DENISE JAQUETO DE BARROS PINHEIRO

Determinação da concentração inibitória mínima de antibióticos contra ureaplasmas isolados de bovinos pela inibição de crescimento e citometria de fluxo

São Paulo

2012

DENISE JAQUETO DE BARROS PINHEIRO

Determinação da concentração inibitória mínima de antibióticos contra ureaplasmas isolados de bovinos pela inibição de crescimento e citometria de fluxo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Jorge Timenetsky

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2542
FMVZ

Pinheiro, Denise Jaqueto de Barros

Determinação da concentração inibitória mínima de antibióticos contra ureaplasmas isolados de bovinos pela inibição de crescimento e citometria de fluxo / Denise Jaqueto de Barros Pinheiro. -- 2012.
85 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky.

1. Citometria de fluxo. 2. Concentração inibitória mínima. 3. Ureaplasmas.
4. Antibióticos. 5. Inibição de crescimento. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Determinação da concentração inibitória mínima de ureaplasmas isolados de bovinos pela inibição de crescimento", protocolado sob o nº 2035/2010, utilizando amostras biológicas de 12 (doze) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Jorge Timenetsky, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 27/10/2010.

We certify that the Research "Determination of minimum inhibitory concentration of ureaplasmas isolated from cattle by inhibition of growth", protocol number 2035/2010, utilizing 12 (twelve) cattle, under the responsibility Prof. Dr. Jorge Timenetsky, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/27/2010.

São Paulo, 28 de outubro de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PINHEIRO, Denise Jaqueto de Barros

Título: Determinação da concentração inibitória mínima de antibióticos contra ureaplasmas isolados de bovinos pela inibição de crescimento e citometria de fluxo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

De forma singular, dedico este trabalho àqueles que querem descomplicar as coisas, investir na felicidade, passar a ver o lado bom dos acontecimentos, exilar o passado, pensar e agir diferente... sempre com otimismo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior), pelo suporte financeiro concedido durante o curso, sem o qual não teria sido possível a minha dedicação total ao presente trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Pai e Amigo, que sempre me acompanhou nessa jornada chamada vida me auxiliando e mostrando o caminho que devo seguir.

Ao meu orientador, Jorge Timenetsky, pela oportunidade no desenvolvimento deste trabalho. Uma pessoa realmente admirável e generosa que dispensou tempo, compreensão e paciência para me conduzir tão habilidosamente até esta conquista. Espero poder retribuí-lo profissionalmente, pelo menos na mesma medida.

Aos meus pais, irmãs e sobrinhos, que são a base da minha vida. Obrigada por tudo, pois devo a vocês tudo o que sou e serei.

Ao Lucas Miranda Marques, uma pessoa maravilhosa, inefável, que não mediu esforços para me auxiliar nesse trabalho.

À Aricelma Pinheiro de França (Celminha, a “capitã do laboratório”) pelos ensinamentos, pela força, pela amizade e por ser uma pessoa tão dedicada e trabalhadora servindo como um grande exemplo a ser seguido por todos que passam pelo laboratório.

A Elena Mettifogo, pela ótima pessoa que é e pela grande contribuição para o ramo da micoplasmologia brasileira.

Aos membros da banca, que disponibilizaram tempo para ler e avaliar este trabalho.

Aos amigos do laboratório: Carlos, Angelita, Carol, Guilherme, Tássia, Ana e Melissa pela ajuda e companheirismo durante o desenvolvimento deste trabalho, e pelas boas risadas (incluindo Lucas e Celma também, lógico).

Ao professor Taborda e seus pós-graduandos, principalmente ao Julian, pessoa sem igual, sempre solícito e dedicado, que me auxiliou no uso do citômetro de fluxo.

Aos professores Rita Café e Luis Carlos do CEVAT, por abrirem as portas de seus laboratórios para uso do citômetro de fluxo e centrífuga de placa.

Aos técnicos Loraine e Eduardo pela grande ajuda que me prestaram no CEVAT.

Aos pós-graduandos do CEVAT: Roberto, Milene, Mariana, Cariri, Rafael, Priscila, Carol, Jaime e principalmente à Renata e Juliana que me ajudaram bastante quando precisei de orientação para o uso do citômetro e centrífuga de placa, e pela companhia durante os procedimentos. Muito obrigada, vocês fizeram toda a diferença.

Ao professor Nilton Lincopan e toda sua equipe do laboratório, pela ajuda concedida durante este trabalho.

Aos funcionários da sala de esterilização do ICB II: Zé, Cláudia, Elaine e Elza, pela enorme prestatividade.

Aos funcionários responsáveis pela limpeza e vigilância (principalmente ao Eduardo) do ICB II. Obrigada, sem vocês a pesquisa não seria o que é hoje.

Aos funcionários: Alice, Aninha, Naíde e Bruno, da secretaria do departamento de microbiologia do ICB II pelas informações necessárias durante o curso.

Aos funcionários da biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas e da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia pelo auxílio prestado na preparação deste trabalho.

Aos funcionários do VPS, sobretudo à Tânia, que me orientou em todos os passos que necessitei para a conclusão do mestrado.

Aos meus grandes amigos de sempre, Bruno, Erika, Saulo, Paula, Aline, Goulart, Thamy, Elisa, Mariane, Gizah, Fabi (prima), Adriana, Regeane, Tatiane e Priscilinha que fazem parte da família que escolhi e me dão suporte para continuar a trilhar os caminhos da vida. Aqui faço um agradecimento especial à Aline que me ajudou no decorrer dessa dissertação. Valeuzão Aline !

Aos amigos conquistados durante a realização desta dissertação: Ednei, Luis Llanco, Ana Júlia e tantos outros, que fizeram parte das minhas alegrias durante o curso. Espero que continuemos sempre mantendo contato e dando boas risadas.

A todos meus outros amigos aqui não mencionados (de outras cidades, Estados e países também), que alegam o meu dia e me dão palavras de incentivo sempre.

A todos, aqui não mencionados, que de alguma forma viabilizaram o desenvolvimento deste trabalho.

“O sucesso torna as pessoas modestas, amigáveis e tolerantes; é o fracasso que as faz ásperas e ruins...”

William Maugham

RESUMO

PINHEIRO, D. J. B. **Determinação da concentração inibitória mínima de antibióticos contra ureaplasmas isolados de bovinos pela inibição de crescimento e citometria de fluxo.** [Determination of minimum inhibitory concentration of ureaplasmas isolated from cattle by inhibition of growth and flow cytometry]. 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Os Mollicutes causam doenças em várias espécies animais de importância econômica, inclusive em bovinos. Neste estudo, foi avaliada por concentração inibitória mínima (CIM) e citometria de fluxo, a atividade de oito agentes antibacterianos (enrofloxacina, ciprofloxacina, gentamicina, claritromicina, cloranfenicol, oxitetracina, tiamulina e tilosina) contra *Ureaplasma diversum*. Foram analisadas 24 amostras de isolados de campo oriundas da mucosa genital de fêmeas bovinas. As amostras foram confirmadas por crescimento em caldo, placa e por PCR. Os inóculos foram submetidos à análise de suscetibilidade aos antibióticos pelo método da microdiluição em microplaca e posteriormente analisados pelo citômetro de fluxo a fim de avaliar a atividade antimicrobiana nas células. A claritromicina apresentou os maiores índices de inibição *in vitro*, sendo a gentamicina considerada o antibiótico de menor espectro de ação nesse estudo. De acordo com as análises do citômetro, a gentamicina apresentou o menor número de células viáveis enquanto a tiamulina apresentou o maior número. Embora haja resultados destoantes entre as técnicas utilizadas, o citômetro de fluxo pode ser utilizado como uma boa ferramenta para auxiliar a avaliação da suscetibilidade desses microrganismos a antibióticos.

Palavras-chave: *Ureaplasma diversum*. Concentração inibitória mínima. Citômetro de fluxo, Antibióticos. CIM. Suscetibilidade.

ABSTRACT

PINHEIRO, D. J. B. **Determination of minimum inhibitory concentration of ureaplasmas isolated from cattle by inhibition of growth and flow cytometry.** [Determinação da concentração inibitória mínima de ureaplasmas isolados de bovinos pela inibição de crescimento e citometria de fluxo]. 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The Mollicutes cause disease in several economically important species, including cattle. In this study, was evaluated by minimum inhibitory concentration (MIC) and flow cytometry, the activity of eight antibacterial agents (enrofloxacin, ciprofloxacin, gentamicin, clarithromycin, chloramphenicol, oxitetracina, tiamulin and tylosin) against *Ureaplasma diversum*. We analyzed 24 samples of field isolates originating from the genital mucosa of cows. The samples were confirmed by growth in broth, plate, and PCR. The inoculations were subjected to analysis of susceptibility to antibiotics by the method of micro-dilution plate and then analyzed by flow cytometry to assess the antimicrobial activity in cells. Clarithromycin showed the highest levels of inhibition in vitro, the antibiotic gentamicin considered lower spectrum of action in this study. According to the analysis of the flow cytometer, gentamicin showed the lowest number of viable cells as tiamulin showed the greatest number. Although there are divergent results between the techniques used, flow cytometry can be used as a good tool even help assess the susceptibility of microorganisms to antibiotics.

Keywords: *Ureaplasma diversum*. Minimum inhibitory concentration. Flow cytometry. Antibiotics. MIC. Susceptibility.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações dos antibióticos (ciprofloxacina, enrofloxacina, claritromicina e tilosina) utilizados para a determinação do CIM (em µg/mL) contra amostras de ureaplasma.....	42
Tabela 2 – Concentração dos antibióticos (cloranfenicol, gentamicina, oxitetraciclina e tiamulina) utilizados na determinação do CIM (µg/mL) contra amostras de ureaplasma	43
Tabela 3 – Variação da concentração inibitória mínima (µg / mL) para vários agentes antimicrobianos contra ureaplasmas segundo autores e no presente experimento	44
Tabela 4 – Tempo de crescimento de amostras de <i>U. diversum</i> em 900 µL de meio UB a 37°C em microaerofilia (ureaplasmas previamente estocados a -70°C em caldo UB).....	48
Tabela 5 – Unidades de alteração de cor (C.C.U.) obtidas do inóculo de cada amostra de <i>U diversum</i>	54
Tabela 6 – CIM em µg/mL dos antibióticos contra 24 amostras de <i>U. diversum</i> (U.d.) isoladas do aparelho genital de fêmeas bovinas	57
Tabela 7 – CIM em µg/mL dos antibióticos contra 24 amostras de <i>U. diversum</i> (U.d.) isoladas do aparelho genital de fêmeas bovinas	58
Tabela 8 – Amostras de ureaplasma resistentes, por propriedade rural, ao antibiótico Enrofloxacina.....	62
Tabela 9 – Amostras de ureaplasma resistentes, por propriedade rural, ao antibiótico Cloranfenicol.....	62
Tabela 10 – Amostras de ureaplasma resistentes, por propriedade rural, ao antibiótico Gentamicina.....	63
Tabela 11 – Amostras de ureaplasma resistentes, por propriedade rural, ao antibiótico Oxitetraciclina	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Mollicutes	16
1.1.1	Características Gerais dos Mollicutes	17
1.1.2	Doenças e patogenia.....	18
1.1.3	<i>Ureaplasma diversum</i>	20
1.1.4	Diagnóstico microbiológico dos Mollicutes	21
1.1.5	Antibioticoterapia	23
1.2	Antibióticos e Mollicutes	24
1.2.1	Resistência dos Mollicutes aos antibióticos.....	27
1.2.2	Métodos de avaliação dos antibióticos contra Mollicutes	28
2	OBJETIVOS.....	31
2.1	Objetivo geral.....	31
2.2	Objetivos específicos.....	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	Cepa de referência e isolados de <i>Ureaplasma diversum</i>.....	32
3.2	Meios de Cultura.....	32
3.2.1	Meio de transporte para isolamento de Micoplasmas e Ureaplasmas	33
3.2.2	Meio líquido para Ureaplasma – UB (100mL)	33
3.2.3	Meio sólido para cultivo de ureaplasma (Agar UB – 100 mL).....	34
3.3	Subcultivo das cepas e isolados clínicos de <i>U. diversum</i>	34
3.4	Extração do DNA das amostras de ureaplasma	35
3.5	Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).....	36
3.6	Concentração dos reagentes na PCR (DNA, Mg Cl, “primers”, dNTPs e unidades de <i>Taq</i> DNA polimerase)	36

3.7	Temperaturas de hibridização.....	37
3.8	Eletroforese e análise do perfil de fragmentos.....	37
3.9	Unidades de alteração de cor (Color Changing Units – C. C.U.).....	37
3.10	Antibióticos.....	38
3.10.1	Classes.....	38
3.10.2	Obtenção das concentrações dos antibióticos em solução	38
3.10.3	Preparo das soluções dos antibióticos	39
3.10.4	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	40
3.11	Determinação da CIM (ponto de corte).....	44
3.12	Centrifugação e preparo das amostras de <i>Ureaplasmas</i> para uso no Citômetro de Fluxo.....	45
3.13	Citômetro de Fluxo.....	45
4	RESULTADOS.....	48
4.1	Tempo de crescimento do inóculo das amostras de <i>U. diversum</i>	48
4.2	Confirmação do crescimento de <i>Ureaplasma diversum</i> em meio sólido.....	49
4.3	Confirmação das amostras de <i>U. diversum</i> pela PCR	51
4.4	Determinação das Unidades de Alteração de Cor (C.C.U. – Color Change Units)..	53
4.5	Interferência do álcool na determinação do CIM para a solubilização da Enrofloxacin e Cloranfenicol.....	56
4.6	Determinação das CIMs	56
4.7	Resistência	62
4.8	Citometria de Fluxo	64
5	DISCUSSÃO	69
6	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

Com dimensões semelhantes aos maiores vírus, os mollicutes são os menores organismos de vida livre, sendo que a falta da parede celular e presença de colesterol na membrana celular os diferenciam principalmente das bactérias convencionais. Os Mollicutes causam doenças em várias espécies animais de importância econômica, sobretudo em bovinos.

1.1 Mollicutes

O primeiro cultivo de mollicutes foi descrito em 1898 por Edmond Nocard e Pierre Paul Émile Roux, durante estudos sobre a pleuropneumonia bovina, doença observada há mais de um século na Europa e África. Apesar de o agente possuir características semelhantes ao conhecimento do vírus na época, o microrganismo crescia em meios de cultura de modo similar às bactérias (MOROWITZ, 2002).

Outros microrganismos semelhantes foram relatados posteriormente em outros animais e no homem e portanto, todos os achados eram denominados de PPLO–“Pleuropneumonia-Like-Organisms” (RAZIN, 1992).

Os mollicutes parasitam células humanas, animais, de artrópodes e de plantas. Estes agentes constituem ainda, um fator importante na contaminação inesperada de culturas celulares, podendo causar diversas alterações citogenéticas, interferir na replicação viral, na produção de anticorpos, interferon, reagentes e outros bioprodutos (RAZIN et al., 1998).

Geralmente esses microrganismos colonizam preferencialmente superfícies de mucosa, sendo a maioria das espécies considerada não invasiva (YODER et al., 1991; GRZESKO et al., 2006).

Existem cerca de 200 espécies de mollicutes (anteriormente designados de micoplasmas) distribuídas entre o homem, animais, insetos e plantas. Atualmente, o termo micoplasma representa apenas o gênero *Mycoplasma* com 17 espécies de origem humana e cerca de 80 de origem animal (JOHANSSON; PETTERSSON, 2002).

1.1.1 Características Gerais dos Mollicutes

Com dimensões semelhantes aos maiores vírus (0,2 a 0,4 micras), os micoplasmas são os menores microrganismos de vida livre, diferenciando-se das bactérias convencionais pela ausência completa da parede celular e presença de colesterol na membrana plasmática (RAZIN et al., 1998).

Estas bactérias possuem apenas a membrana celular com esteróis como único envoltório que pode conter o menor genoma entre os seres vivos de vida livre, portanto têm reduzido metabolismo. O genoma varia de 580 a 2200 kbp com baixo teor de C+G (Citosina e Guanina), possuem baixo número de genes de reparo de DNA e com uma a duas cópias para RNA. No decorrer da evolução das bactérias Gram positivas, nos nichos a que estes organismos se adaptaram, resultou a formação do pequeno genoma. Nos mamíferos os mollicutes preferem usualmente as células das mucosas do trato respiratório e trato genito urinário. São também conhecidos como microrganismos oportunistas por excelência (MUTO; USHIDA, 2002).

De acordo com a classificação atual, esses microrganismos pertencem ao Reino Procaryotae, Filo Tenericutes, Classe Mollicutes (lat: *mollis*, mole; *cutis*, pele), cuja composição abrange quatro ordens: Mycoplasmatales, Entomoplasmatales, Achleapasmatales e Anaeroplasmatales; sete famílias: Mycoplasmataceae, Entomoplasmataceae, Spiroplasmataceae, Achleapasmataceae e Anaeroplasmataceae (sendo 2 ainda consideradas *Incertae sedis*); e onze gêneros: *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Eperythozoon*, *Haemobartonella*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Achleaplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma* e *Candidatus phytoplasma* (BERGEY, 2010).

