

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS-PB

**ISOLAMENTO E SENSIBILIDADE *IN VITRO* DE *Mycoplasma* spp. e
Mycoplasma agalactiae EM PEQUENOS RUMINANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

ALINE GUEDES MAMEDE DE MORAES

PATOS - PB

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS-PB

**ISOLAMENTO E SENSIBILIDADE *IN VITRO* DE *Mycoplasma* spp. e
Mycoplasma agalactiae EM PEQUENOS RUMINANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Autora: Aline Guedes Mamede de Moraes

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Marcia Almeida de Melo

PATOS - PB

2013

FICHA CATALOGRÁFICA
Dados de Acordo com AACR2, CDU E CUTTER.
Biblioteca Setorial - CSTR/UFCG – Campos de Patos-PB

M827i
2013

Moraes, Aline Guedes Mamede.

Isolamento e sensibilidade *in vitro* de *Mycoplasma* spp. e *Mycoplasma agalactiae* em pequenos ruminantes / Aline Guedes Mamede Moraes. - Patos - PB: UFCG/PPGCF, 2013.

48 f.: Tab.

Inclui Bibliografia.

Orientador: Marcia Almeida de Melo.

Co-orientador: Edisio Oliveira da Azevedo.

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

1- Medicina Veterinária Preventiva. 2 – Antibiograma. 3 – Caprino. 4 - Ovino. 5 – Sistema reprodutivo. I - Título.

CDU: 614:619(043)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS-PB

ALINE GUEDES MAMEDE DE MORAES

**ISOLAMENTO E SENSIBILIDADE *IN VITRO* DE *Mycoplasma spp.* e
Mycoplasma agalactiae EM PEQUENOS RUMINANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

DATA: 16/08/2013

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Marcia Almeida de Melo – UFCG
(Orientadora)

Prof^º. Dr. Edisio Oliveira de Azevedo – UFS
(Co-orientador)

Prof^º. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento – UFF
(1º Membro)

Prof^ª. Dr^ª. Maria das Graças Xavier de Carvalho - UFCG
(2º Membro)

DEDICATÓRIA

*Para Lanna.
Com amor, mamãe.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos meus pais, Vandira e Jaime. Foi através desse dom divino de educar que estou prestes a subir mais um degrau da minha vida. Hoje, reconheço que a participação assídua na transmissão de valores morais e intelectuais está acima de qualquer compreensão científica. Agradecer por tudo ainda seria pouco para expressar a imensa gratidão que tenho a senhora minha mãe e ao senhor meu pai, então deixo registrado aqui o elo de amor que nos une por toda vida.

AGRADECIMENTOS

Deus, Pai santo e todo poderoso, conheces meus sonhos e planos, sabes da minha trajetória de vida, se cheguei até aqui foi porque permitistes, então receba os sinceros agradecimentos de um coração que chorou e sorriu.

A minha filhinha, Lanna, por alegrar meus dias e iluminar minha vida. Ser mamãe de uma menininha linda como você é algo surpreendente! Estou muito feliz! Mamãe te ama!

Ao meu esposo, José Ramos, pelo companheirismo e dedicação comigo e com a nossa filhinha.

A minha adorável irmã, Amanda, pelos momentos de descontração nas conversas por telefone, onde sorríamos por longas horas para aliviar a saudade.

A Aline Antas, pela amizade e parceria, e a sua família que me acolheu com muito carinho em seu lar.

Ao professor Edisio, pela paciência e ajuda.

A professora Marcia, pela ajuda na reta final desse trabalho.

Aos proprietários, por permitir que seus animais fossem usados nesse trabalho.

Galopamos pela vida como artistas de circo, equilibrados em dois cavalos que correm lado a lado a toda velocidade – com um pé sobre o cavalo chamado **'destino'**, e o outro sobre o cavalo chamado **'livre arbítrio'**. E as perguntas que você precisa fazer todos os dias são: qual dos cavalos é qual? Com qual devo parar de me preocupar? Por que eles não estão sob meu controle e qual deles preciso guiar com esforço concentrado?

Elizabeth Gilbert

SUMÁRIO

	Págs.
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO GERAL.....	12
CAPÍTULO I: Isolamento de <i>Mycoplasma</i> spp. no trato reprodutivo de pequenos ruminantes.....	15
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
2.1 Animais.....	18
2.2 Avaliação Clínica.....	19
2.3 Coleta das amostras e análise laboratorial.....	19
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4 CONCLUSÃO.....	22
5 REFERÊNCIAS.....	22
CAPÍTULO II: Sensibilidade <i>in vitro</i> de <i>Mycoplasma agalactiae</i> isolados de ovinos e caprinos naturalmente infectados.....	26
RESUMO.....	27
ABSTRACT.....	28

1 INTRODUÇÃO.....	28
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.1 Obtenção e cultivo das amostras.....	29
2.2 Antibióticos e bioterápico.....	30
2.3 Antibiograma.....	30
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4 CONCLUSÃO.....	34
5 REFERÊNCIAS.....	34
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
ANEXO.....	37

LISTA DE TABELAS

	Págs.
CAPÍTULO II: Sensibilidade <i>in vitro</i> de <i>Mycoplasma agalactiae</i> isolados de ovinos e caprinos naturalmente infectados.....	26
Tabela 1- Número de colônias de <i>M. agalactiae</i> isoladas de sete amostras submetidas ao antibiograma provenientes dos Estados da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte nos anos de 2009, 2010 e 2011).....	33

ISOLAMENTO E SENSIBILIDADE *IN VITRO* DE *Mycoplasma* spp. e *Mycoplasma agalactiae* EM PEQUENOS RUMINANTES

RESUMO

Foram realizados dois estudos para pesquisar a presença de *Mycoplasma* spp. no trato reprodutivo de pequenos ruminantes e testar a sensibilidade *in vitro* dos isolados de *Mycoplasma agalactiae*. No primeiro estudo foram coletadas 154 amostras de suabes vaginais, prepuciais e sêmen de animais sem problemas reprodutivos em quatro propriedades do Estado da Paraíba. Não foram observadas lesões na genitália externa nos animais estudados. Nas amostras de suabe vaginal, duas (1,3%) apresentaram crescimento de *Mycoplasma* spp., sendo uma em caprino e outra em ovino pertencentes a duas propriedades. Nas amostras de sêmen e suabe prepucial não foi observado crescimento de *Mycoplasma* spp. Confirmou-se a presença de micoplasmas no trato reprodutivo de pequenos ruminantes utilizando o meio Hayflick modificado, líquido e sólido. No segundo estudo foram utilizadas sete amostras de *Mycoplasma agalactiae*, sendo uma amostra do estudo anterior e seis amostras isoladas de outros rebanhos. Os isolados foram submetidos ao antibiograma através do método de diluição em placas. Os antibióticos utilizados foram Tilosina (1µg/mL a 0,0625µg/mL), Enrofloxacina (1µg/mL a 0,0625µg/mL), Oxitetraciclina (0,5µg/mL a 0,03125µg/mL), Estreptomicina (16µg/mL a 1µg/mL), Florfenicol (8µg/mL a 0,5µg/mL), Doxiciclina (1µg/mL a 0,0625µg/mL), Gentamicina (1µg/mL a 0,0625µg/mL) e um bioterápico na formulação 30D. A tilosina e enrofloxacina mostraram-se mais efetivas nas concentrações que variaram de 0,25 a 0,0625µg/mL e a oxitetraciclina e doxiciclina também apresentaram efeito inibitório nas concentrações 0,125 a 0,03125µg/mL e 0,0625µg/mL respectivamente. Estreptomicina, florfenicol, gentamicina e o bioterápico não apresentaram efeitos inibitórios satisfatórios nas concentrações utilizadas. A enrofloxacina, tilosina, oxitetraciclina e doxiciclina apresentaram melhor efeito inibitório para *M. agalactiae*.

