

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL

CAMPUS DE PATOS-PB

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Sensibilidade *in vitro* do *Mycoplasma agalactiae* isolados de caprinos a diferentes antimicrobianos

Rodrigo Vieira Correia de Araújo

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL

CAMPUS DE PATOS-PB

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Sensibilidade *in vitro* do *Mycoplasma agalactiae* isolado de caprinos a diferentes antimicrobianos

Rodrigo Vieira Correia de Araújo

Graduando

Prof. Dr. Edisio Oliveira de Azevedo

Orientador

Patos

Maior de 2011

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO CSTR /
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

A663s
2011

Araújo, Rodrigo Vieira Correia de

Sensibilidade *invitro* do *Mycoplasma agalactiae* isolado de caprinos a diferentes antimicrobianos / Rodrigo Vieira Correia de Araújo. - Patos - PB: FCG/PPGMV, 2011.

33f.: il. Color.

Inclui Bibliografia.

Orientador: Edisio Oliveira de Azevedo

(Graduação em Medicina Veterinária). Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1-. Microbiologia – Caprinos. 2- Antibiótico - Resistência. 3- Agalaxia Contagiosa.

CDU: 579:616.3

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL

CAMPUS DE PATOS-PB

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

RODRIGO VIEIRA CORREIA DE ARAÚJO

Graduando

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

APROVADO EM/...../.....

MÉDIA: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edisio Oliveira de Azevedo

Nota _____

Prof. Dr. Albério Antônio de Barros Gomes

Nota _____

Msc Ana Cláudia Campos

Nota _____

*Dedico este trabalho a toda minha família,
principalmente a meu pai e a minha mãe,
sem vocês eu não teria conseguido!*

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Como não poderia ser diferente, agradeço primeiro a **DEUS**, pois se tudo está se tornando possível, foi porque **ELE** permitiu, sempre sendo o apoio nas horas mais difíceis, e servindo de inspiração para que tudo pudesse ser concretizado. Obrigado Senhor, pois é tudo em minha vida.

Aos meus pais, faltam palavras para agradecer, pois não bastasse terem me dado o dom da vida, me ensinaram a vivê-la com o que existe de mais intenso. Sempre apoiando e confiando no “caçula” . Mainha, quantas barreiras e mudanças nesses 5 anos, para que hoje pudéssemos está brindando esse momento único em minha vida. Painho, sempre com aquela palavra coerente e conselhos fundamentais para que me tornasse o homem que hoje sou. Enfim, são a vocês dois meus agradecimentos maiores, pois não bastasse o lado financeiro, sempre me apoiaram em qualquer decisão tomada. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos Mariana e Rannieri, sempre me orientando e dando conselhos que levarei para o resto da vida. “Nanáe”, sempre me dando puxões de orelha, gerando muitas vezes discussões, mas logo estávamos rindo de tudo. “Puliça”, me deu um lar aqui em Patos, e sempre me deu todos os motivos para que eu pudesse dizer a todos que tenho orgulho do meu irmão. Não poderia esquecer da pequena Mel, que contagia à todos com essa alegria contagiante , hein danadinha! Portanto, foram vocês que me fizeram entender, sem que ninguém me explicasse, o significado da palavra irmão.

Sou muito grato a minhas queridas e amadas tias Bebé. Cota e Detinha, que me abrigaram no momento mais difícil, que foi o da chegada em uma cidade que não conhecia, e sempre me cobriram se atenção, carinho e conselhos sábios. Muito obrigado por tudo!

Meu querido e eterno padrinho Aécio, que nas suas passagens por Patos, não perdia a oportunidade de me mostrar o caminho correto a seguir, e me contagiando com sua alegria, fazendo com que eu ganhasse mais forças para seguir em frente. Valeu Aecim, e que Deus o tenha.

Ao meu amor, Nayara (Preta), você entrou na minha vida e foi um verdadeiro anjo que Deus fez com que cruzasse o meu caminho. Obrigado pelos momentos felizes que me proporciona, e pelo apoio nos momentos mais complicados da vida acadêmica e pessoal. Sou muito grato a você. Te amo, meu amor!

Ao meu filho Bernardo, que chegou com uma alegria que contagia a todos. Você faz com que eu busque forças onde não existem, e lutarei para que possamos viver em harmonia e felizes. Te amo filho!

A todos que dividiram morada comigo, Aldenir, Azevedo, Daniel, Diego, Jefferson, Paulo, Pedro, Ricardo, passamos por muitos momentos felizes. Alguns já estão distantes, exercendo dignamente a profissão e outros permanecem por perto, mas com certeza podemos todos bater no peito e dizer que temos amigos de verdade. Valeu pela força!

Aos que contribuíram para realização deste trabalho, Ana, Aline Antas, Aline Guedes, Natanael, prof. Márcia, sem dúvida alguma, nada estaria sendo concretizado sem a total ajuda que me prestaram. Muitíssimo obrigado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Edisio Oliveira de Azevedo, pela paciência e total disponibilidade para que me passasse seus conhecimentos e apoio.

A minha turma 2006.2, que no começo era um grupo de desconhecidos, que se tornou em um grupo de amigos, e porque não dizer irmão. Levarei vocês pro resto da vida em meu coração.

Enfim, a todos os que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho pudesse ser realizado.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Placas semeadas em meio sólido e incubadas em microaerofilia.....	24
Figura 2. Colônia sugestiva de <i>Mycoplasma</i> spp em meio Hayflick modificado sólido	24

Lista de Gráficos

	Pág.
Gráfico 1 . Participação percentual das regiões brasileiras no rebanho	
Caprino	13
Gráfico 2 . Comparativo das diferentes CIM's, e seus respectivos valores	
e antibióticos.....	26

Lista de Tabelas

Pág.