As espécies de ureaplasmas diferenciam-se de outros mollicutes por necessitarem da uréia para o crescimento e também por não conterem ácidos graxos em sua estrutura. Existem sete dessas espécies, duas de importância humana e cinco de importância animal. Possuem a característica de não suportarem a alcalinização in vitro provocada da hidrólise da uréia no meio de cultura. Esta problemática é a principal responsável pelo prejuízo no avanço do estudo deste grupo de mollicutes. Desta maneira o conhecimento da sensibilidade dos isolados de

ureaplasmas aos antibióticos de importância animal é menos conhecida se comparada aos de importância humana (RAZIN; TULLY, 1983).

1.1.2 Doenças e patogenia

As principais doenças causadas pelos mollicutes nos animais e no homem estão relacionadas a problemas respiratórios e urogenitais, mas podem atingir articulações e a glândula mamária principalmente de bovinos e ovinos. As infecções em outros sítios anatômicos também ocorrem, mas em geral são menos frequentes ou menos estudados. Assim sendo, os mollicutes, apesar de crescerem em meios de cultura, preferem os nutrientes da superfície de células de mucosas de mamíferos como o sistema respiratório, glândulas mamárias, membranas serosas e trato urogenital (FREY, 2002).

M. pneumoniae é um dos mollicutes mais estudados e causa a pneumonia atípica no homem e pode ocorrer uma manifestação sistêmica principalmente no indivíduo imunocomprometido. Pode também ocorrer a asma e outras doenças crônicas de pulmão e outras síndromes extrapulmonares. As infecções do trato urogenital de homens e mulheres por *M. hominis*, *U. urealyticum* e *U. parvum* também são estudadas. Estes, causam vaginose bacteriana, cervicite e inflamação pélvica, além de desordens reprodutivas, uretrite, prostatite, orquite, cistite e pielonefrite. Muitos estudos mencionam a associação entre isolamento de *Ureaplasma* spp. do cório e âmnion, além de morbidade e mortalidade neonatal devido a pneumonia congênita. Estes mollicutes também podem causar artrite, infecções sistêmicas e desempenhar um papel de cofator com o vírus HIV, no desenvolvimento da AIDS (BLANCHARD; BÉBÉAR, 2002).

Os mollicutes em geral são menos conhecidos quanto a sua biologia nos animais se compararmos ao conhecimento com as espécies de origem humana. Vale mencionar os micoplasmas de origem murina, em vida saprofítica, pois afetam a fisiologia de camundongos e ratos prejudicando ou invalidando os resultados da pesquisa biomédica. No oportunismo podem causar artrites, doenças genitais e doença respiratória nestes animais (SIMECKA, 2005).

As espécies de mollicutes de origem bovina causam artrite, mastite, doenças genitais e reprodutivas, pneumonia em bezerros e conjuntivite. Em caprinos e ovinos, as principais afecções estão relacionadas a artrites, doenças respiratórias, mastite, pleuropneumonia, conjuntivite e pneumonia proliferativa intersticial. Nos suínos, a principal infecção é a pneumonia enzoótica, seguida por artrite. Nas aves, causam transtornos como saculite aérea (infecciosa e branda), sinusite e artrite (SIMECKA et al., 1992).

O processo de virulência dos mollicutes pode ser complexo e variado sendo que em muitas espécies é desconhecido. As células do hospedeiro fornecem os substratos necessários para o desenvolvimento microbiano disponibilizando os precursores de lipídeos, purinas e pirimidinas pré-formadas (TRYON; BASEMAN, 1992).

Verificou-se que algumas espécies são capazes de mimetizarem ou modularem a resposta imune do hospedeiro. In vivo usualmente aderem à superfície de células por adesinas, sendo que algumas espécies possuem estruturas polares especializadas para esta propriedade. Existem espécies como *M. fermentans* que é capaz de realizar fusão com a membrana celular e provocar trocas antigênicas provocando respostas autoimunes. Também verificou-se que são capazes de invadir o citoplasma e núcleo das células hospedeiras. Diferente das bactérias com parede celular, incorporam em sua membrana o colesterol do ambiente e, além disso, não possuem o ciclo do TCA, síntese de parede celular, ácido fólico e purinas. Algumas enzimas do seu metabolismo não existem ou são diferentes das encontradas nas bactérias com parede celular. O códon UGA ao invés de ser um códon non sense possui triptofano em algumas espécies (MUTO; USHIDA, 2002).

O mecanismo de destruição de células eucariotas inicia-se pela aderência dos mollicutes utilizando-se das proteínas de dinâmica complexa que ligam-se aos receptores das células hospedeiras e multiplicam-se. Dependendo da espécie liberam metabólitos como H_2O_2 , NH_3 , lipases, nucleases e proteases. Algumas espécies foram caracterizadas intracelularmente. Considerando os mollicutes como sendo microrganismos de crescimento lento, estes podem não destruir a célula hospedeira, mas stressá-la tornando-a mais vulnerável as outras agressões (TRYON; BASEMAN, 1992).

1.1.3 *Ureaplasma diversum*

U. diversum foi isolado pela primeira vez em 1967 do trato urogenital de vacas aparentemente saudáveis. Portanto foi considerado inicialmente como agente não-patogênico por pertencer à microbiota natural (TAYLOR-ROBINSON; HAIG; WILLIAMS, 1967). Estudos subsequentes isolaram este ureaplasma de pulmões de bezerros com pneumonia (GOURLAY; MACKENZIE; COOPER, 1970). Posteriormente, este ureaplasma foi isolado de animais com vulvovaginites, infertilidade, pneumonia e ceratoconjuntivites (KIM et al., 1994). *U. diversum* está associado à pneumonia dos bezerros, doenças genitais (por exemplo, vulvovaginite granulomatosa) e conjuntivite nesses animais (SIMECKA et al., 1992).

No Brasil, o primeiro registro da presença de *Ureaplasma diversum* em bovinos foi efetuado por Cardoso et al. (1997), a partir de muco vaginal de fêmeas que apresentavam Vulvovaginite Granular.

U. diversum é capaz de produzir severa placentite e alveolite fetal, que pode resultar em aborto ou mesmo nascimento de bezerros fracos. A infecção apresenta-se de forma crônica, onde o microrganismo multiplica-se no feto, a bactéria pode ser eliminada pela urina e por descarga vulvar após a expulsão do bezerro (MILLER et al., 1983). Este ureaplasma foi associado a aborto e morte de bezerros neonatos. Foi isolado do pulmão de fetos abortados e detectado pela histopatologia nas lesões pulmonares (RUHNKE et al., 1984). Alguns estudos relatam a patogenicidade de *U. diversum* no trato respiratório através da inoculação experimental deste organismo em bezerros, reproduzindo a doença. Por exemplo, Howard et al. (1976) inocularam o agente endobronquialmente e concluíram que a espécie era patogênica para bezerros devido à morte destes animais.

Ter Laak, Vandijk e Noordergraaf (1993), com o mesmo tipo de inoculação, observaram a formação de um agrupamento de células arredondadas ao redor dos brônquios e bronquíolos e o desenvolvimento de pneumonia lobular catarral. O acúmulo de dados associados à patogenicidade de *U. diversum* na literatura convenceu a comunidade científica a reconhecer a importância deste ureaplasma nas doenças em bovinos, caracterizando-o também como um excelente oportunista cujas variações genotípicas podem estar associadas. No entanto, os ureaplasmas

em geral são menos conhecidos do que os micoplasmas principalmente pela sua manutenção após isolamento (CARDOSO; VASCONCELLOS, 2004).

As vias de eliminação de mollicutes ocorrem por meio de secreções orgânicas como sêmen, muco prepucial e vaginal, além de secreção conjuntival e leite. A transmissão ocorre por contágio indireto, através de equipamentos contaminados como pipetas de inseminação e teteiras de ordenha, porém, a principal forma de transmissão é o contágio direto pelo sêmen, onde touros infectados disseminam os agentes através da monta natural ou inseminação artificial (KIRKBRIDE, 1987; BRITTON et al., 1988; MILLER et al., 1994).

1.1.4 Diagnóstico microbiológico dos Mollicutes

O sucesso no isolamento de mollicutes de seus habitats naturais, requer que os materiais clínicos sejam obtidos e imediatamente semeados nos meios de cultura. Mesmo na obtenção de amostras clínicas de animais a campo requerem acondicionamento e transporte adequado para o laboratório (CLYDE; McCORMACK, 1983).

Não há um único meio de cultura que seja adequado para o isolamento de todos os mollicutes, ou mesmo da maioria das espécies conhecidas. Apesar de todos meios de cultura para mollicutes conterem triptona, peptona, soro animal e extrato fresco de levedura, estes podem estar em proporções diferentes. Além disso, é necessário adicionar os componentes específicos dos principais grupos desses microrganismos. Desta maneira, existem variações nas concentrações ou inclusão de indicadores de pH e suplementos como a glicose, arginina, uréia, ácidos nucléicos, entre outros e até certos impedientes para minimizar o crescimento de bactérias “convencionais” (TULLY, 1983). Por serem pequenos os Mollicutes usualmente não turvam caldos, mas alteram o pH nos caldos específicos. A falta de parede celular, facilidade de perda de nutrientes para o meio externo e metabolismo diferente entre as espécies devem também ser considerada para o acondicionamento ideal do material clínico para o laboratório (CLYDE; McCORMACK, 1983).

Os Mollicutes em geral crescem no meio descrito originalmente por Edward em 1947 e modificado por Hayflick em 1965.

Os Ureaplasmas são mollicutes diferentes de outros mollicutes, têm urease e a hidrólise da uréia produz a energia para o crescimento “in vitro” deste gênero (SHEPARD, 1983). O meio líquido para cultivo de Ureaplasmas é inicialmente ácido de cor amarela, se existir vermelho de fenol, após o crescimento ocorre a liberação de amônia do metabolismo da uréia que torna o caldo vermelho intenso. Na existência do indicador de pH, azul de bromotimol, passa de verde para amarelo. O meio com Ágar pode ser de dois tipos: meio Ágar padrão e meio Ágar diferenciado. As colônias de Ureaplasmas no Ágar padrão são identificados por aplicação direta de “spot test” para urease enquanto no ágar diferenciado, inclui-se um cátion divalente indicador da atividade da urease e produção de amônia. As colônias de Ureaplasmas em ambos os meios de Ágar desenvolvem cor marrom escura (SHEPARD, 1983).

A produção e uso de antígenos recombinantes aprimorou a tecnologia das reações imunoenzimáticas na detecção de anticorpo no hospedeiro infectado ou mesmo na obtenção de anticorpos monoclonais para as técnicas imunohistoquímicas. O diagnóstico considerado padrão ouro ainda é a cultura, mas Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ganha importância e confirma os achados. A PCR combinada com outros testes também é valorizada. Na PCR existem “primers” de oligonucleotídeos projetados para a sequência de gene 16S do rDNA (DNA ribossômico). Em alguns casos a identificação das espécies é auxiliada pela análise do amplicon da reação de Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP). Além da PCR outras as técnicas de diagnóstico molecular, incluem-se a imunofluorescência, aglutinação ou hemaglutinação, inibição de crescimento ou metabolismo, “imunoblotting”, “imunobinding” podem ser usadas para o diagnóstico das micoplasmoses humanas e animais (MARKHAM; NOORMOHAMMADI, 2005).

1.1.5 Antibioticoterapia

O tratamento com antibióticos (sobretudo tetraciclina) para o tratamento de micoplasmoses humana em geral é eficaz, no entanto, existem algumas amostras de mollicutes do trato urogenital que possuem gene de resistência Tet. A utilização de antimicrobianos na pecuária é clássica, principalmente para evitar perdas econômicas relacionadas aos animais de produção. Embora oneroso, o tratamento desses animais por meio do uso de antimicrobianos deve ser aplicado para o controle de certas doenças como a pneumonia enzoótica suína, causada pelo *Mycoplasma hyopneumoniae*. Tal micoplasma se difunde rapidamente sob condições ambientais favoráveis em suínos na fase de crescimento e terminação. Práticas inadequadas de manejo, incluindo alta densidade, falta de higiene das instalações e fatores ambientais associados, como ventilação inadequada, podem aumentar a concentração de contaminantes aéreos, o que potencializa os impactos da pneumonia suína. A doença está disseminada nas criações brasileiras (MORENO; BARBARANI; BACCARO, 1999).

In vitro, *M. hyopneumoniae* é suscetível a vários antibióticos, incluindo fluoroquinolonas, tetraciclina, espiramicina e tiamulina. No entanto, embora os tratamentos com antimicrobianos sejam usualmente capazes de controlarem a doença, é observada ainda uma persistência da mesma em condições a campo e em infecções experimentais (ROSS, 1999; VICCA et al., 2005).

O tratamento de aves com antimicrobianos, embora diminua o índice de manifestações clínicas e também a taxa de transmissão transovariana, não erradica o agente do plantel, sendo um procedimento recomendado tanto para poedeiras quanto para frangos de corte. As terapias com drogas antimicrobianas podem prejudicar o diagnóstico das micoplasmoses aviárias por inibir ou reduzir a resposta imune e por diminuir a concentração de bactérias do trato respiratório superior, dificultando também o isolamento do agente (INSTITUTO BIOLÓGICO, [2011]).

O primeiro caso de mastite bovina por *Mycoplasma agalactiae subsp. Bovis* foi relatado por Hale et al. em 1962, posteriormente denominado por Aska e Erno (1976) de *Mycoplasma bovis*. No Brasil, a primeira citação de mastite por *M. bovis* foi de Mettifogo et al. (1996) na região de Londrina, Estado do Paraná. O uso de antibióticos na produção animal é considerado pela Organização Mundial de Saúde

(Departamento de Doenças Emergentes e Outras Doenças Notificáveis) um risco crescente para a saúde humana. Há um trabalho de técnicos de órgãos oficiais e associações de consumidores em prol da restrição total ao uso de antibióticos como promotores de crescimento na Europa (EMBRAPA, [2011]).

Recentemente o Ministério da Agricultura vetou a utilização do cloranfenicol em animais de produção no Brasil devido ao potencial de toxicidade dos resíduos presentes nos produtos destinados ao consumo humano. O mesmo órgão determinou o recolhimento de todos os produtos à base de cloranfenicol do comércio de produtos veterinários (MAPA, [2011]; SOUSA; SANTANA, [2011]).

Mycoplasma bovis, *M. bovis genitalium* e *Ureaplasma diversum* são considerados os patógenos de maior importância para o trato genital, dentre as micoplasmoses de origem bovina. Esses microrganismos estão associados a vulvovaginite granular, endometrite, salpingite, aborto e infertilidade em vacas (MILLER et al., 1983; AHMED; SABRY; ZAKI, 1998). No Brasil, a pesquisa dessas espécies em bovinos é pouco frequente (BUZINHANI; METTIFOGO; TIMENETSKY, 2007).

Apesar de existirem dados internacionais em relação a sensibilidade de *U. diversum* a agentes antimicrobianos, estas informações são ainda desconhecidas no Brasil contra os isolados obtidos de bovinos. Sendo assim, devido à importância econômica de *U. diversum* na pecuária bovina brasileira, o uso de antibióticos contra esse mollicute em bovinos ainda se mantém imprescindível para manutenção da saúde do rebanho nacional.

1.2 Antibióticos e Mollicutes

Considerando os mecanismos de ação dos principais antibióticos, os mollicutes são naturalmente resistentes aos antibióticos betalactâmicos, sulfonamidas e rimfamycin por falta do alvo específico. Os testes de sensibilidade aos antibióticos nos mollicutes não podem ser também comparados ao utilizado para bactérias “convencionais”. O método de difusão Bauer-Kirby não se aplica pela diferenciada forma de crescimento produzindo usualmente pequenas colônias em forma de “ovo frito”. O meio sólido para mollicutes possui 50% menos de Ágar que

contribui na formação das colônias típicas. Desta maneira, a difusão das drogas no meio sólido é maior. Adicionalmente existem grandes variações no tempo de divisão celular entre as espécies e consequentemente a formação de colônias típicas ou alteração de pH no caldo que varia de três horas a 15 dias. Desta maneira a metodologia da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para antibióticos em caldo, adaptada aos grupos de mollicutes é a que mais se aproxima aos ensaios aplicados para bactérias “convencionais”. Apesar da determinação do MIC em Ágar ser também aplicável para os mollicutes, além de indicar a percentagem de redução destes microrganismos, é por outro lado, muito trabalhosa e praticamente inviável para avaliar vários isolados. A difusão em gradiente tipo (E-Test) é viável e foi aplicado para poucos antibióticos e poucas espécies de micoplasmas (BÉBÉAR; BÉBÉAR, 2002).