Palavras-chave: Antibiograma, Caprino, Ovino, Sistema reprodutivo

ISOLATION AND *IN VITRO* SUSCEPTIBILITY OF *Mycoplasma* spp. and *Mycoplasma agalactiae* IN SMALL RUMINANTS

ABSTRACT

Two studies were conducted to investigate the presence of *Mycoplasma* spp. in the reproductive tract of small ruminants and to test the *in vitro* susceptibility of isolates of *Mycoplasma agalactiae*. In the first study were collected 154 samples of vaginal and preputial swabs and semen from animals without reproductive disorders from four farms in the state of Paraíba. No lesions were observed in the external genitalia from studied animals. In the samples of vaginal swabs, two (1.3%) showed growth of *Mycoplasma* spp., being one in goat and other in sheep belonging to two farms. In the samples of semen and preputial swab were not observed *Mycoplasma* spp. growths. So it was confirmed the presence of mycoplasma in the reproductive tract of small ruminants from liquid and solid modified Hayflick's media. For the second study, seven samples of *Mycoplasma agalactiae* were used, one sample from the previous study and six samples isolated from herds. The isolates were submitted to the antibiotic susceptibility test by the dilution plating method. The antibiotics used were: Tylosin (1µg/mL to 0,0625µg/mL), Enrofloxacin (1µg/mL to 0,0625µg/mL), Oxytetracycline (0,5µg/mL to 0,03125µg/mL), Streptomycin (16µg/mL to 1µg/mL), Florfenicol (8µg/mL to 0,5µg/mL), Doxycycline (1µg/mL to 0,0625µg/mL), Gentamicin (1µg/mL to 0,0625µg/mL) and a biotherapeutic in formulation 30D. The enrofloxacin and tylosin were more effective at concentrations ranging from 0.25 to 0,0625µg/mL, oxytetracycline and doxycycline also had an inhibitory effect at concentrations from 0.125 to 0,03125µg/mL e 0,0625µg/mL, respectively. Streptomycin, florfenicol, gentamicin and the biotherapeutic showed no satisfactory inhibitory effects on the used concentrations. The enrofloxacin, tylosin, oxytetracycline and doxycycline showed better inhibitory effect on *M. agalactiae* growth.

Keywords: Antibiotic Susceptibility Test, Goats, Sheeps, Reproductive system

INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos vem sendo observado uma grande valorização na ovinocaprino cultura nordestina com efetiva participação dos criadores e órgãos públicos do setor agropecuário devido aos programas de fortalecimento da agricultura familiar.

Mesmo diante dos investimentos realizados, sua relevância econômica pode ser considerada inexpressiva, pois ainda se observam sistemas de criação com baixos índices produtivos, em decorrência, principalmente, de práticas de manejo inadequadas, condições sanitárias precárias, baixa capacidade de investimento dos pequenos criadores, reduzida disponibilidade de alimento nas épocas secas e pouco uso de tecnologias reprodutivas (PEÑA-ALFARO, 2006).

Outro fator de fundamental importância para a baixa produtividade são as doenças infecto-contagiosas, que afetam negativamente a produtividade do rebanho, cujas consequências estão diretamente relacionadas à redução no ganho de peso, queda na produção de leite e diminuição da qualidade e rendimento das carcaças (EMPARN, 2006).

Recentemente as enfermidades causadas por agentes do gênero *Mycoplasma* têm sido ativamente estudadas e vêm assumindo importância econômica considerável, principalmente entre ovinos e caprinos. Normalmente, os micoplasmas provocam infecções crônicas, sugerindo uma capacidade em desenvolver um mecanismo de escape frente ao sistema imunológico do hospedeiro, seja em decorrência de características como a de apresentar variação nas suas proteínas de superfície, ou em ter capacidade de provocar alterações nos componentes da resposta imune (GREGORY et al., 2003).

Os problemas reprodutivos são importantes fatores que interferem na economia agropecuária. Entre as afecções reprodutivas que afetam os animais podem-se destacar as genitais, que possuem causas diversificadas (BUZINHANI et al., 2007) e os micoplasmas incluem-se entre os agentes causadores de infecções no trato reprodutivo (OLIVEIRA, 2008; RIZZO, 2006).

O conhecimento sobre os aspectos epidemiológicos, as manifestações clínicas, o tratamento adequado, as formas de diagnóstico e as medidas de controle e profilaxia são de fundamental importância para tornar possível o controle e a eliminação de possíveis portadores de agentes infecciosos (OLIVEIRA et al., 2004; CARDOSO, 2003).

Apesar dos avanços tecnológicos no desenvolvimento de quimioterápicos e vacinas, a introdução de micro-organismos exóticos pode acometer muitos animais em um curto período de tempo (ALCÂNTARA, 2010), desse modo as pesquisas com agentes do gênero *Mycoplasma* tem sido realizadas mundialmente, sendo motivo de preocupação para os pesquisadores e produtores rurais, uma vez que as perdas econômicas são relevantes. Desta forma, objetivou-se com esse estudo isolar *Mycoplasma* spp. no trato reprodutivo de pequenos ruminantes e testar a sensibilidade *in vitro* de *Mycoplasma agalactiae* isolados de pequenos ruminantes naturalmente infectados.

REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, M.D.B. **Soroprevalência da Agalaxia Contagiosa e Vacinação experimental em caprinos.** 2010. 52f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos. 2010.

BUZINHANI, M. et al. Detecção de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum* em vacas com distúrbios reprodutivos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.6, p.1368-1375, 2007.

CARDOSO, M.V. ***Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovigenitalium* e *Ureaplasma diversum* em touros. Diagnóstico, impacto na reprodução e ensaio terapêutico.** 2003. 89f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

GREGORY, L.; CARDOSO, M.V.; BIRGEL JR, E.H.; TEIXEIRA, S.R.; SOUZA, R.M.; PACHECO, W.A.; BENESI, F.J. Surto de ceratoconjuntivite infecciosa dos caprinos causado por *Mycoplasma conjunctivae* em caprinos adultos criados no Estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo**, v.70, n.2, p.179-181, 2003.

OLIVEIRA, R.C. **Isolamento de ureaplasma e micoplasma do trato reprodutivo de ovinos e caprinos e tipificação genotípica por meio da PFGE e sequenciamento do gene 16 S rRNA.** 2008. 139f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e

Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

OLIVEIRA, A.A.F.; ALVES, F.S.F.; PINHEIRO, R.R.; CHAPAVAL, L.; PINHEIRO, A.A. **Micoplasmoses em Pequenos Ruminantes**. Sobral: EMBRAPA CAPRINOS, 2004. 29p.

PEÑA-ALFARO, C.E. **Curso de Biotecnologias da Reprodução nos Animais Domésticos**. 60f. UFCG. Patos-PB. 2006. Notas de aula. Impresso.

RIZZO, H. **Avaliação clínica e estudo da ocorrência de fêmeas ovinas infectadas por micoplasma na região de Piedade – SP. “Avaliação da infecção sobre produtividade do rebanho”**. 2006. 111f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia) – Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

CAPÍTULO I

Isolamento de *Mycoplasma* spp. no trato reprodutivo de pequenos ruminantes

O presente trabalho foi submetido à revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia/UFMG – Belo Horizonte.

