

TÉCNICAS DE CULTIVO PARA ISOLAMENTO DE *MYCOPLASMA* DE PULMÕES DE BOVINOS¹

MAÍRA HALFEN TEIXEIRA LIBERAL e PHYLLIS CATHARINA ROMIJN²

RESUMO - No presente trabalho, os autores apresentam várias metodologias relativas ao isolamento e cultura de *Mycoplasma* spp., com base em sua experiência pessoal obtida através de pesquisas com microorganismos em pulmões de bovinos.

Termos para indexação: micoplasmose, pneumonia, bezerras.

CULTIVATION TECHNIQUES FOR *MYCOPLASMA*. ISOLATED FROM BOVINE LUNGS

ABSTRACT - In the present work, the authors presented various methodologies concerning the isolation and culture of *Mycoplasma* spp., with references on their own experience, obtained through research work with the referred microorganisms, in bovine lungs.

Index terms: mycoplasmosis, pneumonia, calves.

INTRODUÇÃO

As exigências nutricionais e os fatores que limitam o crescimento dos microorganismos de interesse em Saúde Pública constituem um problema a ser resolvido para que se consiga o seu isolamento e identificação. As peculiaridades de cada gênero (e espécie) de microorganismo quanto às suas exigências em relação aos meios de cultivo, temperatura ideal de crescimento, tempo de incubação necessária para seu desenvolvimento, morfologia, coloração e características bioquímicas, são os pontos básicos a serem observados para se obter sucesso no seu isolamento e identificação, quando se trabalha com material suspeito de determinada enfermidade.

No caso particular da micoplasmose, muitas são as dificuldades encontradas para o estabelecimento do meio de cultivo adequado a ser utilizado para o crescimento e isolamento de *Mycoplasma* spp., já que cada espécie do microorganismo tem exigências específicas (Ogata et al. 1967).

As dificuldades se encontram também na aquisição dos produtos básicos para o preparo dos meios de cultivo, que, muitas vezes, dependem de importação, o que encarece muito os trabalhos de laboratório, desestimulando inclusive as pesquisas.

Além disso, devido às características próprias de crescimento, nutrição, morfologia e repicagem desse microorganismo (Razin 1978), somente a partir do décimo quarto dia de incubação é que se pode ter uma idéia da negatividade, ou não, do material trabalhado, sendo necessários pelo menos 21 dias para se afirmar que um material é positivo ou negativo para *Mycoplasma* spp.

A demora para a liberação do resultado do exame deve-se à característica do crescimento do microorganismo, que é lento, e à necessidade de diversas subculturas em meio sólido e líquido, além da comprovação da sua identidade por provas específicas (Erno & Stipkovits 1973).

Através de um projeto de pesquisa desenvolvido de 1980 a 1984 pelo Laboratório de Biologia Animal da PESAGRO-RIO sobre a ocorrência de *Mycoplasma* sp. e *Chlamydia* sp. em bovinos acometidos de broncopneumonias atípicas, foi possível trabalhar com 235 materiais (pulmões e traquéias), utilizando-se diversos meios de cultivo, visando ao isolamento de *Mycoplasma* spp.

Os seis diferentes meios de cultivo utilizados durante a pesquisa foram escolhidos segundo a bibliografia consultada, levando-se em consideração os materiais trabalhados (meios que facilitassem o crescimento das diferentes espécies de *Mycoplasma* existentes em pulmões e traquéias de bovinos) e a disponibilidade desses meios (possibilidade de importação).

O presente trabalho tem por objetivo fornecer

¹ Aceito para publicação em 30 de março de 1987.

² Méd. - Vet., PESAGRO/Laboratório de Biologia Animal - Alameda São Boaventura, 770 - Fonseca, CEP 24123 Niterói, RJ.

orientação quanto ao isolamento e cultivo de *Mycoplasma* spp., esclarecendo a metodologia empregada através da análise comparativa dos meios e diluições utilizadas, tempo necessário para crescimento e isolamento, subculturas realizadas e resultados alcançados em quatro anos de pesquisa.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material

O material (pulmões e traquéias) foi coletado dos animais logo após sua morte. Foi remetido ao laboratório o mais rápido possível (as peças inteiras), acondicionado em saco de plástico dentro de um isopor com gelo. Nos casos em que não foi possível a remessa imediata, as peças foram estocadas a -20°C , segundo recomendação de Ruhnke & Dreumel (1972).