As tetraciclinas são antibióticos que se ligam aos ribossomos 30S das bactérias. Estes agentes parecem inibir a ligação do aminoacil-tRNA no sítio A do ribossomo dos procariontes. A ligação à tetraciclina é transitória, sendo assim, estes agentes são considerados bacteriostáticos. No entanto, inibem o crescimento de uma grande variedade de bactérias, incluindo clamídias e micoplasma. Existem importantes classes de drogas que inibem a subunidade ribossomal 50S. O cloranfenicol é bacteriostático, e inibe o crescimento das bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. Estes, inibem a formação de ligação peptídica através da ligação à enzima peptidiltransferase na subunidade 50S do ribossomo. Os Macrolídeos são formados por grandes compostos de anéis de lactona que se ligam aos ribossomos 50S e parecem prejudicar uma das reações de peptidiltransferase ou translocação, ou ambos (NEU; GOOTZ, 1996).

A DNA girase e topoisomerase I agem em conjunto para manter um estado ótimo enovelamento de DNA na célula. Sendo assim, a DNA girase é essencial para aliviar a tensão de torção durante a replicação dos cromossomos circular em bactérias. Trata-se de uma proteína tetramérica composta por duas subunidades A e duas B. Ocorre uma ligação covalente entre a subunidade A e o DNA na finalização da dupla fita de DNA dupla catalisada pela girase, resultando na desestabilização do DNA e sua replicação. As Quinolonas, como o ácido nalidíxico, se ligam ao complexo de clivagem composto por DNA girase durante esta passagem para fita dupla, inibindo sua formação (BRYSKIER, 2005). As fluoroquinolonas mais novas como a ciprofloxacina, norfloxacina, ofloxacina possuem um amplo espectro

de atividade antimicrobiana e também podem interagir com DNA girase (NEU; GOOTZ, 1996).

Os aminoglicosídeos são açúcares complexos conectados em ligação glicosídica. São hidrossolúveis, alcalinos e seus componentes orgânicos tem um peso molecular entre 500 e 800 pb. A atividade antibacteriana ótima desse antimicrobiano ocorre ao pH de 7,5 a 8,5. São antibióticos considerados bactericidas e possuem amplo espectro de ação principalmente contra bactérias gram-negativas e staphylococccys sp. (VEYSSIER; BRYSKIER, 2005).

Essencial para a atividade destes agentes, grupos NH_4 e OH pelos quais os aminoglicosídeos se ligam a proteínas específicas ribossomal, são liberados. A estreptomicina, primeiro aminoglicosídeo estudado, se liga a uma proteína específica, S12, na subunidade ribossômica 30S e faz com que o ribossomo descaracterize o código genético. Outros aminoglicosídeos, como gentamicina por exemplo, se ligam não só à proteína S12 do ribossomo 30S, mas também, à proteína L6 da subunidade 50S do mesmo, matando as bactérias através da indução de formação de complexos não funcionais (NEU; GOOTZ, 1996).

Tiamulina é um antibiótico derivado semi-sintético da Pleuromutilina, lipofílico, com um peso molecular de 496,76 pb e ponto de fusão que varia de 147 a 148 °C. É o único membro da classe dos antibióticos pleuromutilinaditerpeno que é aprovado para uso neste momento. O composto é normalmente disponível para uso oral como base tiamulina ou sal de fumarato de hidrogênio. Em algumas referências a tiamulina é considerada como sendo do grupo de antibióticos macrolídeos. A atividade efetiva tiamulina contra mollicutes é uma de suas propriedades mais interessantes e sua atividade é geralmente considerada superior à tilosina, espiramicina e tetraciclina. A tiamulina foi introduzida na medicina veterinária para o tratamento de infecções suínas por *Brachyspira hyodysenteriae* (diarreia) e *Mycoplasma hyopneumoniae* (pneumonia) (BRYSKIER, 2005).

A Tiamulina inibe a síntese de proteína. Ela se liga ao domínio V da porção 23S do rRNA da subunidade ribossomal 50S. Tiamulina inibe ainda a peptidiltransferase, portanto inibe a formação de ligação peptídica. Seu efeito é primariamente bacteriostático mas pode ser letal em alta concentração para os organismos sensíveis (BRYSKIER, 2005).

1.2.1 Resistência dos Mollicutes aos antibióticos.

Para micoplasmas, dois tipos de resistência (inata ou intrínseca) têm sido consideradas; uma relacionada à classe mollicutes e outra relacionada a diferentes espécies. A resistência a penicilina e outros antibióticos beta-lactâmicos é natural devido à ausência de parede celular. Os micoplasmas são também naturalmente resistentes a polimixinas, sulfonamidas, trimetopim, ácido nalidixico e rifampicina. Os mollicutes dividem a resistência à rifampicina com algumas bactérias como *Clostridium innocuum* e *C. ramosum*, as quais são anaeróbicas gram-positivas, também contendo baixa quantidade de C+G. A resistência inata é relacionada com espécies específicas, principalmente da classe de antibióticos Macrolideo-lincosamina-streptogramina (MLS) pela alteração de enzimas e modificações de efluxo das drogas (BÉBÉAR; BÉBÉAR, 2002).

A tetraciclina é o antibiótico clássico no controle de doenças por estes microrganismos, mas seu uso em maior escala inicialmente nos humanos, indicou a ocorrência de amostras resistentes com a presença do gene Tet. A transferência genética da resistência aos antibióticos pode ocorrer das bactérias convencionas porque os mollicutes não possuem parede celular facilitando os mecanismos de recombinação. Além da resistência conferida pelo gene *tetM* ser uns dos marcadores comumente usados em estudos genéticos de mollicutes, ele também pode ser transferido por conjugação ou transformação em várias espécies de mollicutes incluindo *Mycoplasma hominis*. Os mollicutes inerentemente possuem alta frequência de mutação principalmente por possuírem muitas sequências repetitivas e poucos genes de reparo de DNA (BÉBÉAR; BÉBÉAR, 2002).

A sensibilidade dos micoplasmas às tetraciclinas contribuiu para a descoberta de novas micoplasmoses devido ao uso empírico e eficaz destes antibióticos. O conhecimento da sensibilidade dos mollicutes a outros antibióticos mais usados como o grupo dos MLS, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e cloranfenicóis foram testados contra as espécies de importância humana. Para animais, os resultados desta avaliação e padronização são mais recentes mas ainda com abrangência menor se comparada aos mollicutes de origem humana. A metodologia mais utilizada está sendo também a determinação da CIM (BÉBÉAR; BÉBÉAR, 2002).

A sensibilidade aos antibióticos dos mollicutes de origem bovina é mais conhecida em *M. bovis* e muito pouco com *U. diversum*. Na resistência dos mollicutes aos antibióticos verificou-se a ocorrência dos mecanismos de efluxo, modificação enzimática ou mudança de localização do alvo. A resistência aos antibióticos estudados foram adquiridas de outras bactérias com parede celular por transposons conjugativos (BÉBÉAR; BÉBÉAR, 2002; BÉBÉAR; KEMPF, 2005).

1.2.2 Métodos de avaliação dos antibióticos contra Mollicutes

A metodologia do CIM com mollicutes diferencia-se da utilizada com bactérias convencionais porque os meios de cultura não podem ser padronizados, por exemplo, os meios de cultura para mollicutes de aves não é o mesmo para os de importância em suínos, ou mesmo bovinos (TULLY, 1983).

As inibições de crescimento pela ação de antibióticos são observadas pela alteração de pH e consequente cor do caldo de cultivo, decorrente do metabolismo de cada espécie. Grande parte dos mollicutes é dividida entre os que fermentam a glicose e os que hidrolisam a arginina. Assim os meios ou ficam amarelos pela acidez do metabolismo da glicose, ou roxo-avermelhado pela alcalinização decorrente da hidrólise da arginina. Algumas espécies tem as duas vias metabólicas e na presença dos dois componentes, sempre iniciam o metabolismo pela fermentação à glicose. Outras espécies, não possuem as referidas vias, dificultando a distinção pela cores dos caldos, resultando em cor ligeiramente amarela. A mudança de cor do caldo é o resultado do metabolismo de uma ou mais células bacterianas nos tubos ou poços de microplacas. Esta característica é frequentemente utilizada na quantificação destas bactérias, e é conhecida como unidade de alteração de cor, ou internacionalmente, C.C.U. (Color Changing Units). As unidades formadoras de colônias são aplicadas em outras metodologias de quantificação de mollicutes para as espécies que crescem com mais facilidade, e a metodologia pode ser aplicada para o MIC (RODWELL; WHITCOMB, 1983; SHEPARD, 1983; BÉBÉAR; BÉBÉAR, 2002).

Os ureaplasmas produzem colônias de cor marrom douradas em meio sólido por precipitarem cátions de manganês, componente incluído neste meio de cultura.

A distribuição das colônias é irregular no Ágar, dificultando a contagem das mesmas. A CCU é única forma utilizada para quantificar estes mollicutes, incluindo-se a determinação do MIC. O caldo para ureaplasmas é originalmente ácido, portanto de cor amarela. Quando há a hidrólise da uréia, produz-se amônia, alcalinizando o meio (RODWELL; WHITCOMB, 1983).

Apesar de existirem outras metodologias na obtenção do MIC com bactérias convencionais, a metodologia de citometria de fluxo pode ser aplicada inclusive aos mollicutes. Este recurso foi aplicado em alguns mollicutes mas ainda não se encontram registros na literatura científica nacional e internacional, sobre a sua aplicação em *Ureaplasma diversum*.

Citometria de fluxo é uma importante técnica que tem sido aplicada ao estudo da heterogeneidade das populações microbianas (DAVEY; KELL, 1996; ALVAREZ-BARRIENTOS et al., 2000; DAVEY; WINSON, 2003). A citometria de fluxo em conjunto com sondas fluorescentes (fluorocromos) pode ser usada para monitorar as lesões induzidas por antibióticos em bactérias, o que abre possibilidades interessantes para investigar as atividades de diferentes antibióticos (ASSUNÇÃO et al., 2007).

A utilização da citometria de fluxo para contagem de bactérias incluindo-se os mollicutes está baseada na avaliação de células bacterianas individuais que passam por uma zona de iluminação. Usualmente na frequência aproximada de 1.000 células por segundo. No entanto, números mais elevados de bactérias sejam possíveis de serem avaliados em instrumentos mais aprimorados medindo-se a magnitude de um pulso que representa a extensão da luz dispersa. As magnitudes desses pulsos são classificadas eletronicamente em "caixas" ou "canais", permitindo a exibição de histograma do número de células que possuem uma determinada propriedade quantitativa e o número de canais. Apesar da diversidade de células, é possível avaliar nestes aparelhos diferenças de estágios metabólicos ou estruturais de células (DAVEY; KELL, 1996).

A dependência angular da luz dispersa fornece informações sobre a natureza das partículas de dispersão. Para tanto fluorocromos (marcadores específicos) são adicionados à suspensão celular. Estes ligam-se à moléculas específicas, tais como DNA, RNA ou proteína; substratos fluorogênico que revelam distribuições em atividade enzimática; indicadores que mudam suas propriedades em função do pH etc. Duas ou três variáveis de histogramas ou gráficos também podem ser gerados,

por exemplo, dispersando a luz a partir de um DNA fluorescente com um tipo de fluorocromo contra a fluorescência de uma proteína marcada com outro fluorocromo. Desta maneira, é possível diferenciar num histograma populações ou estruturas diferentes das células analisadas.(DAVEY; KELL, 1996).

A citometria de fluxo faz com que seja possível estudar as alterações morfológicas e características fisiológicas de células individuais, bem como suas distribuições dentro das populações de células maiores em um curto período de tempo. Tem ampla aplicação clínica e experimental em relação a células eucarióticas e também parece muito promissora no caso de bactérias (ASSUNÇÃO et al., 2007).

Com base nestas considerações, é interessante tentar aplicar esta metodologia para o estudo de suscetibilidades aos antibióticos devido à sua importância na doença e devido à sua crescente resistência das bactérias aos antimicrobianos (ASSUNÇÃO et al., 2007).

2 OBJETIVOS

Nesta seção estão listados os objetivos do presente trabalho.

2.1 Objetivo geral

Determinar a suscetibilidade de *Ureaplasma diversum* isolados de bovinos com distúrbios reprodutivos contra 6 classes de antibióticos pela metodologia da Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e citometria de fluxo.

2.2 Objetivos específicos

1 – Realização da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) para confirmação dos isolados de *U. diversum*.

2 – Padronização do cultivo e inóculo de amostras clínicas de *U. diversum* para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

3 – Padronização da solubilização e obtenção de pH adequado de soluções de antibióticos não prejudiciais ao cultivo de *U. diversum*.

4 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima de 8 antibióticos contra amostras clínicas de *U. diversum*.

5 – Avaliação da atividade antimicrobiana de 8 antibióticos pela citometria de fluxo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção estão descritos os métodos utilizados e os materiais necessários para execução do presente trabalho.

3.1 Cepa de referência e isolados de *Ureaplasma diversum*

Utilizaram-se as cepas ATCC 49782 e ATCC 49783 e 24 isolados clínicos de *U. diversum* obtidos do muco vulvovaginal de vacas em idade reprodutiva. Os materiais clínicos foram obtidos entre maio de 2009 e abril de 2010 na região do sudoeste do Estado da Bahia. As coletas foram realizadas com auxílio de suabe vaginal, transportados e acondicionados em solução transporte específico para favorecer o desenvolvimento dos microrganismos no meio líquido, isolamento e caracterização em Ágar e identificação molecular pela PCR.

Os primo-cultivos que apresentavam alcalinização em caldo e comprovação de colônias típicas em Agar, eram estocados a -70°C. Posteriormente, destes estoques, foi realizada a PCR para a identificação dos microrganismos.

Foram coletadas 151 amostras de animais oriundos de cinco diferentes propriedades, dos quais pelo menos 19 apresentavam algum sinal clínico na região genital como eritema, petéquias, palidez ou muco. Deste total de animais, apenas em 24 amostras foi constatada a presença de *Ureaplasma diversum* tanto pelo cultivo em caldo quanto por reação de PCR.

3.2 Meios de Cultura

Os meios utilizados são específicos para o cultivo de Mollicutes.

3.2.1 Meio de transporte para isolamento de Micoplasmas e Ureaplasmas

Segundo Taylor-Robinson, Addey, Goodwin (1969), logo após a coleta, o “swab” deve ser colocado num meio de transporte a 4 °C, para então ser levado ao laboratório e cultivado em tempo hábil para seu crescimento (geralmente em meio que se quer isolar o mollicute), que varia de 1 a 14 dias, sendo após esse período, considerada negativas as amostras que não se desenvolvem. Este mesmo procedimento foi recomendado por Fallon (1969) a fim de preservar as bactérias da amostra para o sub cultivo. Sendo assim, preparou-se inicialmente uma solução de 200 mL de meio de transporte. Adicionou-se 8 g de sacarose, 0,2 g de fosfato de sódio monobásico, 0,4 g de fosfato de sódio dibásico e 189 mL de água deionizada. Em seguida a solução foi autoclavada a 121°C por 15 minutos e após o esfriamento, foi suplementada com 10 mL de soro equino, 0,1 mL de penicilina e 1 mL de acetato de tálio (TAYLOR-ROBINSON; ADDEY; GOODWIN,1969).

3.2.2 Meio líquido para Ureaplasma – UB (100mL)

Para o cultivo das cepas e isolados de *U. diversum* foi utilizado o meio líquido descrito por Ruhnke e Rosendal (1994), acrescido de Meio 199® (EARLE). Após o preparo do meio “base”, este foi suplementado. Para a “base” foram utilizados; 2,1 g de Caldo PPLO (Merck®), 63,0 mL de água ultrapura e pH 5,4. Após autoclavagem a 121 °C por 15 minutos, suplementou-se a solução com 20,0 mL de soro equino (Invitrogen®), 10,0 mL de extrato fresco de Levedura a 25%. 0,5 mL de penicilina 100.000 U/mL (Sigma®), 5,0 mL de meio 199 (EARLE®), 1,0 mL de ureia 10% (Sigma®), 0,1 mL de L-Cisteína 2% (Merck®), 0,4 mL de vermelho de fenol 0,5% (Merck®).

3.2.3 Meio sólido para cultivo de ureaplasma (Agar UB – 100 mL)

Para analisar as características morfológica típicas das colônias de ureaplasma foi usado o meio sólido acrescido de 1% Agar Noble (RUHNKE; ROSENDAL, 1994). Assim como no meio líquido, é necessário inicialmente um meio “base” para a solução. Este é composto por 2,1 g de TSB (Merck®), 60,0 mL de água ultrapura, 1,0 g de Ágar Noble (Invitrogen®) e pH em 5,0. Após a autoclavagem a 121 °C por 15 minutos, são adicionados 20,0 mL de soro equino (Invitrogen®), 10,0 mL de extrato fresco de levedura a 25%, 0,5 mL de penicilina 100 000 U/mL (Sigma®), 5,0 mL de meio 199 (EARLE®), 1,0 mL da solução de Ureia 10% (Sigma®), 0,5 mL da solução de sulfato de manganês 3% (Merck®) e 0,4 mL da solução de vermelho de fenol 0,5% (Merck®).