Tabela 1. Doenças mais frequentes em caprinos e ovinos e espécies de <i>Mycoplasma</i> relacionadas	17
--	-----------

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE GRÁFICOS	7
LISTAS DE TABELAS	8
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Agente etiológico.....	15
2.2 Histórico	16
2.3 Micoplasmoses em caprinos	16
2.3.2 Agalaxia Contagiosa dos Ovinos e Caprinos	17
2.3.3 Ceratoconjuntivite Infecciosa dos Caprinos.....	18
2.3.4 Pleuropneumonia Contagiosa dos Caprinos.....	19
2.5 Diagnóstico.....	20
2.6 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Local de realização	23
3.2 Coleta das amostras	23
3.3 Processamento das amostras.....	23
3.4 Preparação das diferentes diluições das drogas	25

3.5	Antibiograma.....	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5	CONCLUSÃO	28
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

RESUMO

ARAÚJO, RODRIGO VIEIRA CORREIA DE. *Sensibilidade in vitro do Mycoplasma agalactiae isolado de caprinos a diferentes antimicrobianos.* 2011 33p. Monografia (Conclusão do curso de Medicina Veterinária) – UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE – UFCG. Patos, 2011.

O presente trabalho teve como objetivo, testar a sensibilidade do *Mycoplasma agalactiae* a diferentes antimicrobianos em diferentes concentrações, determinando os mais eficientes e suas respectivas Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM's). Quatro amostras foram submetidas ao antibiograma pelo método de diluição. Foram avaliados a Doxiciclina, Enrofloxacina, Gentamicina, Tilosina, Oxitetraciclina, em concentrações que variaram de 16 - 0,031µg/ml, e um Bioterápico na diluição 30 a base de *Mycoplasma agalactiae* que variou da sua concentração inicial até a proporção 1:512. A Tilosina mostrou-se mais efetiva com CIM de 0,0625µg/ml, seguida da Enrofloxacina e Gentamicina que apresentaram CIM de 0,125µg/ml.

Palavras-chave: Caprina, resistência, antibióticos.

ABSTRACT

ARAÚJO, RODRIGO VIEIRA CORREIA DE. **Susceptibility *in vitro* of the *Mycoplasma agalactiae* isolated of goats the different antimicrobials.** 2011 33p. Monografia (Conclusão do curso de Medicina Veterinária) – UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE – UFCG. Patos, 2011.

The present work had as objective, to test the susceptibility of the *Mycoplasma agalactiae* to different antimicrobials in different concentrations, determining the most efficient and your respective minimum inhibitory concentrations (MICs). Four samples were submitted to the susceptibility testing by the dilution method. They were appraised Doxycycline, Enrofloxacin Gentamycin, Tylosin and Oxytetracycline in concentrations that varied of 16 to 0.031µg/ml, and *Mycoplasma agalactiae* biotherapeutic in the dilution 30D that varied from your initial concentration (pure) to 1:512. Tylosin was shown more it executes with 0.0625µg/ml MIC, followed by Enrofloxacin and Gentamycin that presented 0.125µg/ml MIC.

Key-words: Caprine, resistance, antibiotic.

1 INTRODUÇÃO

O efetivo de caprinos no Brasil passou de 6.590.646 cabeças em 1996, para 7.109.052 cabeças em 2006, representando assim um incremento de 8% no período acima, o que representa uma considerável expansão da caprinocultura brasileira nos últimos anos. Quanto à Região Nordeste, que em 1995 possuía 6.176.457 cabeças, em 2006 passou a abrigar 6.452.373 animais, apresentando um crescimento de 4,5% no número de animais. Ressalte-se que no Nordeste estão concentrados cerca de 91% dos caprinos do Brasil, conforme relata o gráfico 1 (IBGE,2006).

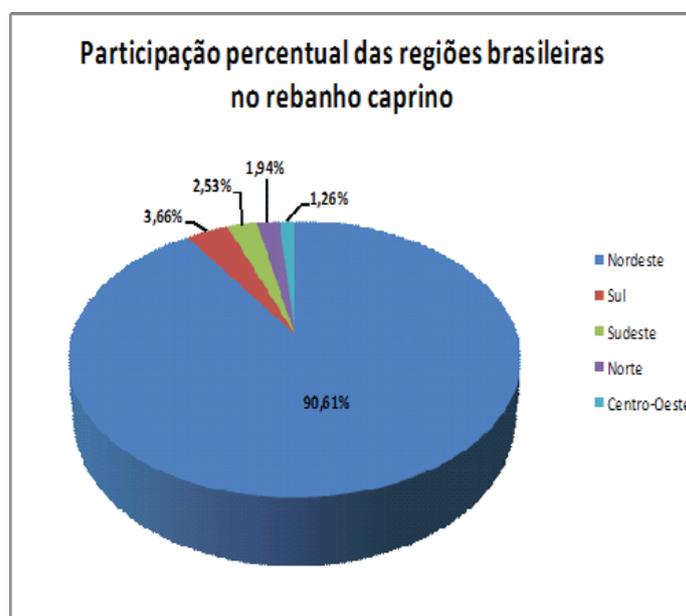


Gráfico 1: Percentual dos rebanhos caprinos de acordo com as regiões do Brasil.
Fonte: IBGE,2006.

É de extrema importância a adoção de medidas sanitárias e de controle de doenças, mas tais medidas, muitas vezes não são costumeiramente aplicadas, o que torna o surgimento e a manutenção de alguns agentes, como o *Mycoplasma sp.*, acontecimentos constantes, principalmente na região Nordeste.

Os micoplasmas são os menores organismos de vida livre, sendo alguns tão pequenos que possuem apenas 0,3 μm de diâmetro. Sua característica mais marcante é a ausência de parede celulares e, decorrente dessa característica os micoplasmas não se

coram pela coloração de Gram, e os antibióticos que inibem a síntese da parede celular, por exemplo, penicilinas e cefalosporinas, não são efetivos.