Todo o material veio acompanhado de uma ficha de necropsia contendo a anamnese, sintomas clínicos, vacinas recebidas e suspeita clínica, além da identificação da fazenda, do proprietário e do animal, assim como o estado sanitário do rebanho (com referência a outros casos com a mesma sintomatologia, na propriedade).

Pulmões

Foram escolhidas as áreas do pulmão que apresentavam consolidação (associada a colapso e atelectasia); os fragmentos de pulmão congesto; o lobo apical, cardíaco e diafragmático que se apresentavam firmes (duros), com atelectasia ou de coloração vermelho-escura, ou ainda fragmentos de tecido pulmonar com alterações não definidas macroscopicamente (Martin et al. 1983).

Traquéia

Após seccionada entre anéis, deu-se preferência aos repletos de exsudato mucopurulento.

Tratamento do material

O material (pulmão e traquéia) foi triturado em caldo PPLO (Difco), geralmente utilizando-se pistilo e areia estéril para auxiliar na maceração.

Semeadura do material

O material triturado foi semeado nos diferentes meios de cultura, fazendo-se várias diluições de 10^{-1} até 10^{-6} , para facilitar o crescimento de *Mycoplasma* e inibir o de microorganismos sensíveis aos antibióticos e fungistáticos adicionados aos meios.

Meios de cultivo.

Os meios de cultivo utilizados rotineiramente na pesquisa realizada para crescimento e isolamento de *Mycoplasma* foram os seguintes:

Meio 1 - Meio básico com uréia - Para isolamento de *Ureaplasma* spp. em geral (T. strains).

Meio 2 - Meio básico com cristal violeta - como inibidor de crescimento bacteriano, e sem soro, para diferenciar os gêneros *Mycoplasma* (necessita de esterol) e *Acholeplasma* (não necessita de esterol).

Meio 3 - Meio básico com tetrazólio - para verificar a propriedade de redução do tetrazólio de *Mycoplasma* spp.

Meio 4 - Meio básico com vermelho de fenol - como indicador do pH do meio, e indiretamente de crescimento (pela utilização da glicose), principalmente para *Mycoplasma bovis* e *Acholeplasma* sp.

Meio 5 - Meio básico simples - permite o crescimento de maior número de espécies de *Mycoplasma*.

Meio 6 - Meio básico com "mycoplasma supplement" (Difco) ou "Mycoplasma supplement S" (Difco) - sendo estes meios semiprontos (liofilizados) e utilizados para isolamento de *Mycoplasma* spp. e *Acholeplasma* sp.

Preparo dos meios de cultivo para isolamento

Os meios de cultivo foram preparados segundo as técnicas bacteriológicas preconizadas por Aluotto et al. (1970). Os seis meios utilizados na presente pesquisa foram escolhidos levando-se em conta a disponibilidade de aquisição do material básico e pela orientação da literatura consultada. Acredita-se ter trabalhado com os meios que propiciam o crescimento de praticamente todas as espécies de *Mycoplasma* que acometem pulmões de bovinos.

Meio 1 - Preparado tendo por base 2,1 g de caldo PPLO (Difco); 70 ml de água destilada deionizada; 0,1 ml de vermelho de fenol (solução aquosa a 2%); e 0,5 ml de sulfato de manganês ($\text{MnSO}_4\text{H}_2\text{O}$ - solução aquosa a 3%), pH 6,0 ajustado com HCl 1N.

Como aditivos, foram utilizados: 20 ml de soro de cavalo; 10 ml de extrato fresco de levedura (Fleischmann) a 25%; 1 ml de penicilina 10×10^4 UI/ml e 1 ml de uréia em solução aquosa a 10%.

Meio 2 - Como base, tem-se 2,1 g de caldo PPLO com cristal violeta (Difco) e 70 ml de água destilada deionizada. Adiciona-se ainda 1 ml de "serum fraction" (Difco); pH 7,8.

Meio 3 - O meio básico é constituído de 2,1 g de caldo PPLO (Difco) em 70 ml de água destilada deionizada.

Tem como aditivos 20 ml de soro de cavalo; 10 ml de extrato fresco de levedura a 25%; 1 ml de acetato de tálio a 2,5% p/v; 0,25 ml de penicilina G 20×10^4 UI/ml; 1,2 ml de ADN de timo de bezerro (Sigma) a 0,2% p/v e tetrazólio a 1%; pH 7,8.

Meio 4 - A base de 2,1 g de caldo PPLO (Difco) e 70 ml de água destilada deionizada.