3.3 Subcultivo das cepas e isolados clínicos de *U. diversum*

As cepas e isolados previamente suspeitos de *U. diversum* e estocadas a -70°C, foram descongeladas e subcultivados em meio para ureaplasma inoculando-se 2 mL de cada estoque em 18mL de meio UB. Após alcalinização do caldo de cultivo devido à fermentação da ureia, foram preparadas alíquotas de 2mL de cada cultura para a extração do DNA, determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e estoque dos microrganismos. Também, de 50µL de cada subcultivo, verificou-se a formação de colônias típicas de ureaplasma em meio sólido comprovando-se a produção de pequenas colônias e granulosas de coloração marrom escura, devido à precipitação de cátions de manganês pela atividade da urease (RUHNKE; ROSENDAL, 1994).

3.4 Extração do DNA das amostras de ureaplasma

A extração de DNA dos isolados e das cepas de *U. diversum* foi realizada pelo método de extração descrito por Boom et al. (1990), com algumas modificações. Foi transferido a um microtubo, 700 µL de cada amostra (cultura dos isolado e cepas), 1,0 mL do tampão de lise e 40 µL de suspensão de sílica, homogeneizado em agitador (30 s) e mantido em repouso por 10 minutos (min). Em seguida, esta solução foi centrifugada a 14000 g por 3 min, removendo-se o sobrenadante. O sedimento foi homogeneizado com 0,5 mL de tampão de lavagem e centrifugado a 14000 g por 3 min, por duas vezes. Adicionou-se a este sedimento 500 µL etanol (70%), que foi homogeneizado e centrifugado, como anteriormente. Após o tratamento com etanol, o sedimento foi homogeneizado em 500 µL de acetona, centrifugado e lavado duas vezes como tampão de lavagem e mantido em estufa a 37 °C por 20 minutos até total desidratação. O sedimento foi homogeneizado com 150 µL de água ultrapura, por 60 segundos (s) e mantido a 56 °C por 10 min. Em seguida, a solução foi homogeneizada por 60 s e concentrada a 14000 g por 10 min. O sobrenadante final de 150 µL, contendo o DNA bacteriano, foi retirado e armazenado a -20 °C.

A extração do DNA pelo método de fervura descrito por Fan, Kleven e Jackwood (1995), foi realizada a partir de 1 mL das amostras. Foi realizada uma centrifugação a 13000 g, por 10 minutos, em centrífuga refrigerada e duas lavagens do sedimento com 100 µL de PBS (2,6 mM NaH₂PO₄, 7,4 mM NaHPO₄, 10 mM NaCl, pH 7,2) seguidas de centrifugação. O sedimento obtido foi ressuspensionado em 20 µL de tampão PBS, fervido em “banho Maria”, por 10 minutos, acondicionado imediatamente em gelo por 5 minutos e submetido a uma centrifugação a 13000 g, durante 5 minutos, onde o sobrenadante contendo o DNA foi recolhido e estocado a -20°C, até o momento do uso.

3.5 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Para confirmação das amostras de ureaplasma foi realizada a PCR. Foram sequenciados produtos amplificados da porção 16S rRNA, com “primers” específicos para identificação de *U. diversum*, de duas cepas de referência (ATCC 49782 e ATCC 49783) e 24 isolados clínicos obtidos de muco vulvovaginal bovino (Quadro 1).

Primers	Sequências	Produto esperado
UD3	5` - AAT GTC GGC TCG CTT ATG AG -3`	216pb
UD4	5` - CCT GTC ATA TTG TTA ACC TCC GC -3`	

Fonte: (CARDOSO et al., 2000)

Quadro 1 – Sequência de oligonucleotídios nos “primers” utilizados nas PCR para detecção de DNA de *Ureaplasma diversum*

3.6 Concentração dos reagentes na PCR (DNA, Mg Cl, “primers”, dNTPs e unidades de *Taq* DNA polimerase)

Os primers utilizados (Quadro 1) para a amplificação do DNA de *Ureaplasma diversum* são complementares a sequências conservadas do gene 16S do rRNA. Os primers UD3 e UD4 descritos por Cardoso et al. (2000) estão nas posições 834-3 e 1030-3, respectivamente. A reação foi preparada em volumes finais de 50µL contendo: 5µL de tampão para PCR (KCl 500mM, Tris 200mM em pH 8.4); 3µL de solução de deoxiribonucleotídeos contendo 50mM de cada base, ou seja, dATP, dCTP, dGTP e dTTP; 2,5µL de MgCl₂ (50mM); 1µL de cada “primer” (50pmol de concentração); 2µL de DNA cromossomal teste e 0,2µL (1 unidade) de AmpliTaq DNA Polimerase (Invitrogen Life Technologies do Brasil).

3.7 Temperaturas de hibridização

A amplificação dos primers foi estabelecida de acordo com Buzinhani (2001) em: 1 ciclo de 5 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 49°C e 30s a 72°C e logo após, 1 ciclo de 10 minutos a 72 °C. Após a amplificação, as amostras foram mantidas a 4 °C até o momento da eletroforese.

3.8 Eletroforese e análise do perfil de fragmentos

Os produtos da PCR e o marcador 100 pb DNA Ladder (Invitrogen®) foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,0%, contendo 1 µg/mL de brometo de etídeo em tampão TAE (40mM Trisacetato; 2 mM EDTA, pH 8,0). A visualização e fotodocumentação dos produtos foram realizadas sob luz ultravioleta, no aparelho VilberLourmat. Os fragmentos analisados tiveram que apresentar 216 pb para serem considerados positivos. Este procedimento foi empregado em todas as análises dos produtos da PCR.

3.9 Unidades de alteração de cor (Color Changing Units – C. C.U.)

Em certos casos, as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) não podem ser enumeradas porque o estudo de alguns organismos como ureaplasmas, por exemplo, não formam colônias isoladas para serem quantificadas visualmente corretamente e enumeradas para a determinação da UFC. Isto ocorre porque a eficiência do plaqueamento pode variar aos diferentes estágios do ciclo de crescimento desses agentes. Nesses casos, unidades singulares infectantes podem ainda assim se multiplicar em meio líquido e o CCU pode ser executado normalmente.

Para determinar a concentração em que cada cultura se encontrava foi utilizada a CCU. Cada experimento foi realizado em triplicata para a cepa ou

isolado, adicionando-se 180µL de meio UB em uma microplaca de 96 poços, homogeneizando em seguida com 20 µL do cultivo no primeiro poço, passando a mesma quantidade (20µL) aos demais poços da fileira, horizontalmente, consistindo em diluições seriadas decimais. A unidade de mudança de cor (CCU) foi determinada visualmente e subjetivamente pela alcalinização e alteração da cor original do caldo na microplaca, através da menor concentração de cada amostra de ureaplasma após 24h de incubação a 37 °C.

3.10 Antibióticos

Foram testados 8 antibióticos de 5 diferentes classes.

3.10.1 Classes

No presente estudo, foram utilizados antibióticos das classes Fluorquinolonas (Ciprofloxacina e Enrofloxacin), Tetraciclina (Oxitetraciclina), Cloranfenicol (Cloranfenicol), Macrolídeos (Claritromicina e Tilosina), Aminoglicosídeo (Gentamicina) e Diterpenos – este último, trata-se de um derivado da Pleuromutilina (Tiamulina Fumarato).

3.10.2 Obtenção das concentrações dos antibióticos em solução

A obtenção das concentrações iniciais dos antibióticos para o estudo basearam-se pelas concentrações inibitórias mínimas dos antibióticos mencionadas na literatura (BÉBÉAR; KEMPF, 2005). Segundo Bébéar e Kempf, as variações de concentração inibitória mínima para *Ureaplasma* spp. encontram-se entre 0,05 e 2 µg/mL para tetraciclina; ≤0,004 e 2 µg/mL para claritromicina; 0,1 e 4 µg/mL para ciprofloxacina; 0,4 e 8 µg/mL para cloranfenicol; e 0,1 e 13 µg/mL para gentamicina.

Para os antibióticos restantes não há registros, portanto foi aplicada a média com base experimental e assim, determinada a variação do CIM para esses antimicrobianos. As concentrações iniciais dos antibióticos utilizados no referido experimento se encontram no quadro 2.

ANTIBIÓTICO	[] _i (µg/mL)
CIPROFLOXACINA	400
ENROFLOXACINA	680
CLARITROMICINA	50
TILOSINA	410
CLORANFENICOL	600
GENTAMICINA	400
OXITETRACICLINA	110
TIAMULINA	360

Quadro 2 – Concentração inicial dos antibióticos testados pelo CIM contra *U. diversum*
 Legenda: []_i = concentração inicial.

3.10.3 Preparo das soluções dos antibióticos

Após pesagem, os antibióticos foram diluídos em 1mL de solução fisiológica estéril (exceto Cloranfenicol e Enrofloxacina – solúveis em álcool 92,8° INPM e portanto diluídos neste composto). Como cada antibiótico é solúvel a um determinado pH (seja alcalino ou ácido), o antimicrobiano foi diluído ao pH ótimo para sua completa solubilidade em solução fisiológica ou álcool. Por exemplo, a Ciprofloxacina, Enrofloxacina e Oxitetraciclina foram solúveis em pH alcalino e o restante dos antibióticos em pH neutro. Os antibióticos, depois de dissolvidos foram homogeneizados e filtrados em membrana de 0,22 µm, consistindo em “soluções

mãe”(HANNAN, 2000). Após esse procedimento, adicionou-se 150 µL de cada “solução mãe” em 14,850 mL de solução fisiológica estéril, completando um volume final de 15 mL de solução de antibiótico para ser utilizada no CIM. Todos os antibióticos foram dissolvidos, filtrados e diluídos minutos antes de serem utilizados no experimento.

3.10.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM é a maior diluição de um agente antimicrobiano que inibe o crescimento de um microrganismo específico no período do teste (BEBEAR e ROBERTSON, 1996).

O método utilizado no presente estudo foi baseado na descrição mencionada no “Guidelines and recommendations for Antimicrobial Minimum Inhibitory Concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species”, em “International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology”, de Peter Hannan, 2000.

Visto que a Enrofloxacin e o Cloranfenicol são solúveis apenas em álcool etílico, foi realizado um teste para analisar a interferência do álcool no crescimento da bactéria. Este teste consistiu em diluir 150 µL de álcool etílico hidratado industrial (92,8º INMP) em 14,850 mL de solução fisiológica estéril, homogeneizar e filtrar a composição. Em seguida foi realizado um teste de CIM com a cepa ATCC 49782, a fim de avaliar a interferência do álcool no experimento.

Para a determinação da CIM foram adicionados inicialmente 180 µL de meio UB, específico para Ureaplasmas em cada poço de uma microplaca contendo 96 poços, utilizando-se micropipeta multicanal. A microplaca teve sua tampa marcada ao meio (entre as colunas seis e sete) através de um desenho de uma linha contínua, delimitando assim, a separação das cepas e amostras de ureaplasma a serem avaliadas. A tampa da microplaca foi subdividida com o desenho de mais duas linhas segmentadas (entre as colunas três e quatro e, nove e dez), dividindo a placa em quatro partes iguais, para o uso das diferentes concentrações de antibiótico.

Em seguida adicionou-se, com pipeta multicanal, 180 μ L de concentração final do antibiótico diluído. No caso do teste com álcool, adicionou-se este com a solução fisiológica estéril em triplicata nos poços de coordenadas A1, A2 e A3, homogeneizado duas vezes e transferindo o mesmo volume e procedimento para os poços seguintes B1, B2 e B3. Em seguida, C1, C2 e C3, e assim sucessivamente, voltando para a fileira A, nas coordenadas A4, A5 e A6, depois B4, B5 e B6 até as coordenadas H4, H5 e H6, onde se encontrou por fim, a menor concentração do antibiótico testado, num total de 16 concentrações diferentes do mesmo antibiótico.

Ainda na mesma placa, adicionou-se com pipeta multicanal, 180 μ L da concentração final do mesmo antibiótico diluído previamente, em triplicata nos poços de coordenadas A7, A8 e A9, homogeneizado duas vezes e transferindo o mesmo volume e procedimento para os poços seguintes B7, B8 e B9, depois C7, C8 e C9, e assim sucessivamente, voltando para a fileira A, nas coordenadas A10, A11 e A12. Em seguida B10, B11 e B12 até as coordenadas H10, H11 e H12, apresentando assim, de forma equiparada nas colunas de número sete a doze, as mesmas concentrações de antibiótico das colunas de número um a seis.

Para cada antibiótico, foram utilizadas 12 microplacas, sendo que cada microplaca foi acrescida de 20 μ L de isolado em cada poço, e ainda, para cada microplaca foram utilizados isolados de duas diferentes cepas. Uma cepa foi acrescentada às concentrações de antibiótico das colunas de um a seis e outra cepa foi acrescentada às concentrações das colunas de sete a doze. Em seguida, cada microplaca foi vedada com uma lâmina de silicone adequada para PCR Real Time, a fim de minimizar a evaporação dos poços e posteriormente sobreposta com a tampa. As microplacas foram mantidas em câmara úmida e incubadas a 37°C por 24 horas.

As concentrações dos antibióticos utilizados estão relacionadas nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Concentrações dos antibióticos (ciprofloxacina, enrofloxacina, claritromicina e tilosina) utilizados para a determinação do CIM (em µg/mL) contra amostras de ureaplasma

ANTIBIÓTICO	CIPROFLOXACINA	ENROFLOXACINA	CLARITROMICINA	TILOSINA
A1,2,3/A7,8,9	200	340	25	205
B1,2,3/B7,8,9	100	170	12,5	102,5
C1,2,3/C7,8,9	50	85	6,25	51,25
D1,2,3/D7,8,9	25	42,5	3,125	25,625
E1,2,3/E7,8,9	12,5	21,25	1,5625	12,8125
F1,2,3/F7,8,9	6,25	10,625	0,78125	6,40625
G1,2,3/G7,8,9	3,125	5,3125	0,390625	3,203125
H1,2,3/H7,8,9	1,5625	2,65625	0,1953125	1,6015625
A4,5,6/10,11,12	0,78125	1,328125	0,09765625	0,80078125
B4,5,6/10,11,12	0,390625	0,6640625	0,048828125	0,400390625
C4,5,6/10,11,12	0,1953125	0,33203125	0,024414063	0,200195313
D4,5,6/10,11,12	0,09765625	0,166015625	0,012207031	0,100097656
E4,5,6/10,11,12	0,048828125	0,083007813	0,006103516	0,050048828
F4,5,6/10,11,12	0,024414063	0,041503906	0,003051758	0,025024414
G4,5,6/10,11,12	0,012207031	0,020751953	0,001525879	0,012512207
H4,5,6/10,11,12	0,006103516	0,010375977	0,000762939	0,006256104

Legenda: A primeira coluna da esquerda indica os poços com as concentrações obtidas diluindo-se a primeira solução na razão 1:2. As letras indicam as fileiras e os números, as colunas da microplaca.

Tabela 2 – Concentração dos antibióticos (cloranfenicol, gentamicina, oxitetraciclina e tiamulina) utilizados na determinação do CIM ($\mu\text{g/mL}$) contra amostras de ureaplasma

ANTIBIÓTICO	CLORANFENICOL	GENTAMICINA	OXITETRACICLINA	TIAMULINA
A1,2,3/A7,8,9	600	400	110	360
B1,2,3/B7,8,9	300	200	55	180
C1,2,3/C7,8,9	150	100	27,5	90
D1,2,3/D7,8,9	75	50	13,75	45
E1,2,3/E7,8,9	37,5	25	6,875	22,5
F1,2,3/F7,8,9	18,75	12,5	3,4375	11,25
G1,2,3/G7,8,9	9,375	6,25	1,71875	5,625
H1,2,3/H7,8,9	4,6875	3,125	0,859375	2,8125
A4,5,6/10,11,12	2,34375	1,5625	0,4296875	1,40625
B4,5,6/10,11,12	1,171875	0,78125	0,21484375	0,703125
C4,5,6/10,11,12	0,5859375	0,390625	0,107421875	0,3515625
D4,5,6/10,11,12	0,29296875	0,1953125	0,053710938	0,17578125
E4,5,6/10,11,12	0,146484375	0,09765625	0,026855469	0,087890625
F4,5,6/10,11,12	0,073242188	0,048828125	0,013427734	0,043945313
G4,5,6/10,11,12	0,036621094	0,024414063	0,006713867	0,021972656
H4,5,6/10,11,12	0,018310547	0,012207031	0,003356934	0,010986328

Legenda: A primeira coluna da esquerda indica os poços com as concentrações obtidas diluindo-se a primeira solução na razão 1:2. As letras indicam as fileiras e os números, as colunas da microplaca.

