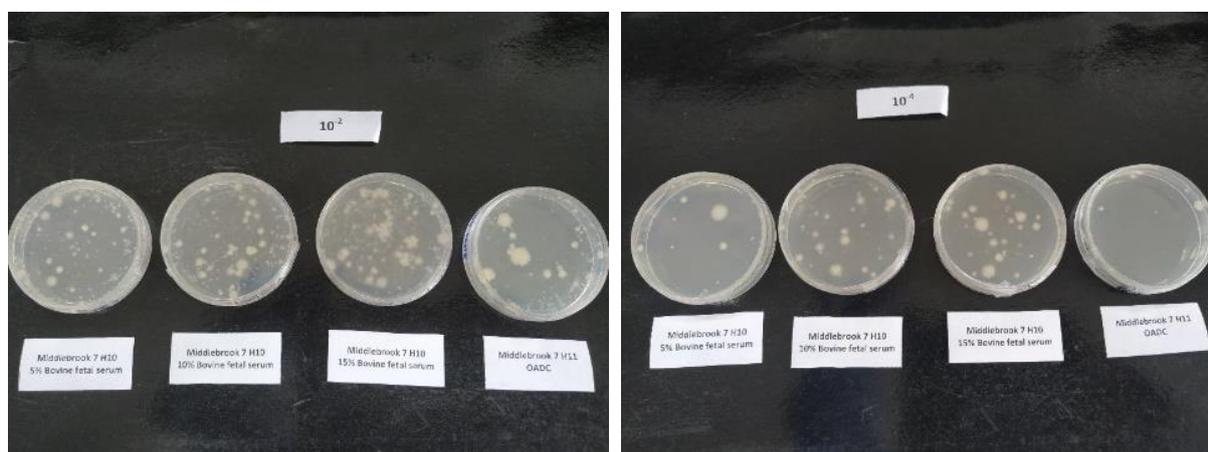


Figura 2. Imagem comparativa das placas de Middlebrook 7H10 suplementadas com 5, 10 e 15% de SFB, e Middlebrook 7H11 suplementado com OADC nas diluições 10^{-2} e 10^{-4} , após 14 dias de semeadura.

A técnica de enriquecimento em meios de cultura é usada há mais de 120 anos. Ela consiste em incubar a amostra em um meio que estimula o crescimento do organismo de interesse, enquanto inibe o crescimento de outros. Desta forma, é possível isolar colônias puras de microrganismos a partir de amostras nos quais ele representa apenas uma pequena porcentagem da flora total. Em muitos casos, o isolamento primário em um meio enriquecido é o primeiro passo necessário para aumentar o pequeno número de organismos presentes na amostra inicial (Green, 2021), como ocorre com frequência em lesões recentes e paucibacilares de tuberculose bovina, acarretando resultados falso-negativos.

Ao longo dos anos, vários meios de cultura foram desenvolvidos para o isolamento de micobactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) a partir de espécimes clínicos (Joloba et al., 2014). Os primeiros meios utilizados no cultivo de micobactérias eram formulações à base de ovos, como os meios de Lowenstein-jensen, Petragnani e Stonebrink (Ahuja et al., 1967; DIFCO, 2009). Posteriormente Dubos, Middlebrook e Cohn desenvolveram e aprimoraram novas formulações a base de ácido oleico e albumina, visando diminuir os agentes tóxicos para os bacilos, e obter crescimentos mais rápidos e com menos contaminantes daqueles então obtidos nos meios a base de ovos. Desta forma, foram originados os meios de Middlebrook 7H10 e 7H11, que contém em sua formulação, sais inorgânicos, glicerol como fonte de carbono, ácido oleico, assim como albumina, catalase e corante verde malaquita, que funciona como inibidor de crescimentos de outros microrganismos contaminantes, e cuja diferença consiste na adição de hidrolisado de caseína ao Middlebrook 7H11, para melhorar a recuperação de estipes mais fastidiosas pertencentes ao completo MTB. As vantagens do meio à base de agar além da precocidade de detecção das micobactérias é evitar a necessidade de uso de ovos orgânicos, maior facilidade de visualização e individualização das colônias na superfície larga e transparente do agar mesmo na presença de contaminantes (Joloba et al., 2014).