Isolamento de *Mycoplasma* spp. no trato reprodutivo de pequenos ruminantes

[Isolation of *Mycoplasma* spp. in the reproductive tract of small ruminants]

A.G.M. Moraes^{1*}, A.A. Cordeiro², A.C. Campos³, M.A. Melo⁴, E.O. Azevedo⁵

¹Médica Veterinária, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, UFCG, Patos, PB. E-mail: alineguedesmamede@gmail.com. * Autor para correspondência

²Médica Veterinária, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, UFCG, Patos, PB. E-mail: aline.antas@hotmail.com

³Médica Veterinária, Bolsista de Pós-doutorado Empresarial-CNPq. E-mail: anabutron@gmail.com

⁴Professora, Doutora, UFCG, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária. Av. Universitária, s/n. Bairro Sta. Cecília. CEP: 58.708-110, Patos, PB. E-mail: marmelo@cstr.ufcg.edu.br Fone/Fax.: (83) 3511-3048

²Professor, Doutor, UFS, Departamento de Medicina Veterinária. Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos, Av. Marechal Rondon, s/n Jardim Rosa Elze, CEP: 49100-000, São Cristóvão, SE. E-mail: edisio@pq.cnpq.br. Fone: (79) 2105 6992/ 9914 6085

RESUMO

Pesquisou-se *Mycoplasma* spp. em 154 amostras de suaves vaginais, prepúciais e sêmen de animais, sendo 61 caprinos e 93 ovinos, machos e fêmeas sem problemas reprodutivos, provenientes de quatro propriedades do Estado da Paraíba. Foram coletados dados sobre o histórico reprodutivo e realizado o exame específico do sistema genital. Foram relatados abortos e morte neonatal nos rebanhos estudados. Não foram observadas lesões na genitália externa nos animais estudados. O isolamento do *Mycoplasma* spp. foi realizado em meio Hayflick modificado, líquido e sólido. Dentre as amostras analisadas, duas (1,3%) apresentaram crescimento de *Mycoplasma* spp., sendo uma em caprino e outra em ovino pertencentes a duas propriedades. Nas amostras de sêmen e suave prepúcial não foi observado crescimento de *Mycoplasma* spp. Confirmou-se a presença de micoplasmas no trato reprodutivo de pequenos ruminantes com o meio Hayflick modificado, líquido e sólido.

Palavras-chave: Caprino, Micoplasmas, Ovino, Reprodução

ABSTRACT

It was investigated *Mycoplasma* spp. in 154 samples of vaginal and preputial swabs and semen, from animals, being 61 goats and 93 sheep, males and females, without reproductive disorders from four farms in the state of Paraíba. Data about reproductive history were collected and the specific examination of the genital system was performed. It was reported abortions and neonatal death in the herds. No lesions were found in the external genitalia of studied animals. *Mycoplasma* spp. isolation was carried out in liquid and solid modified Hayflick's media. Among the analyzed samples, two (1.3%) showed growth of *Mycoplasma* spp., being one in goat and other in sheep belonging to two farms. In the semen and preputial swab were not observed *Mycoplasma* spp. growth. This study confirmed the presence of mycoplasma in the reproductive tract of small ruminants from liquid and solid modified Hayflick's media.

Keywords: Goats, Mycoplasmas, Sheeps, Reproduction

1 INTRODUÇÃO

Os problemas reprodutivos em animais de produção possuem uma multiplicidade de fatores que interferem na economia agropecuária e são normalmente originados por deficiência no manejo, problemas nutricionais, falhas de origem genética, número de reprodutores, cruzamento, idade das fêmeas, problemas hormonais, fatores climáticos, tipo de criação e doenças infecciosas (Cardoso *et al.*, 2001).

Muitos micro-organismos estão envolvidos com problemas reprodutivos, como por exemplo, a *Brucella ovis* que provoca epididimite, infertilidade e aborto em ovinos (Turnes, 2001), porém patógenos do gênero *Mycoplasma* também podem estar associados uma vez que já foi constatada a presença destes no sistema reprodutivo de caprinos e ovinos (Rizzo *et al.*, 2011).

O gênero *Mycoplasma* pertence à classe *Mollicutes* sendo considerados os menores organismos de vida livre capazes de auto-replicação. São pleomórficos variando de esféricos (0,3 a 0,9 μm de diâmetro) a filamentosos (até 1 μm de comprimento), não possuem parede celular rígida, mas têm tripla camada de membrana externa flexível podendo ultrapassar membranas filtrantes com poros de tamanho de 0,22 a 0,45 μm . São resistentes a antibióticos como a penicilina e formam em meio

sólido microcolônias que se caracterizam por apresentar aspecto de “ovo frito”. Possuem predileção por membranas mucosas do trato respiratório, urogenital, articulações, conjuntiva e glândula mamária (Quinn *et al.*, 2005).

Com essas características um grande número de espécies patogênicas têm sido isoladas e são responsáveis por diversas doenças, tais como: a Pleuropneumonia Contagiosa dos Caprinos (*Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*), a Agalaxia Contagiosa dos Ovinos e Caprinos (*Mycoplasma agalactiae*), e a Ceratoconjuntivite infecciosa em caprinos e ovinos (*Mycoplasma conjunctivae*), dentre várias outras (Macowan e Minette, 1976; Azevedo, 2005; Jones *et al.*, 1976).

Internacionalmente já foi comprovado que as infecções por micoplasmas também podem resultar em problemas reprodutivos causando vulvovaginite granular, cervicites, endometrite, mastite, infertilidade, perda embrionária, abortos, morte neonatal, síndrome do bezerro fraco, vesiculite seminal, balanopostite e epididimite (Rana *et al.*, 1993; Trichard *et al.*, 1993; Ball e Mccaughey, 1982; Jones *et al.*, 1983; Damassa, *et al.*, 1983).

No Brasil, há relatos de isolamento de micoplasmas em animais com distúrbios reprodutivos (Rizzo *et al.*, 2011; Buzinhani *et al.*, 2007; Oliveira, 2008; Rocha, 2009) e de animais assintomáticos (Cardoso, 2006; Rizzo *et al.*, 2011; Gregory, 2012). No entanto o isolamento de agentes infecciosos associados com a doença não tem demonstrado a constância de um organismo específico (Webb e Chich, 1976), sendo os sinais clínicos e exames microbiológicos a base para o diagnóstico.

Considerando que a literatura sobre esse assunto é escassa e pouco se conhece sobre a patogenicidade desses micro-organismos no envolvimento das patologias do sistema reprodutivo, este trabalho teve como objetivo fazer o isolamento de *Mycoplasma* spp. do trato reprodutivo de ovinos e caprinos assintomáticos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados 154 animais, sendo 61 caprinos e 93 ovinos, entre machos e fêmeas, de quatro propriedades do Estado da Paraíba. Os animais e as propriedades foram escolhidos por conveniência.

Em três propriedades, os animais eram destinados ao consumo e comercializados para complementar a renda familiar, havendo um grande fluxo de entrada e saída de animais. Em apenas uma propriedade, os animais eram destinados à produção leiteira, sendo monitorada regularmente por médico veterinário.

2.2 Avaliação clínica

Foram obtidas informações sobre o histórico reprodutivo dos animais e em seguida examinados individualmente.

Nas fêmeas, o exame específico do aparelho genital consistiu na inspeção direta da vulva e vestíbulo da vagina, bem como do fundo da vagina e entrada da cérvix com o auxílio de espéculo e lanterna para melhor visualização.

Nos machos, realizou-se inspeção e palpação nos testículos, epidídimos, escroto, prepúcio e pênis.

Além do exame específico do aparelho reprodutivo foi realizada uma avaliação geral dos aparelhos cardíaco, respiratório e digestório. Verificou-se também a glândula mamária e o estado nutricional.

2.3 Coleta das amostras e análise laboratorial

Antes da coleta as fêmeas e os machos foram submetidos à higiene da região externa da vulva ou prepúcio com papel toalha descartável. Para obtenção do material nas fêmeas, a vulva foi aberta com deslocamento dos lábios vulvares e com ajuda do espéculo friccionou-se o suabe na região do vestíbulo da vagina. Imediatamente após a fricção o mesmo foi transferido para tubos estéreis contendo solução de transporte (50% de glicerina, PBS 1% e 2.000UI/mL). Esse material foi mantido sob refrigeração em caixas isotérmicas até a chegada ao laboratório onde foram armazenados a -20°C até o momento do processamento laboratorial.

Foram coletadas três amostras de sêmen, cada uma contendo 0,5 mL através de eletroejaculação e também 15 amostras de suabe prepucial, por meio de fricção na mucosa prepucial. O material coletado foi depositado em solução de transporte, na proporção de 1:2, e ao chegar ao laboratório o mesmo foi centrifugado e o sobrenadante

utilizado no isolamento. As alíquotas foram armazenadas a -20°C até o momento do processamento laboratorial.