3.11 Determinação da CIM (ponto de corte)

Segundo Bébéar e Kempf (2005), não há pontos de cortes específicos disponíveis para mollicutes atualmente, então é preferível apenas reportar as CIMs, conforme alguns autores o fizeram, apontado na tabela 3.

Tabela 3 – Variação da concentração inibitória mínima ($\mu\text{g} / \text{mL}$) para vários agentes antimicrobianos contra ureaplasmas segundo autores e no presente experimento

Autores	TRUSCOTT e RUHNKE (1984)	TER LAAK e VERSCHURE (1993)	BÉBÉAR e KEMPF (2005)	2012
Antibióticos	<i>Ureaplasma diversum</i>	<i>Ureaplasma diversum</i>	<i>Ureaplasma spp.</i>	<i>Ureaplasma diversum</i>
Ciprofloxacina	N/D	N/D	0,1 - 4	$\leq 0,048$ - 50
Enrofloxacin	N/D	2 - 8	N/D	0,033 - $\geq 2,6$
Claritromicina	N/D	N/D	$\leq 0,004$ - 2	$\leq 0,09$ - 50
Tilosina	0,024 - 0,078	0,03 - 2	N/D	$\leq 0,01$ - 51,25
Cloranfenicol	N/D	2 - 16	0,4 - 8	$\leq 0,03$ - $\geq 2,34$
Gentamicina	6,25 - $\geq 12,5$	N/D	0,1 - 13	1,56- ≥ 50
Oxitetraciclina	N/D	1 - 32	N/D	$\leq 0,1$ - $\geq 27,5$
Tiamulina	0,0024 - 0,078	$\leq 0,015$ - 0,5	N/D	$\leq 0,7$ - 45

Legenda: N/D – Não há dados. $\geq$ - Maior ou igual. $\leq$ - Menor ou igual.

A avaliação do ponto de corte (ou concentração inibitória mínima propriamente dita) foi realizada fenotipicamente depois de 24 horas de incubação a 37°C, sendo que a CIM de cada antibiótico foi designada pela alteração de coloração de amarelo para vermelho, indicando a alteração de pH de ácido para o alcalino, confirmando-se a presença do inóculo e a não inibição do crescimento ou mesmo morte da bactéria pela atividade do antibiótico. Todos os resultados foram registrados e documentados por meio de imagem fotográfica.

3.12 Centrifugação e preparo das amostras de Ureaplasmas para uso no Citômetro de Fluxo

As amostras passaram por um preparo prévio para serem analisadas pelo citômetro. O preparo consistiu em centrifugar as microplacas com o teste da CIM por 10 minutos a 4000 rpm, remover o sobrenadante e ressuspender os sedimentos de cada poço em 50 μ L de PBS 1X, centrifugar por mais 10 minutos a 4000 rpm, removendo-se o sobrenadante. Em seguida, as amostras foram expostas aos fluocromos individualmente, com micropipeta multicanal, com 7 μ L de corante (SYTO9 + iodeto de propídeo) e em seguida mantidas por 1 hora a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) protegidas da luz.

Após a marcação com os fluocromos, as amostras foram centrifugadas novamente por 10 minutos a 4000 rpm, removeu-se o sobrenadante e foram acrescidas de 50 μ L de PBS 1X em cada poço. O mesmo procedimento foi repetido por mais uma vez, mas ao invés de 50 μ L, foram adicionados 100 μ L em cada poço.

Posteriormente, cada concentração de antibiótico (em triplicata) com cepas diferentes foi distribuída em tubos para análise no citômetro de fluxo, tendo o volume final de 300 μ L por tubo. Os tubos foram protegidos da luz envolvendo-os com folha de alumínio e avaliados no citômetro de fluxo.

3.13 Citômetro de Fluxo

Foi utilizado o citômetro de fluxo “FACSCalibur®”, produzido pela Becton Dickinson – EUA. Trata-se de um aparelho de citometria que analisa 4 diferentes frequências de ondas, além de ser equipado com ar refrigerado de 15mW e um Laser de Diodo de 635 nm e 9mW.

O computador de aquisição de dados é conectado a um sistema de computador Macintosh e os dados são armazenados em um servidor de rede ou removível para discos magnéticos ópticos SCSI de 640 Mb. A análise de dados foi armazenada em um sistema de análise de dados da Macintosh denominado CellQuest.

Ainda para o uso do citômetro, foi necessário um tampão (FAC) para preenchimento do recipiente de pressão, contendo: 81,2 g de NaCl; 2,8 g de KCl; 2,6 g de KH_2PO_4 ; 23,5 g de Na_2HPO_4 ; 4,3 g de LiCl; 3,6 g de EDTA; 4 g de azida sódica e H_2O destilada para completar 1L de solução. O FAC é concentrado em 10X e para usá-lo no citômetro foi necessário diluí-lo para 1X.

Todas as suspensões na determinação do CIM foram submetidas à análise pelo citômetro de fluxo e posteriormente descartadas em solução de hipoclorito a 2%.

O preparo das amostras de ureaplasma para avaliação em citômetro de fluxo é diferenciado e portanto houve adaptação. Primeiramente o procedimento foi realizado centrifugando-se culturas em tubos tipo “eppendorf” e posteriormente centrifugando-se a microplaca. Geralmente o citômetro de fluxo é mais utilizado para análise de células de resposta imune do organismo e portanto, para analisar ureaplasmas, houve adaptação da metodologia para a obtenção de melhores resultados. Menores que as bactérias convencionais, os ureaplasmas exigem parâmetros mais sensíveis quando analisados pelo citômetro, deixando a cultura mais suscetível a interferências externas e artefato. Por exemplo, a escala utilizada para detecção de células tem que ser alterada para a análise desses microrganismos devido às diferenças de tamanho entre esta bactéria e as células do sistema imune, assim sendo, qualquer outra molécula que eventualmente tenha sido corada pelo fluorocromo e que esteja presente no meio de cultura, pode interferir no resultado final da análise.

Para determinação da viabilidade bacteriana foi usado um kit (“LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability and Counting Kit”) dispondo de dois marcadores de ácidos nucleicos: SYTO9 e iodeto de propídeo, que diferem em suas habilidades de penetrar em células bacterianas saudáveis. Este Kit permite distinção e quantificação de as bactérias vivas e mortas com a ajuda de um citômetro de fluxo, mesmo em uma população mista contendo diferentes tipos de bactérias. Quando usado isoladamente, o SYTO9 penetra em bactérias consideradas tanto vivas quanto mortas, corando-as com a cor verde. Em contraste, o Iodeto de Propídeo penetra somente em bactérias com membranas danificadas (corando-as em vermelho), reduzindo a fluorescência do SYTO9 quando ambos os corantes estão presentes. Desta forma, a bactéria é analisada na presença dos dois marcadores, simultaneamente, apresentando fluorescência na cor verde, se viável, e na

vermelha, se inviável (VITKOV et al., 2005). A solução final de corante foi diluída na proporção de 1:3:3, sendo utilizados água Milli-Q, SYTO9 e Iodeto de Propídeo.

Os fluorocromos (SYTO9 e Iodeto de propídeo) utilizados para o preparo de amostras são fotossensíveis e sensíveis também ao calor, portanto, durante todo o processo de coloração, centrifugação e armazenamento das amostras em tubos de ensaio, a presença da luz e do calor foi evitada ao máximo, sendo feito o procedimento sob a penumbra e ar condicionado a aproximadamente 20 °C.

Para análise das amostras usadas no citômetro, foi utilizado o programa FlowJo (Tree StarTM, Inc., Ashland, OR), versão 7.6. Esse programa pode analisar os dados gerados por qualquer citômetro de fluxo a partir de qualquer fabricante. Além disso, possui um número de plataformas diferentes de análise que permitem não só realizar análises padrão, tais como propagação e estatísticas, mas também análises especializadas, tais como DNA, Ciclo Celular, Cinética (fluxo de cálcio), Proliferação, Calibração e comparação estatística.

Foram analisadas no citômetro de fluxo e no programa FlowJo® um total de 3.072 amostras, devido às diferentes concentrações de antibióticos a que as cepas foram submetidas, sendo que apenas as bactérias marcadas pelo fluorocromo “SYTO9” foram consideradas na análise, uma vez que a finalidade deste estudo é examinar as células viáveis em relação à concentração inibitória mínima. Sendo assim, o que está sendo avaliado nesse experimento é a viabilidade do inóculo após o uso de antibióticos.

Para a análise estatística dos dados coletados, foi utilizado o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), pelo qual as amostras foram analisadas através de medidas da média aritmética e do desvio-padrão. Para a comparação dos valores obtidos segundo as equações utilizadas, utilizou-se o teste de análise de variância (Two-way ANOVA). Os resultados foram considerados significativos quando a significância foi inferior a 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

Nesta seção estão descritos os resultados obtidos em todas as etapas do trabalho.

4.1 Tempo de crescimento do inóculo das amostras de *U. diversum*

O tempo de crescimento de cada amostra de ureaplasma para a obtenção do inóculo microbiano para a determinação da CIM foi associado ao tempo de alcalinização do caldo UB. Neste contexto houve variação de acordo com a tabela 4.

Tabela 4 – Tempo de crescimento de amostras de *U. diversum* em 900 µL de meio UB a 37°C em microaerofilia (ureaplasmas previamente estocados a -70°C em caldo UB)

AMOSTRAS	TEMPO DE CRESCIMENTO (horas)
BA34	21
BA35	21
BA37	15
BA47	14
BA52	24
BA54	20
BA55	24
BA56	24
BA57	10,5
BA74	10
BA78	24
BA81	20
Ud82	18
Ud83	18
BA84	24
BA89	24
BA94	24
BA111	25
BA133	28
BA148	8
AB174	10,5
BA198	6
BA234	14
BA239	21
MÉDIA DE CRESCIMENTO	18,66666667

4.2 Confirmação do crescimento de *Ureaplasma diversum* em meio sólido

As amostras clínicas de *Ureaplasma* spp foram previamente identificadas pela PCR e mantidas em caldo a -70°C . As amostras microbianas estudadas evidenciaram crescimento típico de uresplasmas em meio UB sólido a 37°C em microareofilia. O crescimento foi evidenciado pelo microscópio estereoscópico após 24h a 72h de incubação, como indicam as setas nas figuras mais significativas (Figuras de 1 a 7):

Fonte: (PINHEIRO, 2012)

Figura 1 – Amostra de *Ureaplasma diversum* (BA34) obtida de material genital de fêmeas bovinas. As setas indicam a produção de conjuntos de pequenas colônias de cor marrom escura ou dourado devido a precipitação de cátions de manganês presentes no meio de cultura

Fonte: (PINHEIRO, 2012)
Figura 2 – Amostra BA84

Fonte: (PINHEIRO, 2012)
Figura 3 – Amostra BA111

Fonte: (PINHEIRO, 2012)
Figura 4 – Amostra BA133

Fonte: (PINHEIRO, 2012)
Figura 5 – Amostra BA174

Fonte: (PINHEIRO, 2012)
Figura 6 – “Cordão” característico formado por colônias de ureaplasmas

Fonte: (PINHEIRO, 2012)

Figura 7 – Alcalinização do meio UB sólido devido ao crescimento de ureaplasma.

Legenda: As placas de cor alaranjada a rosa indicam crescimento de ureaplasma devido a alcalinização do meio, indicado pelo vermelho de fenol, usado na elaboração do meio de cultura. O meio de cor amarela indica ausência de crescimento dessa bactéria na placa.

4.3 Confirmação das amostras de *U. diversum* pela PCR

Após confirmação de crescimento em meio sólido, as 24 amostras de ureaplasma foram submetidas a análise por PCR (Figura 8):

Fonte: (PINHEIRO, 2012)

Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR do DNA alvo das 24 amostras de *U. diversum*

Todas as amostras produziram fragmentos de DNA (apesar de algumas serem fracas) de 216 pares de base, com exceção das amostras Ud83, BA37, BA52 e BA198. Estas amostras foram testadas novamente, porém, através da técnica de extração de DNA por fervura, representadas na figura 9.

Fonte: (PINHEIRO, 2012)

Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR do DNA alvo das 4 amostras de *U. diversum* que não apresentaram bandas no método de extração por sílica

4.4 Determinação das Unidades de Alteração de Cor (C.C.U. – Color Change Units)

Através desta metodologia foram estabelecidas as C.C.U. / mL (Tabela 5). A utilização do espectrofotômetro para análise da concentração desses microrganismos não se mostra eficiente, uma vez que para identificar o número de UFC / mL nesse aparelho, se faz necessário o uso da turbidez do meio em análise, fato que não ocorre com o meio utilizado para crescimento dos Mollicutes.

Nas figuras 10 e 11, o sinal de “+” indica os controles positivos e “-”, os controles negativos nas C.C.U.s realizadas em microplaca.

Para as C.C.U.s inferiores a 10^{-2} , foi feita uma centrifugação de 2mL de inóculo, descartado o sobrenadante e ressuspendido em 1mL de meio UB. Em seguida foi feita uma nova C.C.U. e as amostras tiveram o log aumentado em pelo menos 2X. No caso das amostras com concentração maior ou igual a 10^{-10} , foi feita uma diluição seriada decimal até a concentração de 10^{-4} .

Tabela 5 – Unidades de alteração de cor (C.C.U.) obtidas do inóculo de cada amostra de *U. diversum*

AMOSTRAS de <i>U. diversum</i>	C.C.U.
BA34	-1
BA35	-3
BA37	-1
BA47	-2
BA52	-2
BA54	-2
BA55	-2
BA56	-2
BA57	-1
BA74	-4
BA78	-3
BA81	-2
Ud82	-2
Ud83	-2
BA84	-2
BA89	-2
BA94	-1
BA111	-3
BA133	-1
BA148	-10
AB174	-2
BA198	-10
BA234	-2
BA239	-1
MÉDIA Log	-2,625

Legenda: Os números indicam, em escala logarítmica, a concentração de bactérias por mL (antes de padronizar a C.C.U. para 10^{-4}).

Fonte: (PINHEIRO, 2012)

Figura 10 – Microplaca de 96 poços representando a determinação da C.C.U. com amostras BA74 (10^4 UFC/mL) e BA78 (10^3 UFC/mL)

Legenda: Os poços em vermelho indicam que houve crescimento de ureaplasma e os poços em amarelos indicam ausência de crescimento do inóculo. Os sinais "+" indicam controles positivos e os sinais "-" indicam controles negativos.

Fonte: (PINHEIRO, 2012)

Figura 11 – Determinação de C.C.U. com amostras BA81, Ud82, BA84 e Ud83 (todas com 10^2 UFC/mL)

Legenda: Os poços em vermelho indicam que houve crescimento de ureaplasma e os poços em amarelos indicam ausência de crescimento do inóculo. Os sinais "+" indicam controles positivos e os sinais "-" indicam controles negativos.

4.5 Interferência do álcool na determinação do CIM para a solubilização da Enrofloxacin e Cloranfenicol

A Enrofloxacin e Cloranfenicol foram solubilizados inicialmente com álcool 92,8° INPM. Verificou-se que este solvente não interferiu no crescimento das amostras de ureaplasma pelo crescimento destas bactérias quando diluído em solução fisiológica nas mesmas proporções com os antibióticos na determinação da CIM.

4.6 Determinação das CIMs

Avaliou-se a atividade inibitória de diferentes concentrações dos antibióticos a amostras clínicas de *U. diversum* (Tabelas 6 e 7). Os resultados estão apresentados nas tabelas 6 e 7. Em relação aos padrões já conhecidos detectou-se amostras sensíveis-S ou resistentes-R às drogas testadas. A determinação da CIM foi a maior concentração ($\mu\text{g/mL}$) que inibiu o crescimento de ureaplasmas observando a alteração de pH do caldo com o antibiótico. A determinação da CIM correspondeu ao tempo de alteração de cor do caldo dos respectivos controles, ou seja o crescimento do mesmo inóculo de ureaplasmas em meio livre de antibióticos substituindo-os pelos mesmos volumes com solução fisiológica.

Nas tabelas a seguir, “R” indica que todas as concentrações das amostras foram resistentes ao antibiótico testado e “S” indica que todas as concentrações das amostras foram sensíveis ao antibiótico testado.

