

Artigo Científico

FLORA CONJUNTIVAL BACTERIANA DE OVINOS SADIOS DA RAÇA SANTA INÊS E SEUS MESTIÇOS CRIADOS NA MICRORREGIÃO DE GARANHUNS, PERNAMBUCO

José Bezerra de ALMEIDA NETO^{1*}; Fabrício Bezerra de SÁ²;
Karla Patrícia C. SILVA³; Melissa BUZINHANI⁴.

Em todos os animais existe uma flora bacteriana conjuntival normal. Para correta avaliação dos resultados de qualquer técnica de cultura, é necessário conhecer os microrganismos considerados como parte da flora normal, diferenciando-os dos patogênicos. Neste estudo o objetivo foi estabelecer padrões bacteriológicos de sacos conjuntivais de ovinos sadios. Avaliou-se 60 olhos de 30 animais sem alterações clínicas aparentes. Para o isolamento bacteriano e pesquisa de *Mycoplasma*, utilizou-se swab do saco conjuntival. *Moraxella* sp. foi a bactéria mais isolada, presente em 28,33% (17/60) dos olhos sadios, seguido por *Staphylococcus* sp., 23,33% (14/60). *Streptococcus* sp., 5,00% (3/60), *Micrococcus* sp., 5,00% (3/60), *Corynebacterium* sp., 3,33% (2/60), *Bacillus* sp., 3,33% (2/60) e *Serratia* sp., 1,67% (1/60). O *Mycoplasma conjunctivae* esteve presente em 15,00% (9/60) das amostras estudadas.

Termos de indexação: *Moraxella* sp., *Mycoplasma conjunctivae*, ovinos; microbiologia.

CONJUNCTIVAL BACTERIAL FLORA OF HEALTHY OVINES IN PERNAMBUCO STATE, BRAZIL

In all the animals there is a normal conjunctive bacterial flora. For correct evaluation of the results of any culture technique, it is necessary to know the microorganisms considered as part of the normal flora, differentiating them from the pathogenic ones. This study cared to determine bacteriologic patterns from healthy ovine's conjunctival sacks. Sixty unaffected eyes were studied. For bacterial isolation and *Mycoplasma* search, conjunctival swabs were done. *Moraxella* sp. was the most frequent bacteria in healthy eyes, 28.33% (17/60), followed by *Staphylococcus* sp., 23.33% (14/60). *Streptococcus* sp., 5.00% (3/60), *Micrococcus* sp., 5.00% (3/60), *Corynebacterium* sp., 3.33% (2/60), *Bacillus* sp., 3.33% (2/60) and *Serratia* sp., 1.67% (1/60). *Mycoplasma conjunctivae* was present in 15.00% (9/60) of samples.

Index terms: *Moraxella* sp.; *Mycoplasma conjunctivae*; ovines; microbiology.

¹ Méd. Veterinário, Doutorando - Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária. DMV / UFRPE. R. Dom Manoel de Medeiros, S/N - Dois Irmãos. CEP 52171-900 - Recife / PE. jbn@bravil.com.br. *Autor para Correspondência.

² Méd. Veterinário, Dr. - Professor Adjunto. DMFA / UFRPE.

³ Méd. Veterinária, M.Sc. - CESMAC / FEJAL.

⁴ Méd. Veterinária, Doutoranda - Depto. Microbiologia. ICB II / USP

INTRODUÇÃO

A conjuntiva é a mais exposta de todas as membranas mucosas. É móvel, semi-transparente e parece úmida e brilhante. Reveste a superfície interna das pálpebras, interna e externa da terceira pálpebra e a porção anterior do globo adjacente ao limbo. O espaço coberto pela conjuntiva é denominado de saco conjuntival (SAMUELSON, 1999; SLATTER, 2001). Está continuamente exposta a agentes infecciosos como vírus, bactérias e fungos. Assim sendo, o saco conjuntival geralmente não é estéril (STADES et al., 1999).

Em todos os animais existe uma flora bacteriana conjuntival normal. Acredita-se que esta flora natural desempenhe um papel na manutenção da saúde ocular, prevenindo o desenvolvimento de organismos potencialmente patogênicos (DAVIDSON et al., 1994).