Adicionam-se ainda: 20 ml de soro de cavalo; 10 ml de extrato fresco de levedura; 1.000 UI/ml de penicilina G em concentração final; 1,2 ml de ADN de timo de bezerro (Sigma) a 0,2% p/v; 1 ml de acetato de tálio a 2,5% p/v; 1 ml de glicose e 0,02 g de vermelho de fenol; pH 7,8.

Meio 5 - Tem por base 2,1 g de caldo PPLO (Difco) e 70 ml de água destilada deionizada, podendo levar 0,8 g de agar para os meios sólidos.

Colocam-se, como aditivo, 20 ml de soro de cavalo, 10 ml de extrato de levedura fresco, 1.000 UI/ml de penicilina G em concentração final, 1,2 ml de ADN de timo de bezerro (Sigma) a 0,2% p/v, 1 ml de acetato de tálio a 2,5% p/v, pH 7,8.

Meio 6 - É composto de 2,1 g de caldo PPLO (Difco) e 70 ml de água destilada deionizada como base. Pode levar, opcionalmente, conforme se necessite de meio sólido, 0,8 g de agar purificado.

É acrescido de 4 ml de "mycoplasma supplement" (Difco) e 4 ml de "mycoplasma supplement S" (Difco).

As diferentes exigências das principais espécies de *Mycoplasma* estão relacionadas na Tabela 1.

Utilização dos meios para isolamento

Foram utilizadas diluições de 10^{-1} a 10^{-6} , em todos os meios, do material suspeito. As leituras foram feitas com 24 e 48 horas. Todos os meios de cultivo disponíveis foram utilizados para possibilitar o crescimento das diferentes espécies de *Mycoplasma* que pudessem estar presentes no material trabalhado.

Meios de cultivo para crescimento

Os meios seis meios escolhidos para isolamento foram utilizados, acrescentando-se ágar-ágar na concentração de 10% para dar consistência sólida ao meio.

As placas eram preparadas pouco antes de sua utilização, semeadas e incubadas a 37°C em estufa bacteriológica, em ambiente com $\pm 5\%$ de CO_2 . Eram acondicionadas dentro de latas, com velas acesas, e contendo algodão embebido em água (para evitar o ressecamento do meio).

Foram semeadas as maiores diluições onde havia turvação dos meios ou presença de massas de crescimento (observadas com uma leve agitação dos tubos).

Cultura e subculturas

O material primário foi triturado em caldo PPLO (Difco) e inoculado nos meios de cultivo já mencionados,

com seis diluições. Permaneceu 48 horas na estufa, a 37°C, em tubos com rolha de borracha. Foi feita uma leitura inicial com 24 horas, para verificação da presença de turvação (provavelmente crescimento de bactérias ou fungos) ou massas de crescimento (*Mycoplasma*, especificamente).

Das maiores diluições dos meios, onde havia turvação ou presença de massa de crescimento, retirou-se, com uma pipeta, 0,1 ml de fundo do tubo, e, com a ponta da pipeta, foi-se estriando a superfície do ágar à medida que o meio líquido suspeito era despejado sobre a placa contendo o mesmo meio de cultivo na forma sólida.

As placas inoculadas ficaram de 7 a 21 dias incubadas a 37°C, em estufa bacteriológica, e em ambiente com $\pm 5\%$ de CO_2 e umidade controlada. Aos 7, 14 e 21 dias de incubação, a lata foi aberta, e as placas, observadas ao microscópio para se verificar a presença de colônias com morfologia semelhante às de *Mycoplasma* sp. Ao incubar novamente as placas, observaram-se as mesmas exigências quanto à vela e ao algodão.

As colônias de *Mycoplasma* sp. se apresentam de aspecto claro, com o centro mais escuro (por crescerem para dentro do ágar), o que lhe confere o aspecto de um "ovo frito". Por crescerem para dentro do ágar, elas não são removidas quando raspadas com a alça de platina (utilizada normalmente para repique de colônias bacterianas).

Toda colônia que apresentou essas características foi então removida da placa, fazendo-se um corte no ágar (com a alça de platina) e retirando-se um cubinho contendo a colônia suspeita. Este cubinho foi colocado no mesmo meio de cultivo, porém na forma líquida, incubado a 37°C, por sete dias, sendo observado diariamente.

Após sete dias de incubação, foi retirado 0,1 ml e semeado em outra placa, do meio sólido específico, além de semeadura em meios bacteriológicos comuns (ágar sangue e ágar eosina - azul de metileno), para verificação da presença de bactérias contaminantes.