O isolamento das amostras foi realizado no Laboratório de Vacinas e Diagnóstico (LAVADI), Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Utilizou-se o meio de cultura Hayflick modificado, líquido e sólido, conforme descrito por Azevedo (2005).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No histórico reprodutivo dos animais observou-se a ocorrência de abortos ou mortes neonatais, com descarte das fêmeas. Os machos quando apresentavam alguma lesão externa no pênis, prepúcio ou escroto, eram tratados e depois comercializados.

No exame do aparelho genital, as fêmeas e os machos não apresentaram nenhuma lesão na genitália externa.

Foi realizado o cultivo das 154 amostras, onde 54 eram de suabe vaginal caprino e 82 de suabe vaginal ovino, destas, apenas duas (1,3%) foram positivas para *Mycoplasma* spp., sendo uma da espécie caprina, no município de Patos, e a outra da espécie ovina, no município de São José do Bonfim. Observou-se no cultivo a presença de colônias com aspecto de “ovo frito”, presença de manchas e filmes.

Nas três amostras de sêmen e nas 15 amostras de suabe prepucial não foi observado crescimento de *Mycoplasma* spp.

Estes achados sugerem que a infecção está presente nos pequenos ruminantes e que a manutenção de animais portadores pode contribuir para a permanência deste micro-organismo na região, devendo-se estabelecer medidas preventivas, como a vacinação, para evitar maiores prejuízos aos criadores.

A maioria dos micoplasmas são patógenos oportunistas, que em situações de estresse ou enfermidades culminam na sua eliminação, não sendo possível identificar o principal fator desencadeador (Rizzo *et al.*, 2011).

A presença de *Mycoplasma* no sistema reprodutivo dos animais, sendo os bovinos a espécie mais estudada, e a associação com patologias foi considerada controversa alguns anos atrás, pois animais saudáveis eram encontrados como portadores destes micro-organismos. Os dados das infecções, natural e experimental, causando abortos e infertilidade em bovinos, além de surtos da síndrome de vulvovaginite

granular (VVG) comprovaram a importância dos micoplasmas como patógenos do sistema reprodutivo (Doig *et al.*, 1979; Rocha, 2009).

As espécies com potencial patogênico para causar infecções genitais em pequenos ruminantes são o *Mycoplasma capricolum*, *M. arginini* (JONES, 1993), *M. mycoides mycoides* (Cottew *et al.*, 1974; Trichard *et al.*, 1993), *M. agalactiae* (Jones, 1983), *Mycoplasma* ovine/caprino sorotipo 11 (Cottew *et al.*, 1974; Livingstone e Gauer, 1983; Nicholas *et al.*, 1999).

O *Mycoplasma* ovine/caprino sorotipo 11, ainda não classificado como espécie, conhecido como cepa 2D, foi isolado de ovelhas com problemas reprodutivos e em rebanhos aparentemente saudáveis não estabelecendo o papel etiológico dessa espécie (Cottew *et al.*, 1974; Nicholas *et al.*, 1999).

Livingstone e Gauer (1983) isolaram esse micoplasma em quatro rebanhos no Texas, Estados Unidos, sendo dois com problemas reprodutivos e dois saudáveis. Inoculações experimentais dessa cepa causaram lesões de vulvite linfocítica, vaginite, cervicite e endometrite em ovinos (Kumar *et al.*, 1992). No entanto inoculações experimentais não reproduziram completamente a doença, existindo apenas fortes evidências que sugerem o envolvimento do *Mycoplasma* ovine/caprino sorotipo 11 com surtos de vulvovaginite em ovinos (Cottew *et al.*, 1974).

Além de ser um dos responsáveis pela Agalaxia Contagiosa dos Ovinos e Caprinos (ACOC), o *M. agalactiae*, está relacionado com casos espontâneos de vulvovaginite granular (Gil *et al.*, 2003) e experimentais em cabras com lesões características de grânulos do tamanho de “cabeça de alfinete” amarelo-esbranquiçado e translúcido dispostos de forma linear próximo ao clitóris, hiperemia de mucosa e edema, além da presença de exsudato purulento (Singh *et al.*, 1974). Em carneiros infectados experimentalmente pôde-se isolá-lo no sangue, sêmen, vesícula seminal, testículos e epidídimos, observando mudanças nas características dos ejaculados e alterações degenerativas nos órgãos necropsiados (Ak *et al.*, 1995).

Segundo Rizzo *et al.* (2011) a presença de micoplasmas no trato reprodutivo de pequenos ruminantes não estabelece claramente as características clínicas da doença como fator de risco para o rebanho. A maioria das espécies provocam infecções agudas podendo tornar-se crônicas, ou mesmo outras espécies são comensais apatogênicos que vivem nas superfícies de mucosas, dificultando o estabelecimento do diagnóstico conclusivo.

Essas bactérias são consideradas oportunistas por excelência, e a sua patogenicidade na grande maioria das espécies pode ser questionada, principalmente pela sua presença em hospedeiros saudáveis. Fatores predisponentes inerentes aos hospedeiros ainda não conhecidos, e a presença dos mollicutes podem estar associada à manifestação das enfermidades reprodutivas (Rizzo *et al.*, 2011).

Livingston Junior e Gauer (1975) relataram que entre nove sorotipos de micoplasmas estudados, somente um demonstrou correlação entre seu isolamento e presença de alterações clínicas no trato genital de ovinos, concordando com vários autores (Cottew *et al.*, 1974; Livingston Junior e Gauer, 1983; Kapoor *et al.*, 1984; Nicholas *et al.*, 1999).

Em bovinos a campo e de centrais de inseminação artificial, Cardoso *et al.* (2006), isolaram *Mycoplasma* spp., cujo maior percentual foi no muco prepucial (83,8%) em relação ao sêmen (44,1%), podendo justificar a aderência do micoplasma na mucosa prepucial, não descartando a presença do mesmo no sêmen.

Estudos realizados por De La Fe *et al.* (2009) isolaram *M. agalactiae* de sêmen de caprinos, mas não ficou esclarecido o envolvimento do micro-organismo na transmissão da doença.

Rizzo *et al.* (2011) realizaram o exame microbiológico de 60 amostras de muco vaginal ovino em meio SP4 e, destas, 42 sofreram contaminação por bactérias ambientais sendo descartadas, as 18 amostras restantes que não foram contaminadas resultaram em 6 isolamentos (33%), onde os autores não associaram a presença de micoplasmas com distúrbios reprodutivos nos animais estudados.

4 CONCLUSÃO

Confirmou-se a presença de *Mycoplasma* spp. no aparelho reprodutivo de pequenos ruminantes assintomáticos. Não houve associação de micoplasmas com lesões na genitália externa dos animais estudados.

5 REFERÊNCIAS

AK, K.; AK, S.; GUREL, A. et al. Experimental studies on the effects of *Mycoplasma agalactiae* on the spermatozoa and genital organs of rams. *Pendik Vet Mikrobiyol*, v.26, p.139-155, 1995.

AZEVEDO, E.O. *Aspectos clínicos, epidemiológicos e diagnóstico laboratorial da Agalaxia Contagiosa dos Ovinos e Caprinos (ACOC) no Brasil*. 2005. 141f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

BALL, H.J.; MCCAUGHEY, W.J. Experimental production of vulvitis in ewes with a ureaplasma isolate. *The Veterinary Record*, v.110, n.19, p.581, 1982.

BUZINHANI, M.; METIFFOGO, E.; TIMENETSKY, J. Detecção de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum* em vacas com distúrbios reprodutivos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.6, p.1368-1375, 2007.

CARDOSO, M.V.; TEIXEIRA, S.R.; MIYASHIRO, S. et al. Estudo comparativo entre técnicas de isolamento e PCR para detecção de *Mycoplasma* e *Ureaplasma diversum* em muco prepucial e sêmen *in natura* de touros de monta natural e central de inseminação artificial. *Arq. Inst. Biol.*, v.73, n.1, p.33-40, 2006.

CARDOSO, M.V.; GREGORY, L.; TEIXEIRA, S.R. et al. Alterações na qualidade seminal associadas à *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum* em sêmen bovino “in natura”. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.25, n.2, p.240-242, 2001.