Suplementos que promovem o crescimento são amplamente utilizados para melhorar o rendimento da cultura de organismos exigentes (Brittle et al., 2009). O Middlebrook OADC Enrichment é um suplemento muito utilizado no enriquecimento dos meios Middlebrook 7H10 e 7H11, entre outros. Ele consiste em uma solução contendo albumina sérica fração V em maior concentração (protege o bacilo contra agentes tóxicos); ácido oléico (requerido no metabolismo da micobactéria); catalase (destrói peróxidos tóxicos do meio), cloreto de sódio (mantém o equilíbrio osmótico) e dextrose (fonte de energia) (DIFCO, 2009). O sangue é um produto gerado durante o abate animal, e a maior representatividade ocorre na produção de bovinos, suínos, e aves (Lee et al., 2022). O soro fetal bovino é a fração líquida do coágulo obtido de fetos bovinos, livre de células, fibrinas e fatores de coagulação, porém com grande número de fatores nutricionais e macromoléculas essenciais para o crescimento da célula. Assim como ocorre com o OADC, a albumina sérica bovina é o maior componente do SFB. Os fatores de crescimento presentes no SFB, são essenciais para a manutenção e crescimento das culturas de células e outras análises experimentais (Jochems et al., 2002; Lee et al., 2022; Pilgrim et al., 2022; Rauch et al., 2011).

No presente experimento não foram constatadas perdas por contaminação nos meios de cultura em nenhum dos grupos estudados. Embora os dois meios de cultura estudado tenham corante de verde malaquita como agente de prevenção de contaminação por outros microrganismos, é mais provável que a ausência de placas contaminadas se deva a utilização de uma cultura pura da estirpe *M. bovis* AN5 diluída em solução salina estéril, sem a presença de matéria orgânica e debris celulares, o que ocorre quando é feita a inoculação nos meios de amostras sugestivas de tuberculose bovina que são submetidas à manipulação de processamento (corte, maceração e descontaminação) previamente a sementeira (OIE, 2022).

O isolamento do *M. bovis* ainda é considerado internacionalmente o método padrão-ouro no diagnóstico da tuberculose bovina. O crescimento do *M. bovis* nos meios tradicionais à base de ovos pode demorar até três meses (Borham et al., 2022), o que gera um estímulo ao desenvolvimento e aprimoramento de métodos diagnósticos que acelerem os resultados. Neste estudo, os meios de Middlebrook 7H10 e 7H11, permitiram a visualização macroscópica das micobactérias em camada delgada com apenas duas semanas após a sementeira, corroborando os resultados relatados por (Dib et al., 2006; Marcondes et al., 2006; Mejia et al., 1999; Robledo et al., 2006; Rosário et al., 2014; Silva et al., 2007), em relação ao Middlebrook 7H11 em camada delgada. Os resultados obtidos com o Middlebrook 7H10 suplementados com SFB e glicose em camada delgada, demonstraram ainda maior precocidade na detecção de colônias, quando utilizadas maiores concentrações de SFB, que foram visualizadas macroscopicamente já na primeira semana, demonstrando grande potencial para uso na rotina diagnóstica. O soro fetal bovino é utilizado em uma ampla gama de aplicações na pesquisa biomédica e farmacêutica (Muniaraj et al., 2007; Pilgrim et al., 2022). A utilização do SFB no enriquecimento de meios de cultura destinados ao cultivo de micobactérias pertencentes ao Complexo MTB já foi descrita por Fonseca et al. (1985) para o crescimento do *Mycobacterium tuberculosis*. Na concentração utilizada, os resultados demonstraram equivalência na recuperação de micobactérias com

o meio comercial, tornando-se uma ótima alternativa para laboratórios de micobacteriologia. O SFB tem como vantagens a maior disponibilidade no mercado, e menor custo de aquisição, em relação ao OADC que é importado e portanto sujeito à disponibilidade de venda, variações na cotação do dólar e condições relativas a importação, que podem variar em função das oscilações do cenário econômico mundial, retenção e demora de órgãos fiscalizadores, chegando para o consumidor final muitas vezes com a data de validade próxima ao vencimento, fatores estes que limitam seu uso em países em desenvolvimento como o Brasil, que justamente tem maiores índices de prevalência da doença.