Tabela 6 – CIM em µg/mL dos antibióticos contra 24 amostras de *U. diversum* (U.d.) isoladas do aparelho genital de fêmeas bovinas

ISOLADOS de U.d.	CIPROFLOXACINA	ENROFLOXACINA	CLARITROMICINA	TILOSINA
BA34	S	0,6640625	S	0,025024414
BA35	S	3,125	25	S
BA37	S	1,5625	0,012207031	0,012512207
BA47	1,5625	0,6640625	0,024414063	0,100097656
BA52	0,048828125	0,33203125	0,012207031	0,012512207
BA54	6,25	0,6640625	0,024414063	S
BA55	25	R	12,5	S
BA56	1,5625	0,6640625	12,5	12,8125
BA57	S	0,33203125	S	0,200195313
BA74	12,5	1,328125	0,1953125	0,400390625
BA78	1,5625	1,328125	1,5625	0,200195313
BA81	12,5	2,65625	1,5625	0,100097656
Ud82	25	R	3,125	12,8125
Ud83	50	R	6,25	51,25
BA84	6,25	0,6640625	0,012207031	0,025024414
BA89	12,5	R	0,024414063	0,200195313
BA94	1,5625	0,6640625	0,048828125	0,200195313
BA111	0,78125	R	0,1953125	0,025024414
BA133	0,78125	0,33203125	0,012207031	S
BA148	25	R	6,25	25,625
AB174	1,5625	3,125	25	25,625
BA198	50	R	6,25	51,25
BA234	1,5625	1,328125	0,048828125	0,200195313
BA239	S	0,6640625	0,003051758	S

Legenda: A letra “R” indica resistência e a letra “S” indica sensibilidade ao antibiótico testado.

Tabela 7 – CIM em µg/mL dos antibióticos contra 24 amostras de *U. diversum* (U.d.) isoladas do aparelho genital de fêmeas bovinas

ISOLADOS de U.d.	CLORANFENICOL	GENTAMICINA	OXITETRACICLINA	TIAMULINA
BA34	S	R	0,107421875	S
BA35	R	50	R	22,5
BA37	0,5859375	25	13,75	2,8125
BA47	0,5859375	50	27,5	0,703125
BA52	S	1,5625	13,75	2,8125
BA54	S	R	27,5	11,25
BA55	S	R	R	22,5
BA56	R	R	R	11,25
BA57	S	6,25	S	11,25
BA74	0,29296875	R	R	11,25
BA78	2,34375	50	27,5	11,25
BA81	0,5859375	R	6,875	5,625
Ud82	R	R	R	11,25
Ud83	R	R	R	45
BA84	0,5859375	R	13,75	11,25
BA89	R	R	R	11,25
BA94	0,5859375	50	13,75	11,25
BA111	0,5859375	R	R	22,5
BA133	0,29296875	25	13,75	0,703125
BA148	R	R	R	11,25
AB174	1,171875	R	R	11,25
BA198	R	R	R	45
BA234	0,5859375	R	R	11,25
BA239	0,036621094	12,5	1,71875	S

Legenda: A letra “R” indica resistência e a letra “S” indica sensibilidade ao antibiótico testado.

As figuras de 12 a 19 se referem às microplacas de 96 poços representando as variações na alteração de cor (pH) pelo crescimento ou não dos ureaplasmas na determinação da CIM. Cada avaliação foi realizada em triplicata. As setas indicam a CIM das amostras analisadas. As amostras que não contém indicação por setas apresentaram total resistência (poços vermelhos) ou sensibilidade (poços amarelos) aos antibióticos testados.

Fonte: (PINHEIRO, 2012)

Figura 12 – CIM nos poços da fileira D (amostra BA133) indicada pela seta, correspondendo a concentração de 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ do antibiótico testado. A amostra BA148 apresentou resistência à gentamicina

Fonte: (PINHEIRO, 2012)

Figura 13 – CIM nos poços da fileira B (amostra BA55 e BA56) indicada pela seta, correspondendo a concentração de 12,5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ do antibiótico (claritromicina) testado para diferentes amostras

Fonte: (PINHEIRO, 2012)

Figura 14 – CIM nos poços da fileira H (amostra BA47) indicada pela seta, correspondendo a concentração de 1,56 $\mu\text{g} / \text{mL}$ do antibiótico testado. A amostra BA37 apresentou sensibilidade a ciprofloxacin

Fonte: (PINHEIRO, 2012)

Figura 15 – CIM nos poços da fileira C (amostra BA133) indicada pela seta, correspondendo a concentração de 0,29 $\mu\text{g} / \text{mL}$ do antibiótico testado. A amostra BA148 apresentou resistência ao cloranfenicol

Fonte: (PINHEIRO, 2012)

Figura 16 – Tanto a amostra BA148 quanto a BA174 apresentaram resistência à enrofloxacina, indicada pela alcalinização (poços em vermelho) do meio em todo conteúdo da placa, apontando crescimento

Fonte: (PINHEIRO, 2012)

Figura 17 – CIM nos poços das fileiras E (amostra BA174) e C (BA198) indicadas pelas setas, correspondendo a concentrações de 11,25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ e 45 $\mu\text{g} / \text{mL}$ do antibiótico (tiamulina) testado, respectivamente

Fonte: (PINHEIRO, 2012)

Figura 18 – Tanto a amostra Ud82 quanto a Ud83 (amostras de referência) apresentaram resistência à oxitetraciclina, indicada pela alcalinização (poços em vermelho) do meio em todo conteúdo da placa, indicando crescimento

Fonte: (PINHEIRO, 2012)

Figura 19 – CIM nos poços da fileira E (amostra BA56) indicada pela seta, correspondendo a concentração de 12,81 $\mu\text{g} / \text{mL}$ do antibiótico testado. A amostra BA55 apresentou sensibilidade a ciprofloxacina, uma vez que houve inibição do crescimento do inóculo, representado pela coloração amarela nos poços

De acordo com Bébéar e Kempf (2005), antibióticos do grupo da tetraciclina apresentaram uma variação de CIM de 0,02 a 16 µg/mL contra a espécie de *Ureaplasma* spp. Esta variação também ocorreu neste estudo sendo a CIM para oxitetraciclina variando entre 0,1 e 13,75 µg/mL. Para a claritromicina (variação $\leq$ 0,004 a 2 µg/mL) e ciprofloxacina (variação de 0,1 a 4 µg/mL), apenas 50% das amostras desses antimicrobianos mantiveram-se dentro desse padrão. Para cloranfenicol (variação de 0,4 a 8 µg/mL) a maioria das amostras de ureaplasma testadas neste experimento (cerca de 70%) se encontraram entre esses limites. A tabela proposta por Bébéar e Kempf (2005) indica que a variação da sensibilidade microbiana a gentamicina se mantém entre 0,1 a 13 µg/mL. Foi observado neste trabalho em apenas três das 24 amostras testadas contra esse antimicrobiano.

Ainda conforme Bébéar e Kempf (2005); para enrofloxacin (Fluorquinolonas) e tilosina (grupo MLSK) não encontramos dados na tabela proposta por esses autores na literatura, portanto se baseando pelas CIM do grupo a que pertencem os referidos antibióticos, a variação do primeiro antibiótico em relação a *Ureaplasma* spp. se encontra entre $\leq$ 0,008 e 16 µg/mL, fato observado em 71% das amostras testadas. Já para o grupo da tilosina encontramos variação mais abrangente que se encontra entre $\leq$ 0,004 e 256 µg/mL. Sendo assim, todas as amostras isoladas e de referencia testadas nesse experimento se enquadram nesse padrão, exceto aquelas que encontraram resistência.

De acordo com Truscott e Ruhnke (1984), a variação da CIM para a espécie *U. diversum* contra o antibiótico tiamulina, esteve entre 0,0024 e 0,078 µg/mL. Segundo Ter Laak, Noordergraaf e Verschure (1993), a variação ocorre entre $\leq$ 0,015 e 0,5 µg/mL. Neste estudo encontrou-se a variação esteve entre $\leq$ 0,7 e 45 µg/mL e não houve resistência contra este antibiótico. Neste presente trabalho, foram encontradas amostras resistentes aos antimicrobianos enrofloxacin, cloranfenicol, oxitetraciclina e principalmente gentamicina.

4.7 Resistência

Algumas amostras se apresentaram resistentes aos antibióticos. Assim verificou-se a presença de bactérias viáveis nos poços com alteração de pH para comprovar resistência comparando-se (quantitativamente) o inóculo inicial com o “ponto de corte”. Este se for menor (BLANCHARD, 2005) que a CIM encontrada na avaliação, indica a resistência da amostra de ureaplasma analisada.

Neste estudo, consideramos resistentes as amostras que apresentaram crescimento em todos os poços contendo as diferentes concentrações de antibióticos e sensíveis as amostras que tiveram total inibição de crescimento. Desta forma, encontraram-se nas propriedades rurais (loais de realização da coleta – nº de 1 a 5) da região sudoeste do Estado da Bahia, amostras resistentes aos seguintes antibióticos (Tabelas 8 a 11):

Tabela 8 – Amostras de ureaplasma resistentes, por propriedade rural, ao antibiótico Enrofloxacin

Propriedades Rurais	Nº TOTAL DE ISOLADOS	ENROFLOXACINA	
		resistente	%do total da propriedade
1	0	0	0
2	8	1	3,333333333
3	5	1	3,333333333
4	3	1	3,225806452
5	6	2	6,666666667
TOTAL GERAL	22	5	3,311258278

Tabela 9 – Amostras de ureaplasma resistentes, por propriedade rural, ao antibiótico Cloranfenicol

Propriedades Rurais	Nº TOTAL DE ISOLADOS	CLORANFENICOL	
		resistente	%do total da propriedade
1	0	0	0
2	8	2	6,666666667
3	5	0	0
4	3	1	3,225806452
5	6	2	6,666666667
TOTAL GERAL	22	5	3,311258278

Tabela 10 – Amostras de ureaplasma resistentes, por propriedade rural, ao antibiótico Gentamicina

Propriedades Rurais	Nº TOTAL DE ISOLADOS	OXITETRACICLINA	
		resistente	%do total da propriedade
1	0	0	0
2	8	3	10
3	5	2	6,666666667
4	3	1	3,225806452
5	6	4	13,33333333
TOTAL GERAL	22	10	6,622516556

Tabela 11 – Amostras de ureaplasma resistentes, por propriedade rural, ao antibiótico Oxitetraciclina

Propriedades Rurais	Nº TOTAL DE ISOLADOS	GENTAMICINA	
		resistente	%do total da propriedade
1	0	0	0
2	8	4	13,33333333
3	5	4	13,33333333
4	3	1	3,225806452
5	6	4	13,33333333
TOTAL GERAL	22	13	8,609271523

De acordo com as propriedades rurais analisadas, a propriedade que apresentou os maiores índices de ureaplasma resistentes a antibióticos foi a propriedade nº 5, seguida pela propriedade nº 2. A propriedade nº 1 apresentou as melhores médias de suscetibilidade aos antibióticos.

4.8 Citometria de Fluxo

Após a determinação das CIMs, todas as concentrações de todos os antibióticos utilizados para as 24 amostras foram analisadas pelo citômetro de fluxo, totalizando 3.072 análises. Nesse procedimento foi levado em consideração o número de células viáveis, a fim de comparar a atividade antimicrobiana dos antibióticos em relação às concentrações utilizadas no experimento. A partir desses dados, obtiveram-se gráficos que apresentam a média das células viáveis de todas as amostras em relação às concentrações de antibióticos analisadas (Figuras 20 e 21).

Figura 20 – Média de células viáveis (com desvio padrão) das 24 amostras em relação a concentração dos antibióticos (em µg / mL) ciprofloxacina, claritromicina, cloranfenicol e tiamulina

Figura 21 – Média de células viáveis (com desvio padrão) das 24 amostras em relação a concentração dos antibióticos (em µg / mL) enrofloxacina, oxitetraciclina, gentamicina e tilosina

De acordo com os gráficos nas figuras 20 e 21, observamos que há grande variação nas médias de células viáveis para todos os antibióticos testados, com exceção da claritromicina, cujas médias são próximas. Apesar de a tiamulina apresentar os maiores índices de células viáveis, as amostras testadas não apresentaram resistência a este antimicrobiano. Para as menores concentrações dos antibióticos utilizadas no presente experimento, observamos que a gentamicina, tilosina e cloranfenicol apresentam os menores indicadores de células viáveis, embora o resultado da CIM para gentamicina tenha implicado em altas concentrações do antibiótico, além de ter apresentado resistência em mais da metade das amostras analisadas. Esta situação pode ser demonstrada pelas análises do citômetro de fluxo através do programa FlowJo que apontam o número de células viáveis de uma amostra resistente pelo método de CIM como sendo o mesmo que uma amostra que tenha sido inibida ou não pela ação do antibiótico no mesmo método inibitório (Fig. 22 a 25).

Figura 22 – Análise de citometria de fluxo para a amostra BA133 exposta à gentamicina nas concentrações de 100, 50 e 25 µg / mL (esquerda pra direita, respectivamente)
 Legenda: A CIM desta amostra foi de 25 µg / mL. Observamos pelos primeiros quadrantes (Q1) que o número de células viáveis não aumentou conforme a diminuição da concentração do antimicrobiano.

Figura 23 – Análise de citometria de fluxo para a amostra BA148 exposta à gentamicina nas concentrações de 6,25; 0,024 e 0,012 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (esquerda pra direita, respectivamente)
 Legenda: Esta amostra apresentou total resistência ao antimicrobiano. Observamos pelos primeiros quadrantes (Q1) que o número de células viáveis não aumentou conforme a diminuição da concentração do antimicrobiano, além de ser equivalente quantitativamente à amostra BA133 (Figura 22), que apresentou alguma inibição no crescimento.

Figura 24 – Análise de citometria de fluxo para a amostra BA55 exposta à claritromicina nas concentrações de 25; 12,5 e 6,5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (esquerda pra direita, respectivamente)
 Legenda: A CIM desta amostra foi de 12,5 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Observamos pelos primeiros quadrantes (Q1) que o número de células viáveis não aumentou conforme a diminuição da concentração do antimicrobiano.

Figura 25 – Análise de citometria de fluxo para a amostra BA37 exposta à ciprofloxacina nas concentrações de 200; 1,56 e 0,19 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (esquerda pra direita, respectivamente)
 Legenda: Essa amostra apresentou total sensibilidade ao antibiótico testado, ou seja, houve inibição do crescimento e consequentemente não houve alteração do pH no caldo. Observamos pelos primeiros quadrantes (Q1) que o número de células viáveis não aumentou conforme a diminuição da concentração do antimicrobiano.

As diferenças entre concentrações de antibióticos e número de células viáveis foram significativas pela análise de variância com 95% de intervalo de confiança ($p < 0,0001$), provavelmente devido ao grande número de amostras analisadas (total de 384 amostras testadas para cada um dos oito antibióticos testados).

De acordo com a CIM, as amostras apresentaram uma maior resistência a gentamicina, oxitetraciclina e tiamulina e pela análise do citômetro, o maior número de células viáveis foi relativa aos antibióticos tiamulina, ciprofloxacina e claritromicina, respectivamente. Os antibióticos que apresentaram menor CIM foram a claritromicina, tilosina e cloranfenicol e pela análise do citômetro de fluxo, a gentamicina, tilosina e cloranfenicol apresentaram os menores índices de células viáveis em comparação com os outros antimicrobianos.

5 DISCUSSÃO

O isolamento de mollicutes é dificultado principalmente por serem bactérias fastidiosas e sensíveis quando mantidos fora de seu ambiente ideal. O sucesso no primo-isolamento depende da coleta, tipo e transporte do material clínico e a escolha do meio de cultura ideal. Na medicina veterinária, por exemplo, temos o leite de mastite bovina subclínica em que o isolamento destas bactérias é difícil. Apesar da cultura ser ainda considerada “padrão ouro” para o diagnóstico microbiológico de agentes infecciosos, as metodologias de diagnóstico molecular, sobretudo a PCR, tem contribuído na demanda da detecção de microrganismos ainda não cultiváveis ou fastidiosos em materiais clínicos. Neste contexto encontram-se os mollicutes (MARQUES, 2005).

A Reação em Cadeia da Polimerase é qualificada como um dos métodos mais eficazes para a detecção de mollicutes (DAXBOECK; KRAUSE; WENISCH, 2003). De acordo com Mettifogo (2003), as contaminações por bactérias de crescimento rápido nos meios de cultura para Mollicutes, apesar destes possuírem impedimentos, ainda é o maior obstáculo na obtenção de amostras destas bactérias para o seu estudo. A detecção de pequenas quantidades do DNA destas bactérias por PCR apresenta grande vantagem sobre o cultivo.

A coleta de material clínico com suabe de mucosa genital neste estudo, além de não ser invasiva, estressante ao animal e de fácil manejo, permitiu obtenção segura da maioria do material clínico estudado. Mesmo assim houve dificuldade na coleta de material de alguns animais obtendo-se material da superfície da mucosa.

Apesar da confirmação da presença de ureaplasma nos cultivos, estes mollicutes foram confirmados e identificados por PCR utilizando-se da fervura para a extração do DNA. A extração pela sílica, neste caso, não foi satisfatória por não revelar o DNA das amostras Ud83, BA37, BA52 e BA198.