Infecções bacterianas foram relatadas como as maiores causas de doença ocular em ruminantes e uma das técnicas mais comuns para o seu diagnóstico etiológico é a cultura de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e vírus. Para a correta avaliação dos resultados obtidos, é imprescindível conhecer quais microrganismos são considerados parte da flora normal e quais são considerados patogênicos (HARMOR, 2001). Estudos microbiológicos de olhos doentes são difíceis de interpretar, a menos que se possa compará-los com estudos similares realizados em olhos clinicamente sadios (SPRADBROW, 1968).

Gêneros e espécies bacterianas isoladas de olhos de ovinos sadios e doentes incluem: *Achromobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., *Listeria* sp., *Pasteurella* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Branhamella ovis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* (LANGFORD, 1971; EGWU, 1991).

Spradbrow (1968), em estudo para determinar a flora conjuntival de ovinos na Austrália, não obteve isolamento em 60% das amostras coletadas. No restante dos

olhos estudados, encontrou *Neisseria ovis* em 24%, *Micrococcus* sp. em 7%; *Streptococcus* sp. em 6%. Em algumas poucas amostras encontrou *Achromobacter*, *Bacillus* e *Moraxella* spp.

Na região sul do Brasil, Pires Neto (1995) encontrou *Branhamella ovis*, em cultura pura ou associada a outras bactérias, em aproximadamente 54% das amostras coletadas de ovinos sadios. As demais bactérias isoladas foram, em ordem decrescente de frequência, *E. coli*, *Streptococcus* sp. e *Staphylococcus aureus*. Não houve crescimento bacteriano em 23% das amostras.

Ceratoconjuntivite infecciosa ovina é uma doença contagiosa aguda, caracterizada por inflamação da conjuntiva e córnea (GREIG, 1989; EGWU, 1991). Seu exato agente etiológico permanece obscuro, pois uma variedade de microrganismos tem sido encontrada associada à doença (JONES et al., 1976; EGWU et al., 1989). Estudos epidemiológicos em ceratoconjuntivite infecciosa ovina e relatos de transmissão experimental têm incriminado *Mycoplasma conjunctivae* como o mais provável agente causal da doença. No entanto, sua interrelação com outras espécies bacterianas e seu papel na patogênese permanecem obscuros, bem como o de fatores ambientais que podem predispor à doença (LAAK et al., 1986; HOSIE e GREIG, 1995; RUFFIN, 2001; ALMEIDA NETO et al., 2004).

Jones (1983) classificou o *Mycoplasma conjunctivae* como um organismo pouco ou não-patogênico e provavelmente presente na flora. É mais comumente isolado em olhos, mas eventualmente pode ser encontrado no trato respiratório de caprinos e ovinos.

Branhamella spp. foi isolada de olhos hígidos e doentes em ovinos. Sua participação tem sido muito controversa, assim como sua nomenclatura e taxonomia. Isolamentos bacterianos de sacos conjuntivais de animais sadios demonstraram poucos organismos. Apenas *B. ovis* foi isolada consistentemente de olhos de animais jovens e adultos sadios, representando a maior

parte da flora residente no saco conjuntival. Também foi isolada com mais frequência dos olhos afetados, sugerindo que este microrganismo pode contribuir para a severidade da doença (DAGNALL, 1994 a,b).

M. conjunctivae é comumente isolado em surtos da doença, porém pode não estar presente em todos os animais doentes, bem como pode ser isolado, com menos frequência, de animais clinicamente sadios. Formas intracelulares do organismo, se presentes, podem ser mais difíceis de isolamento que quando estão extracelulares (HOSIE, 1988, RADOSTITS et al., 2000). Dagnall (1994a) sugeriu que podem existir diferenças na patogenicidade entre cepas de *M. conjunctivae*. Isto poderia resultar em alguns animais exibindo sintomas de ceratoconjuntivite e outros não.

Diante da escassez de referências na literatura especializada, neste trabalho objetivou-se estabelecer a flora conjuntival bacteriana de ovinos sadios na microrregião de Garanhuns, Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 30 ovinos, aparentemente sadios, da raça Santa Inês e seus cruzamentos, machos ou fêmeas e de idades variadas, criados em sistema de manejo semi-intensivo, em diversos plantéis da Microrregião de Garanhuns, PE. Foram submetidos a exame físico geral, de acordo com o descrito por Radostits et al. (2000) e a exame oftalmológico (SLATTER, 2001), onde cada olho foi considerado como uma unidade experimental, totalizando 60 amostras.