Essa classe de minúsculos organismos dá origem a um grupo de doenças denominadas micoplasmoses, de caráter subagudo ou crônico. É importante salientar que existem várias espécies de micoplasmas que não são patogênicos, sendo importante isolá-los cuidadosamente dos patogênicos, para que não seja agregado aos mesmos, valores fora da realidade.

Classicamente, o diagnóstico das micoplasmoses é feito pelo isolamento e identificação baseada no perfil bioquímico e inibição de crescimento das colônias em meio sólido. A utilização da biologia molecular, em particular o PCR também tem sido adotada para identificação de espécies estreitamente relacionadas, quando reações cruzadas são observadas nos testes sorológicos.

O controle das micoplasmoses consiste principalmente na adoção de medidas sanitárias eficientes, e o seu tratamento inclui a utilização de alguns antibacterianos. A falta de padronização dos testes *in vitro*, bem como os resultados instáveis, é um fator limitante, fornecendo esse estudo portanto, algumas informações que auxiliarão na escolha do método adequado.

Portanto, são estudos como este, que poderão levar a algumas vertentes para a eliminação e/ou controle das micoplasmoses. Neste sentido, o referido trabalho tem como objetivo avaliar a resistência do agente *Mycoplasma* spp. isolado de caprinos naturalmente infectados a diferentes agentes antibacterianos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agente Etiológico

Os micoplasmas são os menores organismos celulares vivos e os mais simples. A célula contém o mínimo necessário para sua multiplicação: membrana citoplasmática, ribossomos e DNA (TRABULSI, 2005), e muitas espécies requerem colesterol para crescimento, um requerimento único entre os procariotas (RAZIN et al. 1998).

O nome micoplasma foi usado para denotar os microrganismos da classe *Mollicutes*, mas sugeriu-se o uso do termo *molicutes* (*mollis* = macio, *cútis* = derme), como nome trivial, para designar qualquer microrganismo desta classe, e o termo micoplasma utilizado quando referido aos membros do gênero *Mycoplasma* (RAZIN et al. 1998).

A única propriedade que caracteriza estes microrganismos e os separa das bactérias é a ausência de parede celular rígida. Ocorrem como parasitas ou saprófitas, de vários animais, homem e plantas. São células pleomórficas de 0,2 a 0,8 μm de diâmetro, têm a membrana celular trilaminar com espessura de 8 a 10 nm. A divisão é feita por fissão binária. São melhor visualizados ao campo escuro e microscopia de fase. (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

Esses procariontes pertencem à Divisão *Tenericutes* e à Classe dos *Mollicutes*, termo proposto em 1967, como nome da classe que taxonomicamente se divide em: cinco ordens (*Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales*, *Anaeroplasmatales* e *Incertae sedis*), seis famílias (*Mycoplasmataceae*, *Entomoplasmataceae*, *Spiroplasmataceae*, *Acholeplasmataceae*, *Anaeroplasmataceae* e *Erysipelothrichaceae*), 14 gêneros (*Mycoplasma*, *Eperythrozoon*, *Haemobartonella*, *Ureaplasma*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*, *Erysipelothrix*, *Bulleidia*, *Holdemania* e *Solobacterium*) e aproximadamente 180 espécies, dentre as quais 102 pertencem ao gênero *Mycoplasma* (TIMENETSKY, 2007).

A temperatura de aproximadamente 37°C é indicativa do “habitat” natural dos mollicutes que corresponde à dos mamíferos e pássaros. Em meio sólido, os micoplasmas, ao serem visualizados ao microscópio, iniciam o crescimento para dentro do ágar na parte central da colônia, conferindo aspecto de ovo frito ou mamilar, e induzindo a formação de filmes e manchas no meio. Em caldo, podem não turvar o meio (AZEVEDO, 2007).

2.2 Histórico

Os micoplasmas foram descobertos em fins do século passado como causa da Pleuropneumonia de bovinos. Posteriormente, foram encontrados em uma grande variedade de animais. Como o micoplasma da pleuropneumonia era chamado de organismo da pleuropneumonia (*pleuropneumonia organism, PPO*), os micoplasmas descobertos posteriormente passaram a ser denominados PPLO (*pleuropneumonia like organisms*), ou seja, organismo semelhante ao da pleuropneumonia. Esta sigla ainda é muito utilizada, embora o termo micoplasma esteja atualmente bastante difundido no meio científico. (TRABULSI, 2005).

2.3 Micoplasmoses em caprinos

As micoplasmoses dos caprinos foram classificadas como um dos mais importantes grupos de doenças desses animais, resultando em significativas perdas econômicas no Continente Africano e em alguns países da Europa como Grécia, França, Itália, Espanha e, também, nos Estados Unidos da América, na Índia e em Israel. Nesses países os levantamentos epidemiológicos demonstraram que a infecção tem grande morbidade, atingindo, às vezes, até 100% do rebanho, com grandes índices de mortalidade (DAMASSA *et al.*, 1992).

No Brasil, dois fatos foram considerados preocupantes, a gravidade da doença nos rebanhos, a partir do momento em que a infecção pelo *Mycoplasma* spp. manifesta-

se, e em segundo, o número inexpressivo de relatos de casos clínicos ou de pesquisas científicas, considerando o impacto econômico que envolve as micoplasmoses, sobretudo, em pequenos ruminantes (RIBEIRO *et al.*, 1995).

Os micoplasmas foram caracterizados como agentes etiológicos de três doenças infecto-contagiosas específicas dos caprinos: a agalaxia contagiosa dos caprinos; a pleuropneumonia contagiosa caprina e a ceratoconjuntivite infecciosa dos caprinos (ROSENDAL, 1994), além das mastites, conforme presente na Tabela 1.