A metodologia pela fervura descrita por Fan, Kleven e Jackwood (1995) é simples, facilita a extração do DNA por serem bactérias sem parede celular, possui baixo custo e dispensa o uso de substâncias tóxicas como o fenol. Buzinhani (2001) testou três diferentes procedimentos de extração de DNA para a detecção de mollicutes em mucosa vulvovaginal de fêmeas bovinas: fervura, extração fenólica e

por sílica, sendo que a fervura apresentou uma maior sensibilidade para identificação das bandas de DNA.

O método da extração de DNA por fervura não foi utilizado inicialmente devido ao volume final de solução ser maior na extração por sílica. Os resultados obtidos neste trabalho concordam com Thomas et al. (2002), onde *U. diversum* foi detectado em animais sadios e também em animais que apresentavam algum sinal clínico.

Os inóculos de *U. diversum* presentes nas amostras foram estocados e concentrados após cultivo para a avaliação dos antibióticos. Esta etapa é laboriosa pela inerência do crescimento destas bactérias nos meios utilizados. A concentração obtida no cultivo e avaliada pela C.C.U. era inferior a 10^{-3} microrganismos, embora todas as amostras de ureaplasma tenham apresentado crescimento em meio sólido. Para tanto foi feita uma centrifugação de 2mL de inóculo, descartado o sobrenadante e homogeneizado em 1mL de meio UB. Em seguida foi feita uma C.C.U. e as amostras tiveram o log aumentado em pelo menos 2X.

Apesar do descongelamento de culturas bacterianas sem crioprotetores diminuírem o número de bactérias viáveis, um achado na literatura associa este efeito em ureaplasma de maneira contrária. Uma das hipóteses pode estar relacionada com o tempo de descongelamento (RACCACH; ROTTEM; RAZIN, 1975). Biddle et al. (2004) mencionam a diminuição do número de células viáveis de micoplasmas em amostras congeladas de leite bovino, quando o descongelamento é feito mais rapidamente (a 37 °C ao invés de temperatura ambiente).

As amostras BA148 e BA198 apresentaram células bacterianas em Log superior a 10^{-4} , e logo foram diluídas dez vezes em caldo UB antes do experimento para alcançarem um Log de 10^{-4} , ideal para o teste de CIM, segundo Hannan (2000).

De acordo com Furr e Taylor-Robinson (1990), a viabilidade das amostras pode ser influenciada também pelo volume de cultura armazenada e pelo fato de que pequenas quantidades (em volume) podem congelar mais rapidamente do que as grandes, sofrendo menos danos causados pelo congelamento lento. No entanto, independente desses fatores, a literatura refere que as culturas de alguns micoplasmas, mantém a viabilidade por períodos mais longos do que outros. Acerca disso, nos resultados apresentados nesse trabalho, a diferença de crescimento de

uma cultura, partindo-se da mesma amostra inicial, variou de 3h a 48h. Estes dados confirmam com os achados de Furr e Taylor-Robinson (1990). No presente estudo concluímos que para cada 1 mL de amostra de *U. diversum* congelada de uma mesma cepa (armazenadas em diferentes recipientes) encontramos uma concentração diferente de ufc/mL, interferindo no resultado final da C.C.U.

A metodologia do CIM foi aceita e mantida, apesar da especificidade dos nutrientes e pH do caldo para ureaplasmas. A metodologia aplicada tem o princípio de verificar a resultante da inibição dos antibióticos sobre a atividade metabólica dos mollicutes independente do mecanismo de ação do antimicrobiano. Para ureaplasmas a resultante é a inibição da hidrólise da uréia. A metodologia da difusão em Agar Bauer-Kirby não é adequada para Mollicutes por causa do longo tempo de incubação para o crescimento dos microrganismos e do tamanho muito pequeno das colônias. (BÉBÉAR; KEMPF, 2005).

A hidrólise da uréia é a principal atividade de obtenção de energia nos ureaplasmas. Assim o meio líquido sem o desenvolvimento dos ureaplasmas inicialmente é de cor amarela e conforme o seu crescimento, há produção de amônia e consequente alcalinização ocorrendo a mudança de cor para roxo avermelhado. Desta maneira a cor do caldo na CIM é associada a maior diluição do antibiótico que foi capaz de inibir a hidrólise da uréia (BÉBÉAR; KEMPF, 2005). Os ureaplasmas, no entanto, são bastante sensíveis à alcalinização que provocam no meio de cultura. Esta característica não somente dificulta os estudos destes mollicutes como prejudica o estabelecimento de inóculo para a determinação do CIM.

Para o presente estudo, foi necessária a padronização da CIM para ureaplasmas. Usamos como base o experimento utilizado por Hannan (2000) que testou (através da microdiluição em placa) 4 tipos de antibióticos contra 8 cepas de referencia de espécies de mollicutes. Optou-se neste estudo pelo método da microdiluição em microplaca, utilizando concentração empregada para ativação de Micoplasmas de cultura em caldo (ou seja, 1:9, sendo 1 parte de inóculo para 9 de antibiótico diluído em meio UB, lembrando que utilizamos diluição seriada dupla para diluir o antibiótico no meio UB). Este método foi escolhido pela sua eficiência na análise da suscetibilidade dos inóculos aos antimicrobianos, além de ser um método relativamente econômico devido a pequenos volumes de caldo utilizado para a análise de grandes quantidades de amostras.

A avaliação da sensibilidade de microrganismos frente a antimicrobianos realizada *in vitro* não corresponde às possíveis variáveis encontradas no hospedeiro enfermo, uma vez que o pH em locais de infecção diferentes e dentro das células varia consideravelmente. Desta maneira o procedimento laboratorial deve estar padronizado ou adaptado a cada situação (AMATO et al.; HANNAN, 2000).

A determinação da CIM apresenta resultados quantitativos e desta maneira, foi possível classificar as amostras de ureaplasma como sensíveis ou resistentes.

Os antibióticos selecionados neste estudo estão embasados pelo trabalho de Peter Hannan (2000) que utilizou 8 tipos de antimicrobianos, sendo que 5 deles (Oxitetraciclina, Tilosina, Gentamicina, Tiamulina e Enrofloxacina) foram aplicados neste presente experimento. Estudamos outros 3 antibióticos (Cloranfenicol, Ciprofloxacina e Claritromicina) devido à ação comprovada desses antimicrobianos contra mollicutes em geral (BÉBÉAR; KEMPF, 2005). Na escolha também considerou-se as características do animal e material clínico do qual houve o isolamento do microrganismo.

AMATO et al. (2000), menciona que alguns antibióticos são agrupados em classes, com base em seus espectros de ação, incluindo-se apenas um representante de cada classe que necessita ser testada, exceto quando não há equivalência entre os antibióticos de uma mesma classe, ou seja, quando dois antimicrobianos não possuem os mesmos elementos químicos e mecanismo de ação. Embora a enrofloxacina e ciprofloxacina apresentem basicamente os mesmos parâmetros estruturais e funcionais, optamos por testá-las a fim de obter resultados passíveis de comparação quanto a atividade desses antibióticos, principalmente na membrana das células bacterianas.

De acordo com Hannan (2000), existem antibióticos solúveis em água (solução fisiológica). Os antibióticos Cloranfenicol e Enrofloxacina, são solúveis em álcool. Uma vez que não encontrou-se dados suficientes na literatura sobre a solubilidade dos antibióticos, e quando encontrados, os dados não necessariamente condiziam com a realidade (por exemplo o trabalho do próprio HANNAN em 2000), foi necessário ajustar o pH final das soluções baseado no empirismo, através do uso do vórtex para homogeneizar as misturas. Colocamos pequenas amostras de antibiótico em pó em recipientes e testamos a solubilidade dos mesmos adicionando separadamente álcool, solução fisiológica e H₂O Milli-Q, colocando aos poucos gotas de HCl e NaOH (10M) e homogeneizando no vórtex. Constatou-se que o pH

alcalino não interferiu na alteração de cor do caldo pela existência do vermelho de fenol presente na solução e desta maneira foi possível avaliar o crescimento dos ureaplasma.

Baseou-se o estudo das concentrações nos resultados Bébéar e Kempf (2005), bem como o método utilizado para diluição. A porcentagem de pureza não foi calculada devido aos antibióticos (em pó) já serem considerados puros de acordo com suas concentrações iniciais de fábrica. A interpretação dos resultados é relativamente subjetiva, pela dificuldade de avaliar fenotipicamente o crescimento dos ureaplasmas devido ao grau de alteração de cor, que pode ter várias tonalidades variando do amarelo ao roxo.

As amostras resistentes que mantiveram a cor amarela do pH inicial indicavam ausência de crescimento microbiano. Sempre que possível, os antimicrobianos devem ser testados no pH correto para ótima atividade in vitro. Para testar os antibióticos bacteriostáticos, nos baseamos no tempo de crescimento dos inóculos, sendo que o maior tempo de crescimento levou em torno de 24 horas para a amostra poder ser congelada a uma concentração adequada para armazenamento. Sendo assim, todas as amostras durante o teste de CIM foram acondicionadas em estufa a 37°C por 24h, dentro das condições já relatadas nesse mesmo trabalho.

Existem pequenas variações na suplementação de componentes nos meios para ureaplasmas. No meio UB utilizado no presente estudo, os isolados estudados apresentaram variações de 1h a 12 horas para o início da alteração de pH e consequente obtenção do inóculo inicial na determinação do CIM. O tempo de variação da atividade metabólica principal é conhecida entre os mollicutes mais estudados. Esta característica, por outro lado, não está relacionada com a patogenicidade destes organismos.

As amostras de *U. diversum* do presente estudo, estão em análise quanto a presença de genes de resistência a antibióticos.

Foram encontrados ureaplasmas tanto em animais sadios quanto em animais que apresentavam algum sinal clínico. Independente disso, a capacidade de expressar a alteração de cor em caldo UB foi variada. Desta maneira as amostras utilizadas neste estudo possuem boa representatividade quanto as variações genotípicas e a diversidade de resultados obtidos.

Existem três mecanismos de resistência bacteriana adquirida (mecanismos ativos de efluxo, modificação enzimática da droga e alteração do alvo da droga), além de mutações no microrganismo. A resistência a antimicrobianos relatada para alguns mollicutes, foi justificada pelas altas taxas de mutação e carência de sistemas de reparo de DNA (BÉBÉAR; BÉBÉAR, 2002). Considerando a variabilidade de cepas neste estudo, bem como a realização de vários subcultivos, é possível sugerir a ocorrência de mutações justificando em parte a variação dos valores da CIM não obtendo-se o padrão de sensibilidade esperado de acordo com os achados de Blanchard (2005).

Ambos os métodos resultaram em diferentes valores, uma vez que a CIM nos fornece a concentração de antibiótico necessária para inibição do crescimento da bactéria e o citômetro de fluxo, neste estudo, demonstra o número de células viáveis, que podem não ter sido suficientemente coradas pelo iodeto de propídeo devido à integridade ou não da membrana da bactéria.

As altas concentrações de células viáveis através da análise do citômetro pode ser indicativo de que a ação bacteriostática dos antibióticos testados já estava se revertendo, e portanto, a célula bacteriana já estava se replicando novamente.

Embora a gentamicina seja considerada antibiótico de amplo espectro de ação, e largamente utilizada no combate a inúmeros microrganismos, apresentou no presente estudo, ação inexpressiva, pois houve aumento das concentrações deste agente no teste de CIM e mesmo assim apresentou-se um grande número de inóculos resistentes e inibidos somente em altas concentrações desse antimicrobiano. Curiosamente, em relação a análise resultante do uso do citômetro de fluxo a atividade da gentamicina apresentou o menor número de células de ureaplasma viáveis. Isto se explica através do mecanismo de ação deste antibiótico, uma vez que embora sua atividade bactericida seja dependente de sua concentração, age inibindo a síntese protéica (VEYSSIER; BRYSKIER, 2005).

Existe um grande número de corantes utilizados para o citômetro de fluxo, que são marcadores de ácidos nucleicos. O iodeto de propídeo, por exemplo, se liga tanto a DNA quanto a RNA, através da intercalação do corante dentro da fita dupla da estrutura helicoidal, um processo que resulta em considerável aumento de potencia sobre a fluorescência do corante que se mantém livre desta ligação ao DNA. Entretanto, para experimentos em que as células são coradas com um derivado da fluoresceína (por exemplo o SYTO9 usado para corar proteínas totais),

o iodeto de propídeo será então distinguido do SYTO9. Quando usado sozinho, SYTO9 é impregnado em todas as bactérias com membranas íntegras e danificadas. Em contraste, iodeto de propídeo penetra somente nas bactérias com membranas danificadas, desalojando o SYTO9. Assim, com uma mistura apropriada do SYTO9 e iodeto de propídeo, as bactérias com as membranas celulares intactas produzem ondas verde fluorescente enquanto as com membranas danificadas apresentam fluorescência vermelha.

O teor de proteína total de células fixadas pelo corante é comumente estimada por coloração com SYTO9, porque é convenientemente excitado pela linha 488 nm do laser de argônio (DAVE; KELL, 1996) Desta forma, podemos inferir que o uso da gentamicina no teste de CIM para avaliar a viabilidade de células através do citômetro não se mostrou eficiente quando utilizado com o corante SYTO9.

O fato dos inóculos com gentamicina sofrerem alterações de membrana, devido à presença de proteínas de membranas e consequentemente ação do antibiótico neste alvo na célula procarionte, não significa necessariamente que elas deixarão de se replicarem. Isto explica a resistência a este antimicrobiano pelo teste de CIM.

Bem como corantes que se ligam a (ou reagem com) moléculas específicas, tais como DNA, RNA ou proteínas; os substratos fluorogênicos que revelam distribuições em atividade enzimática, os indicadores que mudam suas propriedades em função do pH ou que são tomadas em resposta a energização da membrana, e os anticorpos (ou oligonucleotídeos) marcados com uma sonda fluorescente deveriam também ser explorados para a detecção da viabilidade das células ou CIM através do uso do citômetro de fluxo.

De acordo com Bryskier (2005), microrganismos para os quais as CIM de tiamulina são $\leq 4,0 \mu\text{g} / \text{mL}$ são considerados suscetíveis e para os quais as CIM são $\geq 32 \mu\text{g} / \text{mL}$ são consideradas resistentes. Não encontramos dados na literatura especificamente para *Ureaplasma diversum*, mas ainda assim, os valores da CIM de tiamulina para esta espécie se mostram em sua maioria dentro desta variação proposta por Bryskier (2005). Embora inibidora da síntese protéica, contrariamente à gentamicina, a tiamulina apresentou altas concentrações de células viáveis através da análise pelo citômetro de fluxo. Neste caso podemos conjecturar que a análise do citômetro de fluxo e o teste de CIM, para este antibiótico, estão em consonância.

No geral, os inóculos apresentaram maior suscetibilidade à claritromicina

(teste de CIM), porém, na análise pelo citômetro de fluxo, a concentração de células viáveis para este antibiótico foi relativamente alta, mesmo a claritromicina sendo inibidora da síntese protéica. Desta forma é possível que as células bacterianas não tenham incorporado o iodeto de propídeo, devido à integridade da membrana dessas bactérias (alterada por resistência ao antibacteriano) ou seu crescimento no teste de CIM pode ter sido apenas reversivelmente inibido, caracterizando uma ação bacteriostática deste antimicrobiano.

Assim como a tiamulina, a tilosina possui boa representatividade quando comparamos as duas técnicas, pois no teste de CIM este antibiótico apresentou uma vasta gama de inibição das amostras testadas e quando analisada no citômetro de fluxo, a tilosina apresentou um pequeno número de células viáveis em comparação com os outros antibióticos testados, fazendo jus ao esperado nesse experimento. Da mesma forma que a tilosina e tiamulina, o cloranfenicol também corresponde aos níveis de inibição e número células encontradas na CIM e citômetro de fluxo, respectivamente, além de seu mecanismo de ação se basear na inibição da síntese protéica.

Embora a ciprofloxacina e enrofloxacin pertencam à mesma classe de antibióticos e possuam basicamente o mesmo mecanismo de ação, os resultados encontrados nesse trabalho apresentaram algumas disparidades em relação a esses dois antimicrobianos. Apesar de a CIM de ambos os antibióticos serem próximas em comparação à média dos outros agentes antimicrobianos testados, na avaliação pelo citômetro de fluxo o número de células viáveis variaram de modo um tanto expressivo, sendo a concentração de células viáveis da ciprofloxacina praticamente 50X maior que a concentração de células viáveis da enrofloxacin. Algumas considerações tem sido expressadas em relação ao uso de novas quinolonas no campo da veterinária por causa da possibilidade de aquisição de resistência (SARKOSY, 2001). Isso pode ter ocorrido no presente estudo, justificando esta desigualdade entre essas quinolonas.

