

EFICÁCIA *IN VITRO* DA ENROFLOXACINA 10% SOBRE MICROORGANISMOS ASSOCIADOS COM DOENÇAS UTERINAS EM VACAS LEITEIRAS.

MARCELO MOREIRA ANTUNES¹; LISIANE MARTINS VOLCÃO²; GLADIS AVER RIBEIRO³; PATRÍCIA MATTEI⁴; CÁSSIO CASSAL BRAUNER⁵; MARCIO NUNES CORRÊA⁶

¹Aluno do Programa de Pós-Graduação em Veterinária UFPel; marcelo85mma@gmail.com

²Graduanda do curso de Ciências Biológicas UFPel; lisivolcao@hotmail.com

³Professora associada da UFPel; gladisaver@hotmail.com

⁴Graduanda do curso de Biotecnologia UFPel; patymtp@hotmail.com

⁵Pós-doutorando no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia UFPel; cassiocb@hotmail.com

⁶Professor Adjunto da disciplina de Clínica Médica de Grandes Animais I; marcio.nunescorrea@gmail.com

NUPEEC - Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão e Pecuária; nupeec@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O período pós-parto de vacas leiteiras é um momento crucial ao longo da fase produtiva desses animais, principalmente devido ao balanço energético negativo e a depressão do sistema imune (ZERBE et al. 2000). Além disso, fatores de risco como a retenção de placenta, distocias e partos gemelares favorecem a colonização e multiplicação de bactérias patogênicas no útero, aumentando a incidência das infecções uterinas (GILBERT et al. 2005).

SHELDON et al. (2006) classificaram as ocorrências uterinas pós-parto em metrite puerperal, metrite clínica e endometrite clínica e subclínica. Independente da enfermidade, os prejuízos das infecções pós-parto são amplamente relatados e incluem a diminuição nas taxas de concepção, o aumento no intervalo entre partos, no número de descartes e nas perdas econômicas (GILBERT et al. 2005).

Por conseguinte, a minimização destes efeitos deletérios passa pelo correto tratamento destes casos, e isto inclui fatores como a escolha da forma de tratamento e do medicamento. Para o tratamento de metrite/endometrite, os antimicrobianos podem ser administrados tanto pela via intrauterina (GALVAO et al. 2009) e/ou sistêmica (DRILLICH et al. 2007). A associação de outras drogas com os antimicrobianos têm sido descritas como alternativas potenciais, como os análogos de prostaglandina F₂α e antiinflamatórios não esteroidais (DRILLICH et al. 2007; GALVAO et al. 2009). Também existem relatos do uso de antissépticos (KOUJAN et al. 1996) e enzimas (DRILLICH et al. 2005).

Os principais antimicrobianos utilizados incluem tetraciclina, penicilinas sintéticas e semi-sintéticas (POL & RUEGG, 2007) e cefalosporinas (DRILLICH et al. 2007). Outros fármacos, como amicacina, lincomicina-espectinomicina, enrofloxacina (FARCA et al. 1997) ou neomicina com ampicilina (KACZMAROWSKI et al. 2004) também tem sido usados.

As dificuldades no tratamento destas infecções advêm da forma empírica de como alguns antimicrobianos são utilizados e da resistência adquirida de algumas bactérias. Por exemplo, apesar de a oxitetraciclina ser amplamente utilizada por Veterinários para o tratamento de infecções uterinas, inúmeras evidências de resistência e altos valores de concentrações inibitórias mínimas já indicam que este fármaco não será a melhor opção de tratamento no futuro (SHELDON, 2004).

Diante disso, nosso objetivo foi a avaliar a eficácia *in vitro* de uma nova molécula de enrofloxacina de rápida ação disponível no mercado, contra bactérias associadas às infecções uterinas de vacas leiteiras.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFPel, estando registrado sob o código 0045, e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado por todos os participantes.

Para os testes de sensibilidade ao quimioterápico, utilizou-se o método de difusão em disco (BAUER et al. 1966), que consiste na difusão, através do ágar, de um antimicrobiano impregnado em um disco, gerando a formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano (BARRY, 1991). Este é um método qualitativo, que permite classificar a amostra bacteriana em suscetível, intermediária ou resistente ao antimicrobiano, de acordo com o tamanho do crescimento do halo (NCCLS, 2000).

Uma pequena quantidade de colônias das cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella*, previamente cultivadas, foram coletadas com o auxílio de uma alça bacteriológica e suspendidas em 5 ml de solução salina 0,85%, para se obter uma turvação correspondente a 0,5 na escala de McFarland. Esse ajuste foi feito de forma visual.

Após a homogeneização dos inóculos, realizou-se a inoculação das culturas nas placas de petri, com o auxílio de um swab. As inoculações foram feitas em forma de estrias na superfície do ágar, em 4 direções, girando-se as placas em ângulo de 90° após cada estria. As placas permaneceram em repouso sobre a bancada por 5 minutos para que fosse absorvido o excesso de umidade da superfície do ágar.

Após permanecerem em repouso à temperatura ambiente, de forma estéril com auxílio de uma pinça, os discos foram acomodados adequadamente sobre o ágar, respeitando-se o limite de 1,5 cm com a borda da placa e de 3 cm entre os discos, para evitar-se a superposição dos halos de inibição. Os discos utilizados foram: enrofloxacin padrão 5 mcg (Cefar Diagnóstica Ltda, São Paulo, Brasil) e enrofloxacin comercial 5 ug (Oxoid Ltd, Hampshire, Inglaterra).