Conclusão

Apesar das questões éticas e bem-estar animal relacionadas sobre o abate de fêmeas gestantes e a colheita do sangue fetal, o SFB pode ser considerado como uma alternativa de suplementação do meio Middlebrook 7H10, diminuindo o tempo e os custos de detecção de *M. bovis*, e sendo, portanto, indicado para testes em pesquisas, e diagnóstico de amostras sugestivas de tuberculose bovina.

Agradecimentos

Agradecemos ao Professor Rodrigo Barbosa de Souza, docente do Curso de Medicina da Faculdade Santa Marcelina pela valiosa contribuição nas análises estatísticas e demais sugestões para elaboração deste manuscrito.

Referências bibliográficas

- Admassu, B., Kebede, E., & Shite, A. (2015). Review on bovine tuberculosis. *Journal of Veterinary Advances*, 5(3), 841. <https://doi.org/20150315015831>.
- Ahuja, O. P., Bal, A., & Nath, K. (1967). Middlebrook-Dubos test in experimental ocular tuberculosis. *American Journal of Ophthalmology*, 63(6). [https://doi.org/10.1016/0002-9394\(67\)93661-6](https://doi.org/10.1016/0002-9394(67)93661-6).
- Arnot, L. F., & Michel, A. (2020). Challenges for controlling bovine tuberculosis in South Africa. In *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* (Vol. 87, Issue 1). <https://doi.org/10.4102/ojvr.v87i1.1690>.
- Bertollo, D. M. B., & Montanha, J. O. M. (2022). Experiência exitosa no isolamento axênico de *Leishmania infantum* em meio de cultura enriquecido com sangue de equino. *PUBVET*, 16(4), 1–9. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v16n04a1090.1-9>.
- Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2020). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: The evolution of culture media in clinical microbiology. In *New Microbes and New Infections* (Vol. 34). <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100622>.
- Borham, M., Oreiby, A., El-Gedawy, A., Hegazy, Y., Khalifa, H. O., Al-Gaabary, M., & Matsumoto, T. (2022). Review on bovine tuberculosis; na emerging disease associated with multidrug-resistant Mycobacterium species. *Pathogens*, 11(715), 2–25. <https://doi.org/10.3390/pathogens11070715>.
- Brittle, W., Marais, B. J., Hesseling, A. C., Schaaf, H. S., Kidd, M., Wasserman, E., & Botha, T. (2009). Improvement in mycobacterial yield and reduced time to detection in pediatric samples by use of a nutrient broth growth supplement. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(5). <https://doi.org/10.1128/JCM.02320-08>.
- Carneiro, P. A. M., Takatani, H., Pasquatti, T. N., Silva, C. B. D. G., Norby, B., Wilkins, M. J., Zumárraga, M. J., Araujo, F. R., & Kaneene, J. B. (2019). Epidemiological study of Mycobacterium bovis infection in buffalo and cattle in Amazonas, Brazil. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 434. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00434>.
- Corner, L. A. L., Gormley, E., & Pfeiffer, D. U. (2012). Primary isolation of Mycobacterium bovis from bovine tissues: Conditions for maximising the number of positive cultures. *Veterinary Microbiology*, 156(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.016>.
- Dib, C. C. (2023). Utilização do MALDI-TOF MS para identificação de micobactérias em amostras clínicas de animais. *PUBVET*, 17(7), e1414. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v17n7e1414>.
- Dib, C. C., Morais, Z. M., Souza, G. O., Amaku, M., Benites, N. R., & Pinheiro, S. R. (2006). Utilização de uma técnica rápida para diagnóstico de Mycobacterium bovis em amostras de leite experimentalmente inoculadas. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 73(2). <https://doi.org/10.1590/1808-1657v73p1492006>.