Tabela 1. Doenças mais freqüentes em caprinos e ovinos e espécies de *Mycoplasma* relacionadas.

Doença	<i>Mycoplasma</i> spp.
Agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos	<i>M. agalactiae</i> (principal) <i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> LC (Large Colony); <i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides capri</i> ; <i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i> ; <i>M. putrefaciens</i>
Pleuropneumonia contagiosa caprina	<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i>
Ceratoconjuntivite infecciosa	<i>M. conjunctivae</i> ; <i>Acholeplasma oculi</i>

Fonte: Adaptado de AZEVEDO, 2005

2.3.2 Agalaxia Contagiosa dos Ovinos e Caprinos (AC)

O único diagnóstico de AC no Brasil em caprinos tinha sido relatado em 1942, quando foi descrito um surto da doença ocorrido no estado de São Paulo por Penha e D'Ápice. Todavia, naquele período, o microrganismo isolado, apesar de apresentar características dos micoplasmas, não foi identificado (PENHA e D'ÁPICE, 1942). Considerando ainda que, casos de AC, normalmente não cursam com pneumonia e que *M. agalactiae* não fermenta a glicose, ao contrário do observado pelos autores, pode-se deduzir que a enfermidade descrita deveu-se a outra espécie de *Mycoplasma* (AZEVEDO, 2005). Passados 60 anos, *M. agalactiae* foi isolado de caprinos leiteiros

com sinais clínicos característicos no estado da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte (AZEVEDO et al., 2002 e NASCIMENTO et al., 2002).

Clinicamente, a ACOC se manifesta com mastite, seguida de agalaxia, artrite e ceratoconjuntivite. Os sinais clínicos não são típicos, mas a súbita redução na produção de leite pode ser um indicativo da infecção, devendo-se isolar o microrganismo dos animais doentes para estabelecer o diagnóstico definitivo. O agente etiológico da doença é o *M. agalactiae*. Entretanto, outras espécies podem estar envolvidas, como o *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC (Large colony), *M. capricolum* subsp. *capricolum* (LEVISOHN et al., 1991; EGWU et al., 2001), *M. mycoides* subsp. *capri* (REAL et al. 1994) e *M. putrefaciens* (EGWU et al., 2001; 14 GIL et al., 2003). Este último produz sinais clínicos semelhantes ao *M. agalactiae* em caprinos (MADANAT et al., 2001).

A Agalaxia Contagiosa dos Ovinos e Caprinos oficialmente ocorre em todos os continentes com exceção da Oceania (OIE, 2004), mas modificações são comprovadas quando se confrontam dados oficiais com publicações científicas, provavelmente devido às deficiências de sistemas de informação de alguns países (AZEVEDO, 2005).

2.3.3 Ceratoconjuntivite infecciosa dos caprinos

Foi descrita como enfermidade infecto-contagiosa específica dos caprinos, com quadro sintomático caracterizado por ceratite, conjuntivite, secreção ocular sero-mucosa com aglutinação de pelos da região periocular, evoluindo inúmeras vezes para ulcerações da córnea, sendo os agentes etiológicos dessa enfermidade nos caprinos identificados como: *Mycoplasma conjunctivae* e *Chlamydia psittaci* (SMITH & SHERMAN, 1994).

Em caprinos, sendo excluídos, o *Mycoplasma agalactiae*, o *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* e o *Mycoplasma conjunctivae*, sendo estes os que foram considerados como extremamente contagiosos, as demais espécies patogênicas do gênero *Mycoplasma* seriam capazes de provocar doença, somente em condições, nas quais houvesse quebra de resistência orgânica ou comprometimento do sistema imune. E, assim sendo, a doença acometeria alguns animais dos rebanhos, de forma individualizada. Raramente, em situações esporádicas, a enfermidade poderia acometer

maior número de animais, caracterizando ocorrência de surtos, justificando-se, mais uma vez, o pequeno número de relatos da enfermidade (NASCIMENTO *et al.* 1986).

No Brasil, *M. conjunctivae* foi isolado de casos naturais em caprinos do Estado de São Paulo (GREGORY *et al.*, 2003). Fatores predisponentes como estação do ano, presença de moscas, idade do animal e traumatismos parecem contribuir para a ocorrência da infecção, mas a presença da bactéria é determinante na gravidade da doença (ALMEIDA NETO, 2003).

As micoplasmoses causam um impacto importante na economia local, especialmente em situações nas quais a venda de leite de cabra é a única renda. Então, pequenos criadores sofrerão o maior dano pela disseminação desta doença, uma vez que os mesmos não dispõem de muitos recursos financeiros para substituir a ação de procriação ou implementar procedimentos de controle (AZEVEDO, 2005).

2.3.1 Pleuropneumonia Contagiosa dos Caprinos (PPCC)

Especificamente nos caprinos, a cepa F-38, atualmente designada *M. capricolum* subsp *capripneumoniae*, é considerada o agente responsável pela Pleuropneumonia Contagiosa dos Caprinos (PPCC). Esta pleuropneumonia é contagiosa, tanto para animais jovens, como para adultos. Assim sendo, em estudo realizado anteriormente, cabritos sãos foram colocados juntos a cabritos enfermos, inoculados experimentalmente, 78% deles desenvolveram também a enfermidade e morreram entre sete e 25 dias após o início dos sinais clínicos (CORRÊA & CORRÊA, 1992). A PPCC foi descrita como endêmica na Europa Oriental, África e Ásia, e se exterioriza, freqüentemente, por surtos com quadro sintomático típico, como sinais de insuficiência respiratória, frêmito pleural, sensibilidade torácica, respiração abdominal, presença de estertores pulmonares, secreção nasal e febre (SMITH & SHERMAN, 1994).