COTTEW, G.S.; LLOYD, L.C.; PARSOSON, I.M. Isolation of mycoplasma from vulvovaginitis in sheep. *Australian Veterinary Journal*, v.50, n.12, p. 576-577, 1974.

DAMASSA, A.J.; BROOKS, D.L.; ADLER, H.E. Caprine mycoplasmosis wide spread infection in goats with *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* (large colony type), *American Journal of Veterinary Research*, v.44, n.2, p. 322-325, 1983.

DE LA FE, C.; AMORES, J.; MARTIN, A.G. et al. *Mycoplasma agalactiae* detected in the sêmen of goat bucks. *Theriogenology*, v.72, p. 1278-1281, 2009.

DOIG, P.A.; RUHNKE, H.L.; MACKAY, A.L.; PALMER, N.C. Bovine granular vulvitis associated with *Ureaplasma* infection. *The Canadian Veterinary Journal*, v.20, n.4, p. 89-94, 1979.

GREGORY, L.; RIZZO, H.; GAETA, N.C. et al. Interference of *Mycoplasma* spp. or *Ureaplasma* spp. in Ovine Semen Quality. *Journal of Microbiology Research*, v.2, n.5, p.118-122, 2012.

GIL, M.C.; PEÑA, F.J.; MENDOZA, J.H.; GOMEZ, L. Genital Lesions in an Outbreak of Caprine Contagious Agalactia Caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma putrefaciens*. *J. Vet. Med.*, v.50, n.10, p. 484-487, 2003.

JONES, G.E.; FOGGIE, A.; SUTHERLAND, A.; HARKER, D.B. *Mycoplasma* and keratoconjunctivitis. *The Veterinary Record*, v.9, p. 137-141, 1976.

JONES, G.E. Mycoplasmas of sheep and goats: A synopsis. *The Veterinary Record*, v.113, n.24/31, p.619-620, 1983.

JONES, G.E.; HOLMES, R.G.; LISTER, S.A. et al. Isolation of exotic mycoplasma from sheep in England. *The Veterinary Record*, v.113, n.3, p.540, 1983.

KAPOOR, S.G.; SINGH, P.P.; PATHAK, R.C. Prevalence of mycoplasma/acholeplasma in the genital tract of sheep. *The Indian Journal Animal Sciences*, v.54, n.7, p.553-556, 1984.

KUMAR, D.; GUPTA, P.P.; RANA, J.S.; BANGA, H.S. Granular vulvovaginitis (GVV) in sheep experimentally induced with *Mycoplasma ovine/caprino* serogroup 11. *Acta. Vet.*, v.61, p. 241-249. 1992.

LIVINGSTON JR, C.V.; GAUER, B.B. Isolation of T-strain mycoplasma from sheep and goats in Texas. *American Journal Veterinary Research*, v.36, n.3, p.313-314, 1975.

LIVINGSTON JR, C.V.; GAUER, B.B. Occurrence of *Mycoplasma* sp (2D) in texas sheep flock. *American Journal Veterinary Research*, v.44, n.5, p. 868-869, 1983.

MACOWAN, K.J.; MINETTE, J.E. A mycoplasma from acute contagious caprine pleuropneumonia in Kenya. *Tropical Animal Health and Production*, v.8, n.2, p.91-95, 1976.

NICHOLAS, R.A.J.; WESSELS, M.; ORME, P.K. et al. Isolation of *Mycoplasma ovine/caprino* serogroup 11 from infertile sheep in Britain. *The Veterinary Record*, v. 145, n.9, p. 434-435, 1999.

OLIVEIRA, R.C. *Isolamento de ureaplasma e micoplasma do trato reprodutivo de ovinos e caprinos e tipificação genotípica por meio da PFGE e seqüenciamento do gene 16 S rRNA*. 2008. 139f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E. et al. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. 1.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512 p.

RANA, J.S.; GUPTA, P.P.; BANGA, H.S. Pathology of genital tract of goats experimentally infected with *Mycoplasma* serogroup 11. *Indian Journal of Animal Sciences*, v.63, n.7, p.706-709, 1993.

RIZZO, H.; MEIRA JR, E.B.S.; OLIVEIRA, R.C. et al. Isolamento e PCR para detecção de Mollicutes em muco vaginal e sua associação com problemas reprodutivos em ovinos criados na região de Piedade, São Paulo, Brasil. *Ciência Rural*, v.41, n.2, p.324-329, 2011.

- ROCHA, J.M.N. *Micoplasmose em bovinos de aptidão leiteira: Fatores predisponentes para a ocorrência e manifestação da síndrome da vulvovaginite granular*. 2009. 134f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2009.
- SINGH, N.; RAJYA, B.S.; MOHANTY, G.C. Granular vulvovaginitis (GVV) in goats associated with *Mycoplasma agalactiae*. *The Cornell Veterinarian*, v.64, n.3, p.435-442, 1974.
- TRICHARD, C.J.V.; JORDAAN, P.; PROZESKY, L. et al. The identification of *Mycoplasma mycoides mycoides* LC as the aetiological agent of balanoposthitis and vulvovaginitis in sheep South Africa. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v.60, n.1, p.29-37, 1993.
- TURNES, C.G. Brucelose ovina. In: RIET-CORREA et al. (Org.). *Doenças de ruminantes e equinos*. Vol. 1. São Paulo: Varela, 2001. p.197-206.
- WEBB, R.F.; CHICK, B.F. Balanitis and vulvovaginitis in sheep. *Australian Veterinary Journal*, v.52, n.2, p.241-242, 1976.

CAPÍTULO II

Sensibilidade *in vitro* de *Mycoplasma agalactiae* isolados de ovinos e caprinos naturalmente infectados

O presente trabalho foi submetido à revista
Ciência Rural/UFSM – Santa Maria.

Sensibilidade *in vitro* de *Mycoplasma agalactiae* isolados de ovinos e caprinos naturalmente infectados

***In vitro* susceptibility of *Mycoplasma agalactiae* isolated from naturally infected sheep and goats**

Aline Guedes Mamede de Moraes^{1*}, Ana Claudia Campos², Aline Antas Cordeiro³,
Marcia Almeida de Melo⁴, Edisio Oliveira de Azevedo⁵

RESUMO

O presente trabalho objetivou testar a sensibilidade *in vitro* do *Mycoplasma agalactiae* isolados de ovinos e caprinos naturalmente infectados utilizando diferentes antibióticos. Sete amostras de *M. agalactiae* foram submetidas ao antibiograma através do método de diluição em placas nas seguintes concentrações: Tilosina (1µg/mL a 0,0625µg/mL), Enrofloxacina (1µg/mL a 0,0625µg/mL), Oxitetraciclina (0,5µg/mL a 0,03125µg/mL), Estreptomicina (16µg/mL a 1µg/mL), Florfenicol (8µg/mL a 0,5µg/mL), Doxiciclina (1µg/mL a 0,0625µg/mL), Gentamicina (1µg/mL a 0,0625µg/mL) e um bioterápico na formulação 30D. A tilosina e enrofloxacina mostraram-se mais efetivas nas concentrações que variaram de 0,25 a 0,0625µg/mL e a oxitetraciclina e doxiciclina também apresentaram efeito inibitório nas concentrações 0,125 a 0,03125µg/mL e 0,0625µg/mL respectivamente. Estreptomicina, florfenicol, gentamicina e o bioterápico não apresentaram efeitos inibitórios satisfatórios.

Palavras-chave: Antibiograma, Caprino, Microbiologia, Ovino

¹ Aluna do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Av. Santa Cecília, s/n, 58708-110, Patos, PB, Brasil. E-mail: alineguedesmamede@gmail.com *Autor para correspondência.