Depois da gentamicina, a oxitetraciclina foi o antibiótico que apresentou maiores resistências das amostras no teste de CIM. Quando analisado pelo citômetro, esse antimicrobiano evidenciou um bom número de células viáveis, quando relacionado aos outros agentes. Embora nenhuma amostra tenha apresentado sensibilidade total a oxitetraciclina, o número de células viáveis na concentração mínima do referido antibiótico foi praticamente equivalente à média

das demais concentrações. Talvez aqui a concentração deste antibiótico poderia ser aumentada a fim de detectar um ponto de corte para a espécie *Ureaplasma diversum*. Fica claro que este último re

sultado se relaciona com a resistência da bactéria ao antibiótico.

De acordo com os resultados demonstrados pelos gráficos gerados através do uso do citômetro de fluxo, observamos que independente de algumas amostras terem sido resistentes ou não aos antibióticos testados, elas apresentam variações no número de células viáveis. Isso pode ser explicado pela ausência de impregnação do iodeto de propídeo nas membranas celulares destes microrganismos, apresentando fluorescência apenas nas células coradas com SYTO9 e portanto, dando a falsa impressão de que essas células ainda possam ser viáveis. Este fato não deve ser generalizado pois a ação de antibióticos pode alterar a membrana bacteriana mantendo célula viável, porém não cultivável.

A principal vantagem do método baseado em citometria de fluxo é a possibilidade de conhecer como as células respondem a cada tratamento, embora a confirmação de inibição de crescimento dependa das taxas de crescimento das diferentes espécies de mollicutes e do agente antibacteriano testado. Além disso, este método pode ser útil para a identificação de populações que são resistentes ao agente antibacteriano, permitindo que o seu isolamento e estudo de mecanismos de resistência informe a escolha da droga (ASSUNÇÃO et al., 2006).

6 CONCLUSÃO

A padronização do teste de suscetibilidade a antibióticos para mollicutes deve ser recomendada e continuada.

A extração de DNA pela fervura demonstrou ser uma técnica de rápida execução, baixo custo e sem utilização de reagentes tóxicos quando comparada com extração de DNA por sílica, para análise da PCR.

A técnica do uso do citômetro de fluxo para análise de CIM deve ser otimizada para ureaplasmas.

A citometria de fluxo pode ser utilizada como ferramenta auxiliar na determinação da CIM para *U. diversum* se houver controle na aplicação de marcadores celulares destas bactérias.

São necessários mais estudos para determinação de pontos de corte de CIM principalmente para a espécie *Ureaplasma diversum*.

A citometria de fluxo pode apontar CIMs mais específicas se comparada com a metodologia de tubos ou poços.

A determinação de inibição de crescimento do *Ureaplasma diversum* pela citometria de fluxo não depende da mudança de cor pelo método da CIM, porém depende da impregnação do corante das estruturas celulares. Sendo assim, ambas as técnicas devem ser complementares.

A claritromicina apresentou melhor atividade contra amostras de *U. diversum*.

REFERÊNCIAS

AHMED, A.; SABRY, M.; ZAKI, K. M. Possible role of Mycoplasmas in some reproductive disorders of cattle and buffaloes. **Egyptian Journal of Veterinary Science**, v. 32, p. 115-122, 1998.

ALVAREZ-BARRIENTOS, A., ARROYO, J., CANTON, R., NOMBELA, C. AND SANCHEZ-PEREZ, M. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 167-195, 2000.

AMATO, V. et al. Mecanismos de ação. Testes de sensibilidade. **Antibióticos na prática médica**. 5 ed. São Paulo: Roca, 2000.

ASSUNÇÃO, P. et al. Application of flow cytometry for the determination of minimal inhibitory concentration of several antibacterial agents on *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 4, p. 1132-1137, 2007.

ASSUNÇÃO, P. et al. Flow Cytometric Determination of the Effects of Antibacterial Agents on *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma putrefaciens*, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Large Colony Type. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2845-2849, 2006.

ASKA, G.; ERNO, H. Evaluation of *Mycoplasma agalactiae* subs. *bovis* to species rank *Mycoplasma bovis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 26, p. 323-325, 1976.

BÉBÉAR, C. M.; BÉBÉAR C. Antimycoplasmal Agents. In: RAZIN S.; HERRMANN, R. (Ed.). **Molecular biology and pathogenesis of mycoplasmas**, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. p. 545-566.

BÉBÉAR, C.; KEMPF, I. Antimicrobial therapy and antimicrobial resistance. In: BLANCHARD, A.; BROWNING, G. (Ed.). **Mycoplasmas molecular biology, pathogenicity and strategies for control**, United Kingdom: Horizon Bioscience, 2005. p. 535-568.

BERGEY'S Manual of determinative bacteriology. Michigan: Michigan State University [2010]. Disponível em: <<http://www.cme.msU.edu/bergeys>>. Acesso em: 29 dez. 2010.

BIDDLE, M. K. et al. Effects of Storage Time and Thawing Methods on the Recovery of *Mycoplasma* Species in Milk Samples from Cows with Intramammary Infections. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 4, p. 933-936, 2004.

BLANCHARD, A.; BÉBÉAR, C. M. Mycoplasmas of Humans. In: BLANCHARD, A.; BROWNING, G. (Ed.). **Molecular biology and pathogenesis of mycoplasmas**, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. p. 45-72.

BOOM, R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BRITTON, A. P. et al. The recovery of Ureaplasmas from bovine embryos following *In vitro* exposure and ten washes. **Theriogenology**, v.30, p.997-1003, 1988.

BRYSKIER, A. (Ed). Fluorquinolones. In: BRYSKIER, A. (Ed.). **Antimicrobial Agents: Antibacterials and Antifungals**, Washington, DC: American Society for Microbiology, 2005. p. 668-788.

BUZINHANI, M ; METIFFOGO, E.;TIMENETSKY, J .Detecção de *Mycoplasma spp* e *Ureaplasma diversum* em vacas com distúrbios reprodutivos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n.6, p. 1368-1375, 2007.

BUZINHANI, M. **Detecção de micoplasma em fêmeas bovinas apresentando distúrbios reprodutivos por meio de cultura e reação em cadeia da polimerase**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). 2001. 88p – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

CARDOSO, M. V. et al. Isolamento de *Ureaplasma diversum* e *Mycoplasma spp.* em casos de Vulvite Granular Bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n. 2, p. 172-173, 1997.

CARDOSO, M. V. et al. *Ureaplasma diversum* and reproductive disorder in Brazilian cows and heifers; first report. **Animal Reproduction Science**, v. 63, n. 3-4, p.137-43, 2000.

CARDOSO, M. V.; VASCONCELLOS, S. A. Importância das Micoplasmoses na Fertilidade de Touros. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 2, p. 257-265, 2004.

CLYDE, W. A.; McCORMACK, W. M. Collection and Transport of Specimens. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. (Ed.). **Methods in Mycoplasma**, New York: Academic Press, 1983. v. 1, p. 103-108.

DAVEY, H.M.; KELL, D.B. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. **Microbiological Reviews**, v. 60, p. 641-696, 1996.

DAVEY, H.M.; WINSON, M.K. Using flow cytometry to quantify microbial heterogeneity. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 5, p. 9-15, 2003.

DAXBOECK, F.; KRAUSE, R.; WENISCH, C. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 9, n. 4, p. 263 -273, 2003.

EMBRAPA. Publicações. **Antibióticos**, [2001]. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/doc106/05antibioticos.html>> Acesso em: 24 nov. 2011.

FALLON, R. J. Isolation methods for mycoplasma from man and rodents. In: SHAPTON, D. A.; GOULD, G. W. (Ed.). **Isolation Methods for Microbiologists**, London and New York : Academic Press, 1969. p. 41-50.

FAN, H. H.; KLEVEN, S. H.; JACKWOOD, M. W. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**, v. 39, p. 729-735, 1995.

FREY, J. Mycoplasmas of animals. In: BLANCHARD, A.; BROWNING, G. (Ed.). **Molecular Biology and Pathogenesis of Mycoplasmas**, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. P. 73-90.

FURR, P. M.; TAYLOR-ROBINSON, D. Long-term viability of stored mycoplasmas and ureaplasmas. **Journal of Medical Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 203-206, 1990.

GOURLAY, R. .; MACKENZIE, A.; COOPER, J. E. Studies of the microbiology and pathology of pneumonic lungs of calves. **Journal of Comparative Pathology**, v. 80, p. 575-584, 1970

GRZESKO, J. et al. Genital mycoplasmas morbidity and a potential influence on human fertility. **Medycyna Wieku Rozwojowego**, v. 10, n. 3, p. 985-992, 2006.

HALE, H. H. et al. Bovine mastitis caused by a mycoplasma species. **Cornell Veterinary Medicine**, v. 52, p. 582-591, 1962.

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

HOWARD, C. J. et al. Induction of pneumonia in gnotobiotic calves following inoculation of *Mycoplasma dispar* and ureaplasmas (T-*Mycoplasmas*). **Research in Veterinary Science**, v. 21, n. 2, p. 227-31, 1976.

INSTITUTO BIOLÓGICO. Home. Publicações. Comunicados Técnicos. **Micoplasmose Aviária**, [2011]. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=9> Acesso em: 31 ago. 2011.

JOHANSSON, K. E.; PETTERSSON, B. Taxonomy of *Mollicutes*. In: BLANCHARD, A.; BROWNING, G. (Ed.). **Molecular Biology and Pathogenesis of Mycoplasmas**, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. p. 1-30.

KIRKBRIDE, C. A. Mycoplasma, Ureaplasma, and Acholeplasma infections of bovine genitalia. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 3, p. 575-591, 1987.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Animal. Alimentação Animal. **Legislação**, [2011]. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/animal/alimentacao/legislacao>> Acesso em: 27 abr. 2011.

MARKHAM, P. F.; NOORMOHAMMADI, A. H. Diagnosis of Mycoplasmosis in Animals. In: BLANCHARD, A.; BROWNING, G. (Ed.). **Mycoplasmas molecular biology, pathogenicity and strategies for control**, United Kingdom: Horizon Bioscience, 2005. p. 355-382.

MARQUES, L.M. **Diagnóstico de micoplasmas no trato respiratório anterior de bezerros por cultura e reação em cadeia da polimerase**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). 2005. 86 p – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

METTIFOGO, E. et al. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 18, p. 22-25, 1996.

METTIFOGO, E. **Mycoplasmas aviários: diagnóstico pela reação em cadeia da polimerase multiplex e tipificação genômica com primers arbitrários e eletroforese de campo pulsado de cepas de *Mycoplasma gallisepticum***. Tese (Doutorado em Microbiologia). 2003. 178 p – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MILLER, R. B. et al. The effects of *Ureaplasma diversum* inoculated into the amniotic cavity in cows. **Theriogenology**, v. 20, p. 367-373, 1983.

MILLER, R.B. et al. *Ureaplasma diversum* as a cause of reproductive disease in cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 10, p. 479-490, 1994.

MORENO, A.M.; BARBARINI JUNIOR, O.; BACCARO, M.R. Levantamento sorológico para *Mycoplasma hyopneumoniae* em criações de suínos no período de dezembro de 1996 a julho de 1999. **Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos**, v. 9., p. 161-162.1999. (resumo)

MOROWITZ, H. J. Foreword: from the enigmatic pleuropneumonia-like organisms to the paradigmatic mycoplasma. In: BLANCHARD, A.; BROWNING, G. (Ed.). **Molecular Biology and Pathogenesis of Mycoplasmas**, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. p. 5-8.

MUTO, A.; USHIDA, C. Transcription and Translation. In: BLANCHARD, A.; BROWNING, G. (Ed.). **Molecular Biology and Pathogenesis of Mycoplasmas**, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. p. 323-346.

NEU, H. C.; GOOTZ, T. D. Antimicrobial Chemotherapy. In: BARON, S. (Ed.). **Medical Microbiology**, Galveston: The University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. 4 ed., cap. 11, 1996.

PINHEIRO, D. J. B. **Determinação da concentração inibitória mínima de ureaplasmas isolados de bovinos pela inibição de crescimento e citometria de fluxo**. [Determination of minimum inhibitory concentration of ureaplasmas isolated from cattle by inhibition of growth and flow citometry]. 2012. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

RACCACH, M.; ROTTEM, S.; RAZIN, S. Survival of Frozen Mycoplasmas. **Applied Environmental Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 167-171, 1975.

RAZIN, S. *et al.* Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1094-1156, 1998.

RAZIN, S. *Mycoplasma* Taxonomy and Ecology. In: Maniloff, J.; McElhaney, R. N.; Finch, L. R.; Baseman, J. B. **Mycoplasmas Molecular Biology and Pathogenesis**. Washington: American Society For Microbiology, 1992. p. 3- 22.

RAZIN, S.; TULLY, J. G. (Ed.). *Mycoplasma* characterization. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. (Ed.). **Methods in Mycoplasmaology**, New York: Academic Press, 1983. v. 1, p. 150-176.

RODWELL, A. W.; WHITCOMB, R. F. Methods for Direct and Indirect Measurement of *Mycoplasma* Growth. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. (Ed.). **Methods in Mycoplasmaology**, New York: Academic Press, 1983. v. 1, p. 185-196.

ROSS, R. F. Mycoplasmal diseases. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L. *et al.* (Ed.). **Diseases of swine**, Iowa State University, 1999. ed. 18, p. 537-555.

RUHNKE, H. L. *et al.* Bovine abortion and neonatal death associated with *Ureaplasma diversum*. **Theriogenology**, v. 21, p. 295-311, 1984.

RUHNKE, H.L.; ROSENDAL, S. Useful protocols for diagnosis of animal mycoplasmas. **Mycoplasmosis in animals: Laboratory Diagnosis**, p. 141-144, 1994.

SANTANA, G. C. e SOUSA, R. V. Professores do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA) [2011]. Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/BolTecnico/pdf/bol_38.pdf> Acesso em 14 mar. 2011.

SARKOSY, G. Quinolones: a class of antimicrobial agents. **Veterinary Medicine**, v. 46, p. 257-274, 2001.

SHEPARD, M. C. Culture Media for Ureaplasmas. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. (Ed.). **Methods in Mycoplasmaology**, New York: Academic Press, 1983. v. 1. p. 137-146.

SIMECKA, J. Immune Responses Following *Mycoplasma* Infection. In: BLANCHARD, A.; BROWNING, G. (Ed.). **Mycoplasmas molecular biology, pathogenicity and strategies for control**, United Kingdom: Horizon Bioscience, 2005. p. 485-534.

SIMECKA, J. W. et al. Mycoplasma Diseases of Animals. Mycoplasmas Molecular Biology and Pathogenesis. **American Society for Microbiology**, p. 03-22, 1992.

TAYLOR-ROBINSON, R. B.; HAIG, D. A.; WILLIAMS, M. H. Bovine T-strain mycoplasma. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 143, p. 517-518, 1967.

TAYLOR-ROBINSON, D.; ADDEY, J. P.; GOODWIN, C. S. Comparison of techniques for the isolation of T-strain mycoplasmas. **Nature (London)**, v. 222, p. 274-275, 1969.

TER LAAK, E. A.; NOORDERGRAAF, J. H.; VERSCHURE, M. H. Susceptibilities of *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma dispar* and *Ureaplasma diversum* Strains to Antimicrobial Agents in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 2, p. 317-321, 1993.

TER LAAK, E. A.; VANDIJK, J. E.; NOORDERGRAAF, J. H. Comparison of pathological signs of disease in specific-pathogen-free calves after inoculation of the respiratory tract with *Ureaplasma diversum* or *Mycoplasma canis*. **Journal of Comparative Pathology**. v. 108, n. 2, p. 121-132, 1993.

THOMAS, A. et al. Isolation of *Mycoplasma* species from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium. **Veterinary Record**, v. 151, n. 16, p. 472-476, 2002

TRUSCOTT, R. B.; RUHNKE, H. L. The effect of antibiotics against bovine mycoplasmas and ureaplasmas. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, p. 171-174, 1984.

TRYON, V. V.; BASEMAN, J. B. Pathogenic determinants and mechanisms. Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis. **American Society for Microbiology**, p. 563-589, 1992.

TULLY, J. G. General Cultivation Techniques for Mycoplasmas and Spiroplasmas. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. (Ed.). **Methods in Mycoplasmology**, New York: Academic Press, 1983. v. 1, p. 99-102.

VEYSSIER, P.; BRYSKIER, A. (Ed.). Amonicyclitol Aminoglycosides. In: BRYSKIER, A. (Ed.). **Antimicrobial Agents: Antibacterials and Antifungals**, Washington, DC: American Society for Microbiology, 2005. p. 453-469.

VICCA, J. et al. Efficacy of in feed medication with tylosin for the treatment and control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. **Veterinary Record**, v. 156, p. 606-610, 2005.

VITKOV, L. et al. Ex vivo gengival-biofilm consortia. **Letters in Applied Microbiology**, v.41, n.5, p.404-11, 2005.

YODER, H. W. et al. Mycoplasmosis. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W. (Ed.). **Diseases of poultry**, Iowa, USA, 1991. p.196-212.