O *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* é um microrganismo de difícil crescimento em meios de cultura. Quando aparecem estão presentes em poucas colônias e seu isolamento deve ser realizado no início da infecção. (MARCH *et al.*, 2003).

No Brasil não há relato da presença do *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*, sendo assim, o país é considerado livre da infecção. Entretanto, deve-se ressaltar a

necessidade de implementar medidas de vigilância para evitar sua introdução no país, principalmente quando da introdução de animais (AZEVEDO, 2005).

2.5 Diagnóstico

O diagnóstico clínico das micoplasmoses é presuntivo, tendo em vista a variedade de microrganismos que podem causar distúrbios semelhantes. No entanto, algumas micoplasmoses específicas, como a Agalaxia Contagiosa, pode ser facilmente identificada quando o conjunto dos sinais clínicos está presente, isto é, mastite, agalaxia, artrite e ceratoconjuntivite. Quando não, é preciso auxílio laboratorial para estabelecer o diagnóstico etiológico pelo cultivo e isolamento de *Mycoplasma* spp. (MADANAT et al., 2001).

O material para cultivo deve ser diluído e semeado em meio líquido e sólido, incubados a 37°C, em microaerofilia, durante 14-21 dias, sendo considerado negativo, caso não haja crescimento de colônias sugestivas. O procedimento de cultivo e identificação, normalmente demanda um longo período de tempo para conclusão do diagnóstico, permitindo a permanência de animais infectados no rebanho facilitando a disseminação do agente para outros animais (AZEVEDO, 2005).

2.6 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

A descoberta e o uso dos antimicrobianos tiveram um grande impacto sobre a vida de seres humanos e animais. A antibioticoterapia está em uso no manejo da saúde animal há mais de 40 anos (ALMEIDA, 2004).

Muitos agentes microbianos tais como, macrolídeos e lincosamidas, têm sido usados por possuírem atividade *in vitro* contra vários micoplasmas importantes na veterinária. No entanto, embora os macrolídeos e as tetraciclina tenham se mostrado antibióticos efetivos contra as espécies de micoplasma, tem sido encontrada resistência a alguns destes componentes (HANNAN et al., 1997).

A gentamicina (como outros aminoglicosídeos) liga-se dentro da célula aos lisossomos e formam corpos mielóides, aumentando sua presença, induzindo fosfolipidose e reduzindo intensamente a função das fosfolipases locais; isto facilita a liberação de aminoglicosídeo para o citoplasma, onde haverá interferência na cascata de fosfatidil-inositol, bloqueando a hidrólise da fosfolipase C e afetando assim toda a cascata de sinalização intracelular e sua regulação por estímulos e bloqueios endógenos e exógenos (VATTIMO et al. 1997), alterando intensamente a homeostase celular. Além das interações com os lisossomas há provável atuação da gentamicina no estresse oxidativo sobre as mitocôndrias, presumivelmente devido sua capacidade de catalizar a formação de radicais livres (BALIGA et al. 1997).

A doxiciclina e a oxitetraciclina são tetraciclinas e agem inibindo a síntese de proteína dos microorganismos através da ligação aos ribossomos, impedindo a fixação do RNA transportador ao RNA mensageiro. Com essa ação, as tetraciclinas impedem o crescimento dos microorganismos atuando como bacteriostáticas (FUCHS, 1998).

A enrofloxacin é um quimioterápico antibacteriano, derivado do ácido quinoloncarboxílico. Foi sintetizado, pela primeira vez, em 1983, para uso exclusivo em Medicina Veterinária. É uma fluorquinolona que atinge diretamente o núcleo difuso das bactérias, bloqueando a girase bacteriana, enzima de replicação do DNA, inibindo totalmente o metabolismo e a multiplicação do microrganismo (LEVISON & JAWETZ, 1998).

Todos os macrolídeos têm mecanismo de ação semelhante, não sendo diferente com a tilosina, com atividade bacteriostática pela inibição da síntese protéica bacteriana. Ligam-se à porção 50S do ribossomo e inibem a síntese protéica. Podem atuar como bacteriostáticos e bactericidas, de acordo com sua concentração, densidade populacional bacteriana e a fase de crescimento. Costumam apresentar maior atividade em pH alcalino (GOODMAN et al., 1991)

A avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos é uma prova que avalia qual o antimicrobiano tem maior eficácia contra determinados microorganismos, resguardando assim a saúde do animal e diminuindo as chances de formar uma população de bactérias resistentes a determinados medicamentos (MATEU E MARTIN, 2001).

Essas análises também se revelam como importantes aliadas do ponto de vista microbiológico, clínico e epidemiológico, uma vez que fornecem subsídios quanto à concentração necessária de um antimicrobiano para inibir uma determinada população bacteriana. (SORIANO, 2002).

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos, também denominado de antibiograma, é uma técnica *in vitro*, na qual os microrganismos são colocados em contato com um ou mais antimicrobianos de uso terapêutico e observa-se o efeito dessas drogas sobre os mesmos por um período de tempo e temperatura de incubação pré-determinados. Os resultados podem variar de maneira considerável dependendo do microrganismo, do antimicrobiano e das condições experimentais, mas em geral elas correspondem ao que aconteceria se o antibiótico fosse aplicado *in vivo* (SORIANO, 2002; QUINN et al., 2005).

O teste de sensibilidade mais comumente utilizado é através do “teste de difusão em ágar”, onde uma concentração padrão de uma cultura pura de um determinado patógeno é semeado uniformemente sobre um ágar apropriado e, em seguida, discos de papel de filtro individuais contendo concentrações conhecidas dos antimicrobianos são colocados sobre o ágar, sendo o mesmo incubado a 35°C por um período de 18 a 24 horas (BAUER et al., 1966).