A colheita das amostras foi feita através da fricção de dois swabs secos estéreis junto à conjuntiva palpebral de cada olho. Uma amostra, conservada sob refrigeração, foi encaminhada ao Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife (PE) e processada de acordo com Koneman et al.

(2001). Para a diferenciação entre os gêneros *Branhamella* e *Moraxella* seguiu-se o protocolo descrito por Dagnall (1993). A outra amostra foi encaminhada, em meio SP4 (TULLY, 1995) sob refrigeração, ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), para pesquisa de Mycoplasma, onde o material clínico foi submetido ao método de extração de DNA descrito por Fan et al. (1995).

Numa primeira etapa, todas as amostras foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores (primers) gênero-específico comuns para micoplasma, acholeplasma, ureaplasma e spiroplasma, descritos por Van Kuppeveld et al. (1992). As amostras positivas nesta prova foram submetidas a uma nova reação, com primers específicos para *M. conjunctivae*, descritos por Lauerma (1998).

A análise dos dados foi realizada de acordo com Curi (1997), através de distribuição de frequências absolutas e relativas (técnicas de estatística descritiva).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo da flora conjuntival bacteriana destes animais apresentou os seguintes resultados (Tabela 1): em 38,33% (23/60) das amostras não houve crescimento bacteriano. *Moraxella* sp. esteve presente em 28,33% (17/60) dos olhos pesquisados. Em 23,33% (14/60) verificou-se a presença de *Staphylococcus* sp., sendo 5% (3/60) destes coagulase positiva. *Streptococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Bacillus* sp. e *Serratia* sp. estavam presentes em 5% (3/60), 5% (3/60), 3,33% (2/60), 3,33% (2/60) e 1,67% (1/60) dos isolamentos, respectivamente (Figura 1). A ocorrência de mais de um gênero bacteriano por amostra foi verificada em 8,33% (5/60) dos casos. A coloração de Gram evidenciou a predominância de bactérias Gram (+), com 57,14% das bactérias isoladas.

TABELA 1 - Resultados do crescimento bacteriano das 60 amostras (n) colhidas dos sacos conjuntivais de ovinos sadios da raça Santa Inês e seus mestiços, de acordo com o gênero bacteriano

Gêneros bacterianos	Nº de isolamentos/n	Percentual de isolamentos
Amostras sem crescimento	23/60	38,33 %
<i>Moraxella</i> sp.	17/60	28,33 %
<i>Staphylococcus</i> sp.	14/60	23,33 %
<i>Streptococcus</i> sp.	3/60	5,00 %
<i>Micrococcus</i> sp.	3/60	5,00 %
<i>Corynebacterium</i> sp.	2/60	3,33 %
<i>Bacillus</i> sp.	2/60	3,33 %
<i>Serratia</i> sp.	1/60	1,67 %