As análises foram feitas em duplicata, com cada placa contendo 3 discos de difusão, 2 da substância teste e o disco controle que foi impregnado com 5 microlitros de água milli-Q.

Após um período mínimo de 6 horas a 35°C, realizou-se a leitura com o auxílio de um paquímetro, medindo-se a distância entre uma borda e outra de cada halo de inibição. Considerou-se suscetível, aqueles aquelas bactérias que apresentaram halos de inibição ≥ 22 mm entre uma borda e outra.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados da leitura do teste de difusão em ágar podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 - Leitura do teste de difusão em ágar.

Microorganismo	Enrofloxacin padrão (mm)		Resultado	Enrofloxacin comercial (mm)		Resultado
	Disco 1	Disco 2		Disco 1	Disco 1	
<i>Escherichia coli</i>	41	40	40,5 (S)	40	41	40,5 (S)
<i>P. aeruginosa</i>	25	25	25 (S)	22	22	22 (S)
<i>Salmonella</i>	26	25	25,5 (S)	23	23	23 (S)
<i>S. aureus</i>	31	34	32,5 (S)	31	31	31 (S)

Pode-se observar que todas as cepas foram suscetíveis ($S \geq 22\text{mm}$), tanto para a enrofloxacin padrão quanto a enrofloxacin comercial. Os resultados estão em concordância com a literatura (PAPICH, 2003), no qual relatou a suscetibilidade de *Escheria coli*, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* e a variabilidade quanto a *Pseudomona aeruginosa*.

Apesar de existirem poucos trabalhos relacionando a utilização da enrofloxacin pela via intrauterina, principalmente para o combate de endometrites, seu potencial de ação pode ser de grande interesse, uma vez que as fluorquinolonas apresentam um amplo espectro de ação e elevada distribuição intracelular nos leucócitos, o que pode ser o responsável pelas concentrações mais elevadas do fármaco nos tecidos infectados e com grande concentração de material purulento, quando comparados ao tecido sadio (PAPICH, 2003). Ainda, apresentam ação comprovada contra inúmeras bactérias associadas com infecções uterinas, como *Escheria coli*, *Proteus* e *Staphylococcus aureus* (PAPICH, 2003).

Para uma melhor avaliação da eficácia da enrofloxacin comercial frente às infecções uterinas, faz-se necessário a realização de tais testes com a utilização de bactérias reconhecidamente associadas com lesões endometriais, que além de *Escherichia coli*, incluem também *Arcanobacterium pyogenes* e *Fusobacterium necrophorum* (SHELDON, 2004).

4. CONCLUSÕES

A enrofloxacin comercial mostrou-se eficaz nos testes *in vitro* contra algumas bactérias associadas com infecções uterinas. Entretanto, mais testes com bactérias reconhecidamente mais patogênicas se fazem necessários para uma melhor avaliação do produto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRY, A. L. Procedures and theoretical considerations for testing antimicrobial agents in agar media. In: **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., Md, 1991.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 2413-2415, 1966.

DRILLICH, M., RAAB, D., WITTKE, M., HEUWIESER, W. Treatment of chronic endometritis in dairy cows with an intrauterine application of enzymes. A Field trial. **Theriogenology**, v. 63, p. 1811-1823, 2005.

DRILLICH, M., VOIGHT, D., FORDERUNG, D., HEUWIESER, W. Treatment of acute puerperal metritis with flunixin meglumine in addition to antibiotic treatment. **Journal of Dairy Science**, v. 290, p. 3758-3763, 2007.

FARCA, A. M., NEBBIA, P., ROBINO, P., RE, G. Effects of combination of antibiotic-EDTA-Tris in the treatment of chronic bovine endometritis caused by antimicrobial-resistant bacteria. **Pharmacological Research**, v. 36, p. 35-39, 1997.

GALVAO, K. N., GRECO, L. F., VILELA, J. M., SA FILHO, M. F., SANTOS, J. E. Effect of intrauterine infusion of ceftiofur on uterine health and fertility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 1532-1542, 2009.

GILBERT, R. O., SHIN, S. T., GUARD, C. L., ERB, H. N., FRAJBLAT, M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. **Theriogenology**, v. 64, p. 1879-1888, 2005.

KACZMAROWSKI, M., MALINOWSKI, E., MARKIEWICZ, H. Influence of various treatment methods on bacteriological findings in cows with puerperal metritis. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 7, p. 171-174, 2004.

KOUJAN, A., EISSA, H. M., HUSSEIN, M. A., AYOUB, M. M., AFIETY, M. M. Therapeutic efficacy of povidone-iodine (Betadine) and dichloroxylenol (Septocid) in Holstein cows affected with endometritis and/or cervicitis. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 44, p. 111-119, 1996.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standards M7-A5. Wayne, PA, 2000.

PAPICH, M. G. Fármacos antimicrobianos fluorquinolônicos. In: ADAM, H. R. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., Cap. 45, 750-766, 2003.

POL, M., RUEGG, P. L. Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 249-261, 2007.

SHELDON, I. M. The post partum uterus. **Vet. Clin. Food Anim.**, v. 20, p. 569-591, 2004.

SHELDON, I. M., LEWIS, G. S., LE BLANC, S., GILBERT, R. O. Defining post-partum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 1516-1530, 2006.

ZERBE, H., SCHNEIDER, N., LEIBOLD, W., WENSING, T., KRUIP, T. A., SCHUBERTH, H. J. Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver. **THERIOGENOLOGY**, v. 54, p. 771-786, 2000.