- DIFCO. (2009). Manual of microbiological culture media. In *Chemistry & amp;*
- Dinno, A. (2015). Nonparametric pairwise multiple comparisons in independent groups using Dunn's test. *Stata Journal*, 15(1). <https://doi.org/10.1177/1536867x1501500117>.
- Fonseca, L. S., Silva, M. G., & Gontijo Filho, P. P. (1985). Avaliação da eficiência do meio 7H10 com soro fetal bovino no crescimento de microbactérias do complexo M tuberculosis. *Revista de Microbiologia*, 16(4), 272–274.
- Gill, A. (2017). The importance of bacterial culture to food microbiology in the age of genomics. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00777>.
- Grange, J. M., & Yates, M. D. (1994). Zoonotic aspects of Mycobacterium bovis infection. *Veterinary Microbiology*, 40(1–2), 137–151.
- Green, L. H. (2021). Culturing and preserving microorganisms. In *Practical Handbook of Microbiology*. <https://doi.org/10.1201/9781003099277-4>.
- Hoffmann, E. R., Buss, B., Pereira, M. M., Reis, D., Teixeira, M. C., Moscon, L. A., Rondon, D. A., & Pereira, C. M. (2022). Tuberculose em bovinos no noroeste do Espírito Santo. *PUBVET*, 16(6), 1–5. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v16n06a1138.1-5>.
- Issa, M. A., Soares Filho, P. M., Fonseca Júnior, A. A., Hodon, M. A., Santos, L. C., Reis, J. K. P. dos, & Leite, R. C. (2017). Comparative study of Mycobacterium bovis primary isolation methods. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(1). <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.07.026>.
- Jochems, C. E. A., Van der Valk, J. B. F., Stafleu, F. R., & Baumans, V. (2002). The use of fetal bovine serum: Ethical or scientific problem? *Alternatives to Laboratory Animals*, 30(2). <https://doi.org/10.1177/026119290203000208>
- Joloba, M. L., Johnson, J. L., Feng, P. J. I., Bozeman, L., Goldberg, S. V., Morgan, K., Gitta, P., Boom, H. W., Heilig, C. M., Mayanja-Kizza, H., & Eisenach, K. D. (2014). What is the most reliable solid culture medium for tuberculosis treatment trials? *Tuberculosis*, 94(3). <https://doi.org/10.1016/j.tube.2014.03.002>
- Krajewska-Wedzina, M., Augustynowicz-Kopec, E., Weiner, M., & Szulowski, K. (2018). Treatment for active tuberculosis in giraffe (*Giraffa camelopardalis*) in a Zoo and potential consequences for public health-case report. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 25(4), 593–595. <https://doi.org/10.26444/aaem/75685>.
- Lee, D. Y., Lee, S. Y., Yun, S. H., Jeong, J. W., Kim, J. H., Kim, H. W., Choi, J. S., Kim, G. D., Joo, S. T., Choi, I., & Hur, S. J. (2022). Review of the Current Research on Fetal Bovine Serum and the Development of Cultured Meat. In *Food Science of Animal Resources* (Vol. 42, Issue 5). <https://doi.org/10.5851/kosfa.2022.e46>
- Marcondes, A. G., Shikama, M. D. L. M., Vasconcellos, S. A., Benites, N. R., Morais, Z. M. de, Roxo, E., Dias, R. A., Leão, S. L. P. C., & Pinheiro, S. R. (2006). Comparação entre a técnica de cultivo em camada delgada de ágar Middlebrook 7H11 e meio de Stonebrink para isolamento de Mycobacterium Bovis em amostras de campo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 43(3). <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26484>
- Mejia, G. I., Castrillon, L., Trujillo, H., & Robledo, J. A. (1999). Microcolony detection in 7H11 thin layer culture is an alternative for rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 3(2).
- Muniaraj, M., Lal, C. S., Kumar, S., Sinha, P. K., & Das, P. (2007). Milk of cow (*Bos taurus*), buffalo (*Bubalus bubalis*), and goat (*Capra hircus*): a better alternative than fetal bovine serum in media for primary isolation, in vitro cultivation, and maintenance of *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(4), 1353–1356.
- Nascimento, A. J. S., & Nardi Júnior, G. (2022). Programa de controle e erradicação da brucelose e tuberculose animal. *Tekhne e Logos*, 13(2), 34–43.
- Neves, E. D., Mezalira, T. S., Dias, E. H., Dourado, M. R., Paula, M. K., Gusman, C. R., Silva Caetano, I. C., Beltrami, J. M., & Otutumi, L. K. (2017). Lesões de tuberculose bovina em abatedouros-frigoríficos no Brasil: Bibliometria. *Jornal Interdisciplinar de Biociências*, 2(2), 22–27. <https://doi.org/10.26694/jibi.v2i2.6171>.