² Bolsista de Pós-doutorado Empresarial-CNPq. E-mail: anabutron@gmail.com

³ Aluna do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Av. Santa Cecília, s/n, 58708-110, Patos, PB, Brasil. E-mail: aline.antas@hotmail.com

⁴ Professora, Doutora, UFCG, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária. Av. Universitária, s/n. Bairro Sta. Cecília. CEP: 58.708-110, Patos, PB. E-mail: marmelo@cstr.ufcg.edu.br Fone/Fax.: (83) 3511-3048

⁵ Professor, Doutor do Departamento de Medicina Veterinária, UFS, Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos, Av. Marechal Rondon, s/n, Jardim Rosa Elze, CEP: 49100-000, São Cristóvão, SE, Brasil. E-mail: edisio@pq.cnpq.br

ABSTRACT

This study aimed to test the in vitro susceptibility of *Mycoplasma agalactiae* isolated from naturally infected sheep and goats using different antibiotics. Seven samples of *M. agalactiae* were submitted to the antibiotic susceptibility test by dilution plating method at the following concentrations: Tylosin (from 1µg/mL to 0,0625µg/mL), Enrofloxacin (from 1µg/mL to 0,0625µg/mL), Oxytetracycline (from 0,5µg/mL to 0,03125µg/mL), Streptomycin (from 16µg/mL to 1µg/mL), Florfenicol (from 8µg/mL to 0,5µg/mL), Doxycycline (from 1µg/mL to 0,0625µg/mL), Gentamicin (from 1µg/mL to 0,0625µg/mL) and a biotherapeutic in formulation 30D. The enrofloxacin and tylosin were more effective at concentrations ranging from 0,25 to 0,0625µg/mL, oxytetracycline and doxycycline also had an inhibitory effect at concentrations from 0,125 to 0,03125µg/mL and 0,0625µg/mL, respectively. Streptomycin, florfenicol, gentamicin and the biotherapeutic showed no satisfactory inhibitory effects.

Keywords: Antibiotic Susceptibility Test, Goats, Microbiology, Sheep

1 INTRODUÇÃO

A Agalaxia Contagiosa dos Ovinos e Caprinos (ACOC) é uma doença que cursa com um quadro clínico de mastite, seguida de agalaxia, artrite e ceratoconjuntivite. O *Mycoplasma agalactiae* é o principal agente da ACOC, embora outras espécies possam estar envolvidas, como o *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. mycoides* subsp. *capri* e *M. putrefaciens* (AZEVEDO, 2005).

Esses micoplasmas ocorrem na Ásia Ocidental, Norte da África e são difundidos na Europa, especialmente, França, Espanha, Portugal e Itália (LORIA et al., 2003). No Brasil, o isolamento de *M. agalactiae* foi realizado a partir de caprinos doentes em 2001, no Estado da Paraíba (NASCIMENTO et al., 2002; AZEVEDO et al., 2006) e logo a infecção se disseminou para os Estados de Pernambuco e Rio Grande do Norte (AZEVEDO, 2005).

Considerando a ACOC uma doença recente no país, o uso inadequado de antibióticos tem sido adotado como medidas de controle, contudo os custos com medicamentos fazem com que os criadores administrem por períodos curtos, não

eliminando a bactéria, favorecendo a manutenção de portadores e o comércio de animais assintomáticos.

Os β -lactâmicos, principalmente as penicilinas, foram utilizadas por muito tempo, mas a ausência de uma parede celular torna-se uma limitação para o uso dessas drogas uma vez que elas atuam nessa estrutura. Outros antibióticos como as sulfonamidas, polimixinas e rifampicina tem sido ineficientes contra espécies de micoplasmas (ANTUNES et al., 2008).

O tratamento das micoplasmoses baseia-se principalmente na antibioticoterapia sistêmica com o emprego dos macrolídeos, fluorquinolonas e tetraciclina (OLIVEIRA et al., 2004; BERGONIER et al., 1997).

Para obtenção de um resultado terapêutico satisfatório com o uso de antibióticos foi estabelecido o teste de sensibilidade aos antimicrobianos, também denominado de antibiograma, que é uma técnica *in vitro*, na qual os micro-organismos são colocados em contato com um ou mais antimicrobianos de uso terapêutico para serem observados seus efeitos por um período de tempo e incubação pré-determinados. Os resultados podem variar de maneira considerável dependendo do micro-organismo, do antimicrobiano e das condições experimentais (SORIANO, 2002; QUINN et al., 2005).

A avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos é uma prova que avalia qual o antimicrobiano tem maior eficácia contra determinados micro-organismos, resguardando assim a saúde do animal e diminuindo as chances de formar uma população de bactérias resistentes a determinados medicamentos (MATEU & MARTIN, 2001). Essas análises também se revelam como importantes aliadas do ponto de vista clínico, uma vez que fornecem subsídios quanto à concentração necessária de um determinado antimicrobiano (SORIANO, 2002).

Neste sentido, o trabalho teve como objetivo avaliar a sensibilidade *in vitro* do *M. agalactiae* frente a diferentes antimicrobianos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção e cultivo das amostras

Foram obtidas sete amostras, sendo quatro de leite caprino, duas de líquido articular caprino e ovino e uma de suabe vaginal ovino, provenientes dos Estados da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte.

Inicialmente as amostras foram isoladas através de cultivos em meios Hayflick modificado, líquido e sólido e identificadas por PCR específica para *Mycoplasma agalactiae*, como descrito por AZEVEDO (2005).

2.2 Antibióticos e bioterápico

Os antibióticos foram diluídos em água destilada estéril, utilizando o método das diluições duplas (HANNAN, 2000), nas seguintes concentrações: Tilosina (1µg/mL a 0,0625µg/mL), Enrofloxacina (1µg/mL a 0,0625µg/mL), Oxitetraciclina (0,5µg/mL a 0,03125µg/mL), Estreptomicina (16µg/mL a 1µg/mL), Florfenicol (8µg/mL a 0,5µg/mL), Doxiciclina (1µg/mL a 0,0625µg/mL) e Gentamicina (1µg/mL a 0,0625µg/mL).

Também foi testado a sensibilidade frente a um bioterápico produzido homeopaticamente a partir do isolado de *M. agalactiae* na 30ª decimal (30D) e utilizado nas diluições de 1:50 a 1:150.

2.3 Antibiograma

Inicialmente os isolados de *M. agalactiae* na fase log foram diluídos (1:10) e incubados a 37°C por 2 horas. Após esse período, 900µl da cultura foram distribuídos em 100 µl dos antibióticos nas suas respectivas concentrações. Em seguida, todas as amostras contendo os antibióticos foram incubadas a 37°C por mais 2 horas para ação do antibiótico. Posteriormente, 4µl foram semeados em triplicata em meio sólido e incubadas em microaerofilia a 37°C por 72 horas. O controle positivo das amostras foi a cultura do *M. agalactiae* sem antibiótico na diluição de 1:10 e o controle negativo utilizou-se o meio líquido sem cultura e sem antibiótico. A leitura foi realizada diariamente, com a contagem final das colônias nas três repetições após 72 horas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão expressos os valores correspondentes ao número de colônias de cada amostra avaliada frente aos antibióticos.

No controle positivo, o número de colônias compreendeu de quatro a incontáveis Unidades Formadoras de Colônias (UFC), número suficiente para contagem *in vitro*.

Observou-se que a tilosina e enrofloxacina nas concentrações 0,25-0,0625µg/mL apresentaram efeito inibitório *in vitro* nas amostras de *M. agalactiae*. A oxitetraciclina também apresentou resultado satisfatório nas concentrações 0,125-0,03125µg/mL e a doxiciclina na concentração de 0,125 e 0,0625µg/mL. A estreptomicina e o florfenicol apresentaram efeito intermediário sobre a inibição do crescimento das colônias de *M. agalactiae*. Observou-se resistência a gentamicina e ao bioterápico em todas as amostras e concentrações.

Entre as quatro amostras isoladas de leite a 73/09 apresentou uma maior sensibilidade a tilosina, oxitetraciclina e doxiciclina nas concentrações de 0,5-0,125µg/mL e resistência a estreptomicina, florfenicol, gentamicina e bioterápico, com presença de filmes, exceto no bioterápico.