Estudos tem mostrado que diversas bactérias já apresentam resistência a alguns antimicrobianos e isso é uma das maiores preocupações da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o século XXI. Esse problema também diz respeito aos veterinários, e exige deles elaboração de um melhor esquema sanitário em relação à criação de animais, com vacinação, higiene, manejo correto e biossegurança, tentando evitar surtos de doenças e assim evitar o uso de antimicrobianos. (MATEU & MARTIN, 2001).

O número de drogas testadas deve ser limitado para evitar gastos desnecessários. Os testes rotineiros devem incluir apenas um representante de cada classe de antimicrobianos, utilizando-se a nomenclatura do princípio ativo. (RIBEIRO & SOARES, 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Vacinas e Diagnósticos – LAVADI, vinculado ao Centro de Saúde e Tecnologia Rural – CSTR, da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG.

3.2 Coleta das amostras

Foram coletadas diferentes amostras de leite de caprinos com sinais clínicos característicos de ACOC na cidade de Lajes – RN. As amostras foram coletadas e imediatamente colocadas em tubos coletores estéreis, sendo em seguida acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e encaminhadas ao LAVADI - UFCG.

Chegando ao laboratório, as amostras foram acondicionadas em tubos com solução salina glicerinada a 50% e 2000UI/mL de penicilina. Em seguida as amostras foram semeadas em meio líquido.

3.3 Processamento das amostras

Foram realizados os cultivos em meio Hayflick modificado, como foi descrito por Azevedo (2005). Inicialmente 100µl de leite foram semeados em meio líquido, e incubados em microaerofilia a 37°C por aproximadamente 72 a 96 horas. Passado esse período, foram semeadas em meio sólido e incubadas em microaerofilia a 37°C (Figura 1) por 72 a 96 horas, sendo em seguida observadas diariamente em microscópio estereoscópico com aumento de 80 a 120 vezes. Com o surgimento de colônias sugestivas de *Mycoplasma* spp. (Figura 2), foram recortados fragmentos do meio sólido (ágar), e transferidos para tubos contendo meio líquido e incubados a 37°C por 48 horas, sendo repicados para o meio sólido e repetindo assim o mesmo procedimento descrito anteriormente.



Figura 1: Placas semeadas em meio sólido e incubadas em microaerofilia.

FONTE: Rodrigo Vieira Correia de Araújo

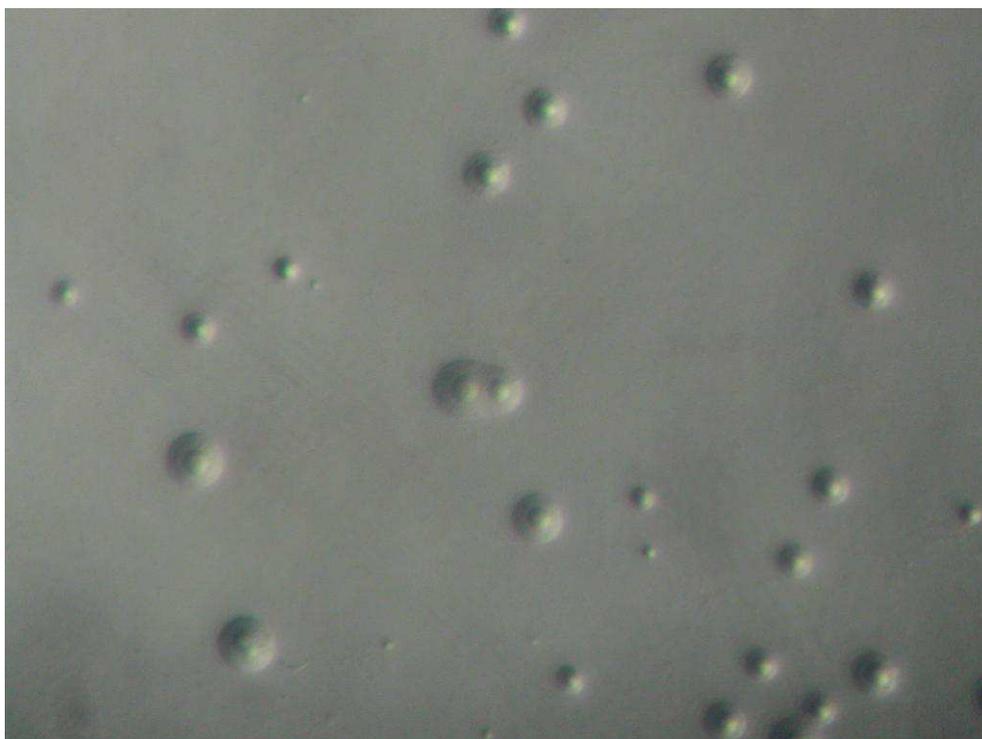


Figura 2: Colônia sugestiva de *Mycoplasma* spp. em meio Hayflick modificado sólido.

FONTE: LAVADI

3.4 Preparação das diferentes diluições das drogas

Para realização do antibiograma, foram utilizadas 6 drogas diferentes, sendo elas a Doxiciclina (DOX), Enrofloxacina (ENR), Gentamicina (GEN), Tilosina (TIL), Oxitetraciclina (OXI), e um Bioterápico na diluição 30 a base de *Mycoplasma agalactiae* (BIO).

As drogas puras foram diluídas em água destilada estéril, dentro de tubos também estéreis, utilizando o método de diluições duplas (Figura 3). Todas as drogas foram utilizadas nas diluições que variaram de 16-0,031µg por ml. Com exceção do bioterápico que foi diluído também em 10 concentrações diferentes, só que partindo da concentração inicial (CI), e variando da CI-1:512.

3.5 Antibiograma

Para a realização do antibiograma, que trata-se de uma prova que testa a sensibilidade de determinada bactéria a diferentes antibióticos, foi utilizado o método de diluição.