- OMSA. (2022). *Tuberculose bovina*. OMSA.
- Pérez-Lago, L., Navarro, Y., & García-de-Viedma, D. (2014). Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*: a review. *Research in Veterinary Science*, 97, S94–S100.
- Pilgrim, C. R., McCahill, K. A., Rops, J. G., Dufour, J. M., Russell, K. A., & Koch, T. G. (2022). A Review of Fetal Bovine Serum in the Culture of Mesenchymal Stromal Cells and Potential Alternatives for Veterinary Medicine. In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.859025>.
- OIE (World Organisation for Animal Health). Chapter 3.4.6. (2018). Bovine tuberculosis. In: *Terrestrial Manual*, Disponível em: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.06_BOVINE_TB.pdf.
- OIE (World Organisation for Animal Health). Chapter 3.1.13 (2022). Bovine tuberculosis. In: *Terrestrial Manual*, Disponível em: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.13_Mammalian_tuberculosis.pdf.
- Poester, F., Figueiredo, V. C. F., Lôbo, J. R., Gonçalves, V. S. P., Lage, A. P., Roxo, E., Mota, P. M. P. C., Müller, E. E., & Ferreira Neto, J. S. (2009). Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61, 1–5.
- Rauch, C., Feifel, E., Amann, E.-M., Peter Spötl, H., Schennach, H., Pfaller, W., & Gstraunthaler, G. (2011). Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media. *ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation*, 28(4), 305–316.
- Robledo, J. A., Mejía, G. I., Morcillo, N., Chacón, L., Camacho, M., Luna, J., Zurita, J., Bodon, A., Velasco, M., Palomino, J. C., Martin, A., & Portaels, F. (2006). Evaluation of a rapid culture method for tuberculosis diagnosis: A Latin American multi-center study. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 10(6).
- Rosário, T. R., Dib, C. C., Roxo, E., Pinheiro, S. R., Vasconcellos, S. A., & Benites, N. R. (2014). Thin layer microcolony culture associated with PCR for early identification of *Mycobacterium bovis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1). <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000038>.
- Sabagh, B. P., Souto, A. S. S., Reis, L. M., Silva, S. A., Pereira, D. C. R., Neves, M. C., Pinheiro, R. R., Duarte, R. S., Miyazaki, N. H. T., & Villas Bôas, M. H. S. (2012). Comparative study with two different enrichments in the culture media used in the disinfectant efficacy assay. *Journal of Microbiological Methods*, 88(2). <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.12.004>.
- Silva, P. E. A., Wiesel, F., Boffo, M. M. S., Von Groll, A., Mattos, I. G., Mejia, G., & Robledo, J. (2007). Microcolony detection in thin layer culture as an alternative method for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(3). <https://doi.org/10.1590/s1517-83822007000300007>.
- Teppawar, R. N., Chaudhari, S. P., Moon, S. L., Shinde, S. V., Khan, W. A., & Patil, A. R. (2018). Zoonotic tuberculosis: A concern and strategies to combat. In *Basic Biology and Applications of Actinobacteria*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76802>.
- Valente, L. C. M., Vale, S. M. L. R., & Braga, M. J. (2011). Determinantes do uso de medidas sanitárias de controle da brucelose e tuberculose bovinas. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, 49(1), 215–231.
- Zimpel, C. K., Patané, J. S. L., Guedes, A. C. P., Souza, R. F., Silva-Pereira, T. T., Camargo, N. C. S., de Souza Filho, A. F., Ikuta, C. Y., Neto, J. S. F., & Setubal, J. C. (2020). Global distribution and evolution of *Mycobacterium bovis* lineages. *Frontiers in Microbiology*, 11, 843. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00843>.
- Universidad de las Naciones Unidas. (1998). 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); 1998:18-21.

Histórico do artigo:**Recebido:** 23 de abril de 2024**Aprovado:** 14 de maio de 2024**Licenciamento:** Este artigo é publicado na modalidade Acesso Aberto sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 (CC-BY 4.0), a qual permite uso irrestrito, distribuição, reprodução em qualquer meio, desde que o autor e a fonte sejam devidamente creditados.