Nas amostras isoladas de líquido articular ovino (77/11) e caprino (151/10) observou-se que a tilosina e a enrofloxacina apresentaram uma maior sensibilidade nas concentrações 0,125 e 0,0625µg/mL, a oxitetraciclina 0,125-0,03125µg/mL e a doxiciclina 0,5-0,0625µg/mL. A estreptomicina, florfenicol, gentamicina e bioterápico apresentaram um efeito intermediário nas duas amostras.

A amostra isolada de suabe vaginal ovino (07/11) apresentou abundante crescimento no controle positivo, demonstrando sensibilidade a tilosina, enrofloxacina, oxitetraciclina e doxiciclina em todas as concentrações. Observou-se efeito intermediário com a estreptomicina e o florfenicol, e resistência a gentamicina e ao bioterápico.

Os resultados obtidos neste estudo confirmam a eficiência da tilosina, enrofloxacina, oxitetraciclina e doxiciclina para o tratamento de infecções por *M. agalactiae*, e que medicamentos a base de florfenicol, estreptomicina e gentamicina não devem ser empregados mesmo apresentando discreta inibição das colônias.

Os macrolídeos, as fluorquinolonas e as tetraciclinas estão entre os antimicrobianos mais utilizados para controle da agalaxia contagiosa (BERGONIER et al., 1997). Neste estudo a tilosina, enrofloxacina, oxitetraciclina e doxiciclina apresentaram melhor efeito inibitório *in vitro* coincidindo com os estudos realizados por LORIA et al. (2003) e ANTUNES et al. (2008).

A resistência e o efeito intermediário da estreptomicina e gentamicina também foi observado nos estudos de ANTUNES et al. (2008). O mesmo autor utilizou um análogo do florfenicol com resultados semelhantes ao do presente estudo.

O bioterápico apresentou resistência no crescimento bacteriano nas amostras estudadas *in vitro*. Contudo, MARINHO (2008) constatou que *in vivo* os sinais clínicos desapareceram sem recidiva. Em duas amostras com presença de colônias e filmes no controle positivo foi observado um comportamento diferenciado, pois não havia presença de filmes nas placas incubadas com o bioterápico, ao contrário do controle positivo.

Os antibióticos têm sido bastante utilizados nas propriedades e até em muitos casos, de maneira indiscriminada, principalmente para fins terapêuticos visando à cura de mastites. Tais procedimentos conduzem à presença de resíduos de antibióticos no leite, representando um risco ao consumidor e sendo, portanto um sério problema na área econômica e de saúde pública (NASCIMENTO et al., 2001).

Os gastos excessivos com medicamentos veterinários poderiam ser corrigidos através de informações suficientes e exatas aos proprietários, veiculadas por pesquisadores, cooperativas e centros de apoio técnico governamentais. A difusão de boas práticas veterinárias levaria a uma redução dos níveis destas substâncias, deixando de ser motivo de preocupação pública (NASCIMENTO et al., 2001).

Tabela 1- Número de colônias de *M. agalactiae* isoladas de sete amostras submetidas ao antibiograma provenientes dos Estados da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte nos anos de 2009, 2010 e 2011

Antib.	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	<i>M. ag.</i> 94/11	<i>M. ag.</i> 77/11	<i>M. ag.</i> 68/11	<i>M. ag.</i> 151/10	<i>M. ag.</i> 88/11	<i>M. ag.</i> 73/09	<i>M. ag.</i> 07/11
Tilos.	1	2c	1c	1c	0	5c	17c	0
	0,5	2c	0	1c	0	3c	0	0
	0,25	0	1c	0	1c	2c	0	0
	0,125	2c	0	0	0	1c	0	0
	0,0625	0	0	0	0	0	12c	0
Enrof.	1	2c	1c	2c	0	3c	0	0
	0,5	1c	1c	0	1c	0	0	0
	0,25	0	1c	0	0	0	0	0
	0,125	0	0	0	0	0	3c	0
	0,0625	0	0	1c	0	0	0	0
Oxi.	0,5	0	0	2c	1c	0	0	0
	0,25	0	2c	1c	0	0	0	0
	0,125	6c	0	0	0	0	0	1c
	0,0625	9c	1c	0	0	1c	9c	0
	0,0312	1c	0	0	0	0	14c	0
Estrept.	16	1c	1c	2c	1c	6c	Inc. c e F	6c
	8	1c	1c	0	1c	7c	Inc. c e F	7c
	4	1c	1c	2c	1c	5c	Inc. c e F	6c
	2	2c	1c	2c	1c	5c	Inc. c e F	5c
	1	0	1c	1c	0	3c	Inc. c e F	5c
Florif.	8	2c	1c	5c	1c	9c	Inc. c e F	8c
	4	3c	1c	5c	1c	10c	Inc. c e F	5c
	2	2c	1c	3c	1c	5c	Inc. c e F	9c
	1	2c	1c	3c	0	9c	Inc. c e F	10c
	0,5	2c	2c	4c	0	7c	Inc. c e F	15c
Doxi.	1	4c	0	0	1c	3c	0	0
	0,5	1c	0	0	0	3c	0	0
	0,25	1c	0	0	0	2c	0	0
	0,125	2c	0	0	0	0	0	0
	0,0625	0	0	0	0	0	10c	0
Gent.	1	5c	2c	4c	1c	4c	Inc. c e F	Inc. c e F
	0,5	3c	1c	3c	1c	5c	Inc. c e F	Inc. c e F
	0,25	4c	1c	3c	1c	3c	Inc. c e F	Inc. c e F
	0,125	3c	1c	2c	1c	3c	Inc. c e F	Inc. c e F
	0,0625	3c	1c	2c	0	2c	Inc. c e F	Inc. c e F
Biot.	1:50	6c	2c	4c	1c	12c	Inc. c	Inc. c
	1:75	5c	2c	3c	2c	8c	Inc. c	Inc. c
	1:100	7c	1c	5c	1c	10c	Inc. c	Inc. c
	1:125	9c	1c	5c	1c	13c	Inc. c	Inc. c
	1:150	8c	1c	6c	1c	13c	Inc. c	Inc. c
Controle +		20c	4c	10c	4c	17c	Inc. c e F	Inc. c e F
Controle -		0	0	0	0	0	0	0

Abreviações: c: colônias; Inc.c: Incontáveis colônias; F: filmes

4 CONCLUSÃO

A enrofloxacina, tilosina, oxitetraciclina e doxiciclina apresentaram melhor efeito inibitório para *M. agalactiae*. Os demais antibióticos e o bioterápico apresentaram discreta inibição de crescimento *in vitro* do *M. agalactiae* nas concentrações utilizadas.

5 REFERÊNCIAS

ANTUNES, N.T. et al. In vitro susceptibilities of Field isolates of *Mycoplasma agalactiae*. *The Veterinary Journal*, v.177, p. 436-438, 2008.

AZEVEDO, E.O. et al. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brazil: First Report. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.37, p.576-581, 2006.

AZEVEDO, E.O. Aspectos clínicos, epidemiológicos e diagnóstico laboratorial da Agalaxia Contagiosa dos Ovinos e Caprinos (ACOC) no Brasil. 2005. 141f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

BERGONIER, D. et al. Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Rev. Sci. Tech.*, v.16, p.848-873, 1997.

HANNAN, P.C.T. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. *Vet. Res.*, v. 31, p.373-395, 2000.

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

MARINHO, M.L. Ação terapêutica do bioterápico de *Mycoplasma agalactiae* em caprinos com agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos. 2008. 113f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

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

NASCIMENTO, E.R. Micoplasmose caprina e ovina. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE O AGRONEGÓCIO DA CAPRINOCULTURA LEITEIRA, 1; SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 2., João Pessoa, PB, 2003. Anais... João Pessoa: EMEPA, 2003. p.141-151.

NASCIMENTO, G.G.F. et al. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. Rev. Nutr., Campinas, v.14, n.2, p.119-124, 2001.

OLIVEIRA, A.A.F.et al. Micoplasmose em pequenos ruminantes. Sobral: Embrapa caprinos, 2004. 29 p.

QUINN, P.J. et al. Microbiologia Veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512 p.