As amostras foram colocadas em tubos contendo 150µl de meio líquido, 30 µl do antibiótico na diluição desejada, e 20µl da amostra positiva de *Mycoplasma* spp. Em seguida todas as amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora, e semeadas logo após em meio sólido, onde permaneceram também incubadas em microaerofilia a 37°C. A leitura foi realizada diariamente por um período de 72 horas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Depois de todo procedimento, foram observadas colônias sugestivas de *Mycoplasma* spp. nas diluições em que não houve inibição do crescimento. Foi considerada CIM (Concentração Inibitória Mínima), a menor concentração que inibiu o visível crescimento da bactéria. Na Tabela 2, estão expressos os valores correspondentes a CIM de cada antibiótico avaliado.

A Tilosina foi o antibiótico mais efetivo quando da sua utilização *in vitro*, com a CIM de 0,0625µg/ml, seguida de Enrofloxacina e Gentamicina (CIM: 0,125µg/ml), Oxitetraciclina (CIM: 0,250µg/ml) e Doxiciclina (CIM: 1µg/ml). O bioterápico não inibiu o crescimento de colônias em nenhuma das concentrações avaliadas.

Grafico 2. Comparativo das diferentes CIM's, e seus respectivos valores e antibióticos.

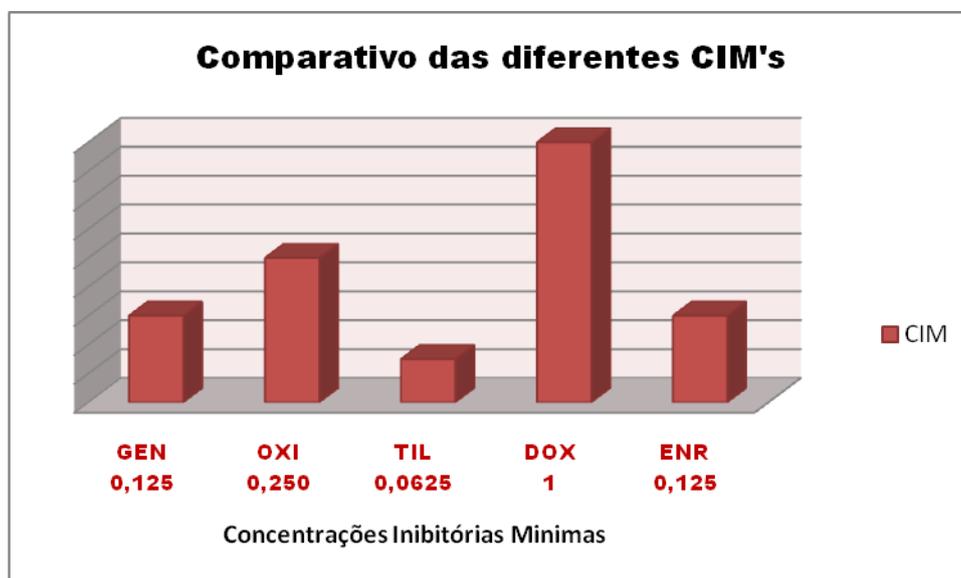


Grafico 2. Comparativo das diferentes CIM's, e seus respectivos valores e antibióticos. *Valores expressos em µg/ml.

Os resultados confirmam que o tratamento convencional a base de Tilosina, continua sendo uma escolha válida, embora a Enrofloxacina e a Gentamicina também sejam prováveis de ter o efeito terapêutico positivo.

Os resultados obtidos coincidem com estudos realizados anteriormente, por Loria et al. (2003) e Antunes et al. (2008), onde constatou-se que dos antibióticos avaliados a Enrofloxacina e a Tilosina, estão entre os que apresentaram os resultados inibitórios mais significativos

Apesar de o bioterápico não ter apresentado boa inibição do crescimento bacteriano nas concentrações avaliadas *in vitro*, Marinho (2008) constatou que *in vivo* os sinais clínicos desapareceram sem recidiva.

Ao escolher uma opção de tratamento, o clínico deve levar em consideração alguns fatores como custo, aplicabilidade e segurança, para aí sim decidir qual o tratamento mais apropriado. Embora o teste de sensibilidade *in vitro* nem sempre corresponderem as respostas *in vivo*, eles podem ser úteis na tomada da decisão, e minimizando os fracassos terapêuticos.

5 CONCLUSÃO

A Tilosina, seguida por Enrofloxacin e Gentamicina apresentaram as menores concentrações inibitórias mínimas para *Mycoplasma agalactiae*;

O bioterápico não apresentou inibição de crescimento de *Mycoplasma agalactiae* nas diluições utilizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA NETO, J. B. **Estudo clínico, citológico e bacteriológico conjuntival de ovinos sadios e com ceratoconjuntivite infecciosa.** Recife, PE, 2003. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

ALMEIDA, L. A. B. Avaliação do tratamento alopático e homeopático de mastite bovina em animais inoculados com *Staphylococcus aureus*. 2004, 104f. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade de São Paulo, São Paulo.

ANTUNES, N. T. et al. In vitro susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma agalactiae*, **The Veterinary Journal**, 177, 436-438.

AZEVEDO, E.O. Aspectos clínico-epidemiológicos e diagnóstico laboratorial da agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos (ACOC) no Brasil. 2005. 87f. **Tese (Doutorado)** - Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

AZEVEDO, E. O. Micoplasmoses em ruminantes. In: RIET-CORREA F. et al.; **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**, Ed. Fernovi, 3 ed., p. 383 - 391, 2007.

AZEVEDO, E.O.; ALCÂNTARA, M.D.B.; TABOSA, I.M.; NASCIMENTO, E.R.; FARIAS, A.A.; CASTRO, R.S.; CAMPOS, C.A.M. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in dairy goats in Brazil. Epidemiologic findings. **Intern. Cong. Intern. Organiz. Mycoplasmol.(IOM)**. XIV, Vienna, p. 48, 2002.