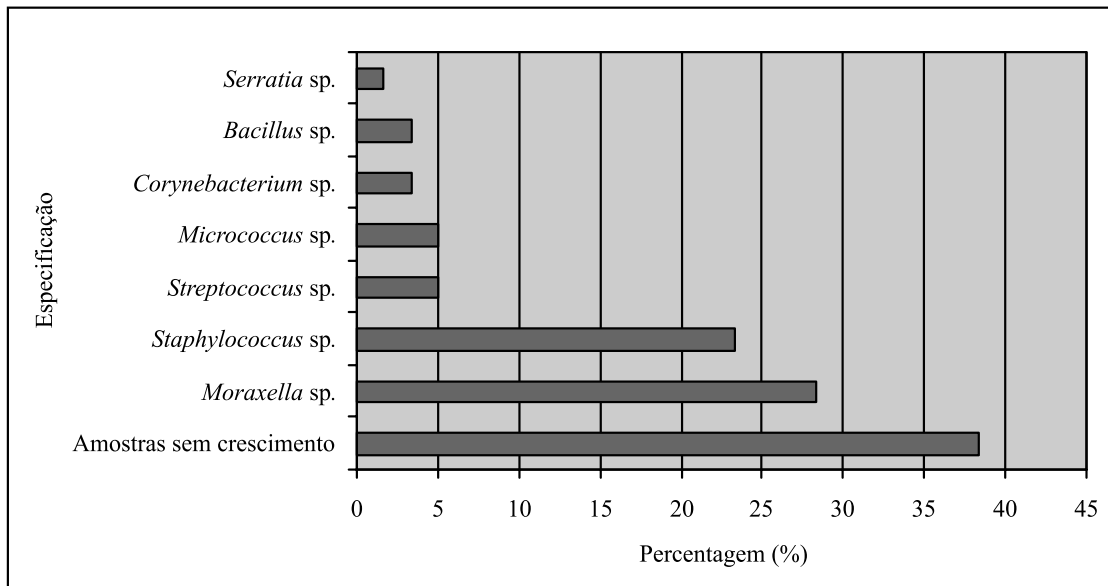


Figura 1 - Percentagem de crescimento bacteriano das 60 amostras colhidas dos sacos conjuntivais de ovinos sadios da raça Santa Inês e seus mestiços, de acordo com gênero bacteriano.

Não foram encontrados na literatura científica muitos relatos sobre flora bacteriana conjuntival de ovinos sadios. O cultivo das amostras deste grupo possibilitou o crescimento de bactérias já determinadas por outros autores (SPRADBROW, 1968; LANGFORD, 1971; EGWU, 1991; PIRES NETO, 1995) como parte da flora residente. Apenas a *Serratia* sp. não tinha sido relatada na literatura consultada como parte da flora conjuntival, mas há possibilidade

que seu isolamento seja em decorrência de contaminação ambiental, uma vez que este gênero faz parte das bactérias do trato intestinal (CARTER et al., 1995).

Spradbrow (1968) e Pires Neto (1995) não obtiveram isolamento de bactérias em 60,00% e 23,00% de amostras coletadas da conjuntiva de ovinos, respectivamente. Neste trabalho não houve crescimento bacteriano em 38,33% (23/60). Estas taxas de não isolamento podem ser em decorrência

do método de coleta, com o swab seco não possibilitando a coleta de uma maior população bacteriana.

A presença de *M. conjunctivae* foi detectada em 15,00% (9/60) das amostras estudadas. Ocorreu isoladamente em 33,33% (3/9) dos casos e associado ao *Staphylococcus* sp. em 22,22% (2/9), a *Moraxella* sp. em 22,22% (2/9), ao *Mycrococcus* sp. em 22,22% (2/9) e ao *Corynebacterium* sp. em 11,11% (1/9) dos casos.

A presença de *M. conjunctivae* em amostras de animais sadios, apesar de pouco freqüente, está de acordo com os relatos de Surman (1968), Hosie (1988); Radostits et al. (2000) e Almeida Neto et al. (2004) que isolaram este microorganismo em animais clinicamente sadios, porém com menor freqüência. Surman (1968) sugeriu que todo ovino pode abrigar *Mycoplasma* na conjuntiva de uma forma latente, e sua ativação ocorre como resultado de traumas ou sob condições de estresse.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho, nas circunstâncias metodológicas em que foi executado, permitiram concluir que algumas bactérias como o *Staphylococcus* sp., a *Moraxella* sp. e o *Mycoplasma conjunctivae* fazem parte da flora conjuntival de animais sem sinais clínicos, devendo-se levar este fato em consideração no que se refere a epidemiologia, diagnóstico, tratamento e controle da ceratoconjuntivite infecciosa ovina.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA NETO, J. B.; SÁ, F. B.; BUZINHANI, M. et al. Ocorrência de *Mycoplasma conjunctivae* em ovinos sadios e com ceratoconjuntivite infecciosa, no estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n.1, p. 79-81, 2004.

CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M.; ROBERTS, A.W. **Essentials of veterinary microbiology**. 5ª ed. Philadelphia: Williams e Wilkins, 1995. 394 p.

CURI, P. R. **Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas**. Botucatu: Tipomic, 1997. 263 p.

DAGNALL, G. J. R. Some cultural characteristics of *Branhamella ovis* isolated from the conjunctival sac of sheep. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 37, p. 45 - 52, 1993.

DAGNALL, G. R. J. An investigation of colonization of the conjunctival sac of sheep by bacteria and Mycoplasmas. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 112, p. 561 - 567, 1994a.

DAGNALL, G. R. J. The role of *Branhamella ovis*, *Mycoplasma conjunctivae* and *Chlamydia psittaci* in conjunctivitis of sheep. **British Veterinary Journal**, London, v. 150, p. 65 - 71, 1994b.