SORIANO, F. Aspectos farmacocinéticos y farmacodinâmicos para La lectura interpretada Del antibiograma. Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica, v. 20, n.8, p.407-412, 2002.

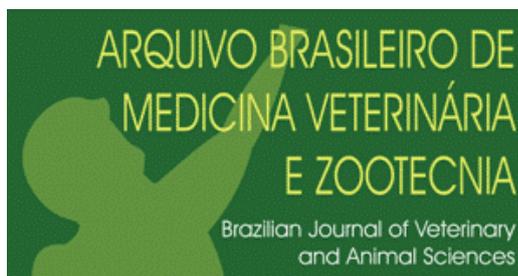
CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que o isolamento de micoplasmas em amostras de suabes vaginais em pequenos ruminantes alerta sobre a necessidade de realizar o isolamento em animais com problemas reprodutivos de causas desconhecidas, uma vez que nos animais estudados o micro-organismo estava presente na mucosa vaginal, como cita a literatura. Contudo não foi comprovada a associação de micoplasmas com a presença de alterações no trato reprodutivo dos machos e fêmeas estudados.

A aplicabilidade do teste *in vitro* representa uma ferramenta importante para minimizar os fracassos terapêuticos no tratamento da agalaxia contagiosa de caprinos e ovinos.

ANEXOS

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Política Editorial

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços www.scielo.br/abmvz ou www.abmvz.org.br.

Orientação para tramitação de artigos

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do ABMVZ no endereço www.abmvz.org.br.
- Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.
- Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo

Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.

- A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido no campo próprio.
- Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.
- O ABMVZ comunicará via eletrônica a cada autor, a sua participação no artigo. Caso, pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será recusado.

Tipos de artigos aceitos para publicação:

▪ Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 30.

▪ Relato de caso

Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 10, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

▪ Comunicação

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico.

O texto, com título em português e em inglês, Autores e Filiação deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para “Artigo científico”, embora seguindo aquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”.

O número de páginas não deve exceder a 8, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto

- O texto deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas, com linhas numeradas.
- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

- **Título.** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.
- **Autores e Filiação.** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Nota:

1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação.
 2. o texto do artigo em pdf **não** deve conter o nome dos autores e filiação.
- **Resumo e Abstract.** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.
 - **Palavras-chave e Keywords.** No máximo cinco.
 - **Introdução.** Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.
 - **Material e Métodos.** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos. Nos trabalhos que envolvam animais e organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.
 - **Resultados.** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.
- ✓ *Tabela.* Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas. Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (menor tamanho aceito é 8).

✓ *Figura*. Qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As fotografias e desenhos com alta qualidade em formato jpg, devem ser também enviadas, em um arquivo zipado, no campo próprio de submissão.

Nota:

✓ Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

✓ As tabelas e figuras devem preferencialmente, ser inseridas no texto no parágrafo seguinte à sua primeira citação.

▪ **Discussão**. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes).

▪ **Conclusões**. As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada.

▪ **Agradecimentos**. Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

▪ **Referências**. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética. Evitar referenciar livros e teses. Dar preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, adaptadas conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

▪ Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

✓ autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)

✓ dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)

✓ mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979)

✓ mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

▪ *Citação de citação*. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

▪ *Comunicação pessoal*. Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. *Miami Herald*, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota:

- Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.
- O Sistema reconhece, automaticamente, como “Desistência do Autor” artigos em diligência ou “Aguardando diligência do autor”, que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

Taxas de submissão e de publicação:

- **Taxa de submissão.** A taxa de submissão de R\$30,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados.

Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.

- **Taxa de publicação.** A taxa de publicação de R\$70,00, por página impressa em preto e R\$220,00 por página impressa em cores será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga

por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

Recursos e diligências:

- No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word.
- No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail journal@vet.ufmg.br.

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA CIÊNCIA RURAL



Normas para publicação

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.
2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via eletrônica e editados em idioma Português ou Inglês. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras. Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem.
3. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão (Modelo .doc, .pdf).
4. A revisão bibliográfica deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão (Modelo .doc, .pdf).
5. A nota deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. Pesquisa

envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão. (Modelo .doc, .pdf).

6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

7. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

9.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. The practice of large animal surgery. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros. Manaus : INPA, 1979. 95p.

9.2. Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. The thyroid. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

9.3. Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. Sampling techniques. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.

TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Artigo completo:

O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICHS, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Stored Product Research*, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. *Ciência Rural*, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

9.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: *JORNADA DE PESQUISA DA UFSM*, 1., 1992, Santa Maria, RS. Anais... Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

9.6. Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad). 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

9.7. Boletim:

ROGIK, F.A. Indústria da lactose. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

9.8. Informação verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

9.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: *WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS*, 31., 2006, Prague, Czech Republic. Proceedings... Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. Transgênicos. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. *Maturitas*, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000.

Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. Anais... Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

10. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

12. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

13. Lista de verificação (Checklist .doc, .pdf).

14. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

15. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

16. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

Sistema de pagamento de taxas

Taxas

A **taxa de tramitação** é de R\$ 60,00 (sessenta reais) e a de **publicação** equivalente a R\$ 85,00 (oitenta e cinco reais) por página impressa. A **taxa de publicação** só será paga quando da **publicação** impressa do artigo.

A **taxa de tramitação é obrigatória para todos os trabalhos**, independentemente do autor ser assinante da Revista. **A taxa de publicação somente deverá ser paga após a revisão final das provas do manuscrito pelos autores.** Professores do Centro de Ciências Rurais e os Programas de Pós-graduação do Centro têm os seus artigos previamente pagos pelo CCR, estando isentos da taxa de publicação. Trabalhos submetidos por esses autores, no entanto, devem pagar a taxa de tramitação.

No caso de impressão colorida, todos os trabalhos publicados deverão pagar um adicional de R\$ 480,00 (quatrocentos e oitenta reais) por página colorida impressa,

independentemente do número de figuras na respectiva página. Este pagamento também deverá ser realizado junto com a taxa de publicação do artigo obedecendo uma das formas previamente mencionadas abaixo.

Pagamentos

Os pagamentos poderão ser efetuados por:

1) Transferência/depósito no Banco do Brasil, Agência 1484-2, Conta Corrente 250945-8 em nome da FATEC (CNPJ: 89.252.431/0001-59) - Projeto 96945. **A submissão do artigo obrigatoriamente deve estar acompanhada da taxa de tramitação**, podendo ser enviada via fax (55 3220 8695/3220 8698), ou anexando o comprovante de depósito bancário escaneado ou ainda enviado por email (cienciarural@mail.ufsm.br) para que se possa fazer a verificação e prosseguir com a tramitação do artigo (Em ambos os casos o nome e endereço completo são obrigatórios para a emissão da fatura).

2) Solicitação de fatura (.doc ou .pdf). Nessa modalidade o formulário disponível deverá ser encaminhado devidamente preenchido via e-mail ou fax (55 3220 8695/3220 8698) para que possamos encaminhar a solicitação à Fundação que administra os nossos recursos e esta encaminhará a fatura ao endereço especificado no formulário.

3) O pagamento da taxa de tramitação também pode ser feito por meio online através de:

a) cartão de crédito (VISA/VISA ELECTRON/MASTERCARD/DINNERS/AMERICAN EXPRESS/HIPERCARD)

b) impressão de boleto (nesta modalidade será adicionado o valor de R\$ 2,00 (dois reais) para a emissão do boleto)

c) transferência entre contas (Banco do Brasil) Ao utilizar um desses meios, deve ser preenchido os campos solicitados com os dados para a emissão do recibo. Após, basta clicar no botão "Realizar pagamento" para ser direcionado ao ambiente seguro da financeira e escolher a modalidade de pagamento.



Ministério da
Ciência e Tecnologia

Ministério
da Educação



Ciência Rural

Universidade Federal de Santa Maria - Centro de Ciências Rurais

Prédio 42, Sala 3104 97105-900 - Santa Maria, RS, Brasil

E-mail: cienciarural@mail.ufsm.br

Fone/Fax: (55) 32208698

Fax: (55) 32208695