BALIGA, R.; UEDA, N.; WALKER, PD.; SHAH S.V. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. **Am J Kidney Dis.**, v. 29, n.3, p. 465-77,1997.

BAUER, A. et al. Antibiotics susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. Rio de Janeiro: Médica e Científica Ltda, p. 397 – 403.

DA MASSA, A. J. et al.. Mycoplasmas of goats and sheep. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, p. 101-113, 1992.

EGWU, G.O. et al. Caprine mycoplasmal mastitis in Nigeria. **Small Rum. Res.**, n. 39, p. 87-91, 2001.

FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L. **“Farmacologia Clínica - Fundamentos da Terapêutica Racional”**. Guanabara Koogan: 2ª edição, 1998.

GIL, M. C. et al. Genital Lesions in an Outbreak of Caprine Contagious Agalactia Caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma putrefaciens*. **J. Vet. Med. Series B.**, v. 50, n.10, p. 484, 2003.

GOODMAN, A.G. et al. **“As Bases Farmacológicas da Terapêutica”**. Guanabara Koogan: 8ª edição, 1991.

GREGORY, L. et al. Surto de ceratoconjuntivite infecciosa dos caprinos causada por *Mycoplasma conjunctivae* em caprinos adultos, criados no Estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol. São Paulo**, v. 70, n. 2, p. 199-201, 2003.

HANNAN, P. C. T. et al. Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Bethesda, v. 41, n. 9, p. 2037–40, 1997.

IBGE. **Censo Agropecuário 2006**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acessado em 22.mar. 2011.

LEVISOHN, S. et al.. Use of an ELISA for differential diagnosis of *Mycoplasma agalactiae* and *M mycoides* subspecies *mycoides* (LC) in naturally infected goat herds. **Res. Vet. Sci.**, v. 51, n. 1, p. 66-71, 1991.

LEVISON, W. & JAWETZ, E. *Microbiologia médica e imunologia*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. 415p

LORIA, G.R. et al., 2003. In vitro susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma agalactiae* to oxytetracycline, tylosin, enrofloxacin, spiramycin and lincomycin spectinomycin. **Research in Veterinary Science** 75, 3–7.

MADANAT A., ZENDULKOVÁ, D.; POSPÍŠIL, Z. Contagious agalactia of sheep and goats. **A review. Acta Vet. Brno.**, v. 70, p. 403-412, 2001.

MARCH, J.B.; KERR, K.; LEMA, B. Rapid detection of contagious bovine pleuropneumoniae by a *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* SC capsular polysaccharidespecific antigen detection latex agglutination test. **Clin. and Diagn. Lab. Immun.**, v. 10, n.2, p. 233-240, 2003.

MARINHO, M. L. Ação terapêutica do bioterápico de *Mycoplasma agalactiae* em caprinos com agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos, 2008 **Tese (Doutorado)** - Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

MATEU, E.; MARTIN, M. Why is anti-microbial resistance a veterinary problem as well? **Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 48, p. 569-581, 2001.

NASCIMENTO, E.R. et al. Isolation of *Mycoplasma mycoides* from outbreaks of caprine mycoplasmosis in Brazil. **Br. Vet. J.**, v.142, p.246, 1986.

NASCIMENTO, E.R. et al. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in Dairy Goats in Brazil. Etiologic Study. In: INTERNACIONAL CONGRESS OF THE

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR MYCOPLASMOLOGY (IOM) 14. **Anais..**Viena, 2002.

OIE. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**, 2004. Disponível em: <http://www.oie.int> , acesso: mar/2011.

PENHA, A. M. & D' APICE, M. Agalaxia contagiosa das cabras em São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 13, p. 299-301, 1942.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1.ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2005. 512p.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. **Microbiol. Molecul. Biol. Reviews**, v. 62, n.4, p. 1094-1156, 1998.

REAL, F. et al. Caprine contagious agalactia caused by *Mycoplasma agalactiae* in the Canary Islands. **Vet. Rec.**, v. 135, p. 15-16, 1994.

RIBEIRO, V.R. et al. Ocorrência de micoplasma em caprinos através das técnicas de imunofluorescência indireta e inibição de crescimento. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 2628, 1995.

RIBEIRO, M.C.; SOARES, M.M.S.R. **Microbiologia prática roteiro e manual: Bacterias e fungos**. Rio de Janeiro: Atheneu, p. 112, 1998.

ROSENDAL, S. Ovine and Caprine mycoplasmas. In: WHITFORD, H. W.; ROSENBUSCH, R. F.; LAURERMAN, L. H. **Mycoplasmas in animals: Lab. Diag.** Ames: Iowa. S. Univ. Press., 173p, 1994.

SMITH, M.C. & SHERMAN, D.M. *Goat medicine*. **Lea & Febiger**: Pennsylvania: Lea & Febiger, 1994, p.84-89.

SORIANO, F. Aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos para La lectura interpretada del antibiograma. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica** v.20, n.8, p.407 – 412, 2002.

TIMENETSKY, J. **Micoplasmas**. Disponível em: <<http://www.icb.usp.br/~bmm/jorge.pdf>>. Acesso em: 02 abril 2007.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, p. 441 – 443.

VATTIMO, M.F.; SANTOS, O.FP.; SCHOR, N.; BOIM, M.A.. IRA nefrotóxica: antibióticos e antivirais. In: **SHOR, N.; BOIM, M.A.; SANTOS, O.F.P. Insuficiência renal aguda - fisiopatologia, clínica e tratamento**. Sarvier, 1ª edição, cap.14, p.103-108. São Paulo, 1997.