DAVIDSON, H. J.; ROGERS, D. P.; YEARY, T. J. et al. Conjunctival microbial flora of clinically normal pigs. **American Journal Veterinary Research**, Chicago, v. 55, p. 994 - 951, 1994.

EGWU, G. O. Ovine infectious keratoconjunctivitis: an update. **Veterinary Bulletin**, Farnham Royal, v. 61, p. 547 - 559, 1991.

EGWU, G. O; FAULL, W. B.; BRADBURY, J. M. et al. Ovine infectious keratoconjunctivitis: a microbiological study of clinically unaffected and affected sheep's eyes with special reference to *Mycoplasma conjunctivae*. **The Veterinary Record**, London, v. 125, p. 253 - 256, 1989.

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

GREIG, A. Ovine keratoconjunctivitis. An update. **In Practice**, London, v. 11, p. 110 - 113, 1989.

HARMOR, R. E. Techniques for collection and interpretation of tissue samples in ocular disease. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, Philadelphia, v. 16, p. 17 - 21, 2001.

HOSIE, B. D. Keratoconjunctivitis in a hill sheep flock. **The Veterinary Record**, London, v. 122, p. 40 - 43, 1988.

HOSIE, B. D.; GREIG, A. Role of oxytetracycline dihydrate in the treatment of *Mycoplasma*-

- associated ovine keratoconjunctivitis in lambs. **British Veterinary Journal**, London, v. 151, p. 83 - 88, 1995.
- JONES, G. E. Mycoplasmas of sheep and goats: a synopsis. **The Veterinary Record**, London, v. 113, p. 619 - 620, 1983.
- JONES, G. E.; FOGGIE, A.; SUTHERLAND, A. et al. Mycoplasma and ovine keratoconjunctivitis. **The Veterinary Record**, London, v. 99, p. 137 - 141, 1976.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. et al. **Diagnóstico Microbiológico**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. Cap. 14. p 720-782.
- LAAK, E. A. ter; SCHREUDER, B. E. C.; KIMMAN, T. G. et al. Keratoconjunctivitis in sheep experimentally produced by Mycoplasma conjunctivae. **Israel Journal of Medical Sciences**, Jerusalem, v. 23, p. 533, 1986.
- LANGFORD, E. V. Mycoplasma and associated bacteria isolated from ovine pink-eye. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Ottawa, v. 35, p. 18 - 21, 1971.
- LAUERMAN, L. H. Mycoplasma PCR Assays. In: LAUERMAN, L. H. Nucleic acid amplification assays for diagnosis of animal diseases. **Alabama: Dept. of Agriculture and Industries**, p. 41-47, 1998.
- PIRES NETO, J. A. S. Flora bacteriana ocular de ovinos com e sem lesões de ceratoconjuntivite. 62p. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1995.
- RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary Medicine**. 9ª ed. London: W.B. Saunders, 2000, 1877p.
- RUFFIN, D. C. Mycoplasma infections in small ruminants. **Veterinary Clinics of North America. Large Animal Practice**, Philadelphia, v. 17, p. 315 - 332, 2001.
- SAMUELSON, D. A. Ophthalmic anatomy. In: GELLAT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. 3ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 1999, p. 31 -150.
- SLATTER, D. **Fundamentals of veterinary ophthalmology**. 3ª ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001, 640 p.
- SPRADBROW, P. B. The bacterial flora of the ovine conjunctival sac. **The Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 44, p. 117 - 118, 1968.
- STADES, F. C.; BOEVÉ, M. H.; NEUMANN, W. et al. **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. São Paulo: Manole, 1999. 204 p.
- SURMAN, P. G. Cytology of 'pink eye' of sheep including a reference to trachoma of man, by employing acridine orange and iodine stains, and isolation of Mycoplasma agents in infected sheep eyes. **Australian Journal of Biological Science**, Melbourne, 21, 447 - 467, 1968.
- TULLY, J. G. Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of Mollicutes. In: TULLY, J. G.; RAZIN, S. (Eds). Molecular and diagnostic procedures in Mycoplasmaology. v I, **Academic Press Inc.: San Diego**, California. 1995, p. 33 - 40.
- VAN KUPPEVELD, F. J. M.; VAN der LOGT, J. T. M.; ANGULO, A. F. et al. Genus- and Species-Specific Identification of Mycoplasmas by 16S rRNA Amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, 2606-2615, 1992.