Essa nova placa foi incubada sob as mesmas condições que a placa inicial, sendo verificada a presença de colônias típicas aos 7, 14 e 21 dias de incubação.

TABELA 1. Espécies de *Mycoplasma* comumente encontradas em hospedeiros bovinos, e suas principais características.

Espécie	Utilização de glicose	Redução de tetrazólio	Exigência em estero	Exigência em uréia
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	+	+	-	-
<i>M. bovirhinis</i>	+	+	+	-
<i>M. bovis genitalium</i>	-	+	+	-
<i>M. dispar</i>	+	+	+	-
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i>	+	+	+	-
<i>M. arginini</i>	-	-	+	-
<i>M. bovis</i>	+	+	+	-
<i>Ureaplasma</i> (T-stain)	-	-	+	+

Fonte: LBA/PESAGRO-RIO.

A temperatura de incubação de 37°C, em estufa bacteriológica, foi mantida durante todos os 21 dias de observação. Toda vez que a lata foi aberta para observação das placas, ao ser novamente fechada, procedia-se do mesmo modo inicial, colocando-se a vela e o algodão umedecido. Para manter as placas com a umidade adequada, durante todo o período de incubação, as placas foram colocadas invertidas, com o ágar na parte inferior.

Confirmação da identidade.

A confirmação da identidade foi feita após três subculturas consecutivas, em meios líquidos e meios sólidos, onde se encontrou turvação ou presença de massa de crescimento (em meio líquido), aliada à existência de colônias com o formato de "ovo frito" (em meio sólido), que não saíam do ágar ao serem raspadas com alça de platina.

O não crescimento de colônias nas placas de ágar sangue e de ágar cosina-azul de metileno indicou que as colônias isoladas nos meios de cultivo, próprias para *Mycoplasma*, não eram de bactérias contaminantes.

RESULTADOS

A análise dos 235 materiais trabalhados no decorrer da pesquisa resultou no diagnóstico de 16 casos de micoplasmose, sendo 12 confirmados por achados histopatológicos característicos da enfermidade.

Com estes resultados, pode-se afirmar que, dos seis meios de cultivo utilizados, os que apresentaram maior eficiência foram os meios 4 e 6. Todos os *Mycoplasmas* isolados cresceram nestes dois meios, tanto no isolamento quanto em subculturas, enquanto poucos cresceram nos outros meios e, irregularmente, em um ou dois diferentes meios.

O meio 4 teve a vantagem de apresentar um indicador, o vermelho de fenol, que demonstra na viragem de coloração a modificação do pH do meio de cultivo, indicando assim o crescimento de bactérias utilizadoras de açúcar.

O meio 6, por ser o mais rico de todos, permitiu o crescimento mais rápido de *Mycoplasma*, quando este estava presente no material trabalhado.

Estes dois meios de cultivo (4 e 6), por serem os meios mais ricos, ao mesmo tempo que permitiram o crescimento de *Mycoplasma*, também deram oportunidade a que outras bactérias contaminantes se desenvolvessem.

As diluições mais altas se apresentaram como as melhores para o isolamento, cultura e subcultura

dos materiais, uma vez que levavam a menor probabilidade de desenvolvimento de bactérias contaminantes pela concentração proporcionalmente maior dos inibidores existentes no meio.

A cultura e subcultura, intercalando-se meios sólidos e meios líquidos, foi fundamental para o crescimento das colônias de *Mycoplasma*. Da mesma maneira, facilitaram o processo de confirmação da identidade do microorganismo.

A incubação em ambiente com CO₂ e umidade controlada foi de importância vital no isolamento e manutenção da cultura. A colocação das placas invertidas, na estufa, deixando o ágar na parte superior, também foi benéfica para a manutenção da umidade do meio.

O não-crescimento de *Mycoplasmas* no meio contendo uréia sugere que nesta pesquisa nenhum representante do gênero *Ureaplasma* foi isolado.

As diferentes exigências nutricionais de *Mycoplasma* spp. (Tabela 1) podem esclarecer o porquê do isolamento de organismos em apenas alguns meios.

Nesta pesquisa, as espécies de *Mycoplasma* isoladas não puderam ser determinadas, por não se dispor, no Brasil, dos anti-soros específicos necessários para o teste da inibição do crescimento.

DISCUSSÃO

O isolamento e o cultivo de *Mycoplasma* spp. requerem cuidados que vão desde a coleta do material, preparo e escolha dos meios de cultivo, temperatura e modo de incubação, até a habilidade de percepção, ao microscópio, de colônias com a morfologia típica, preconizada para a identificação do microorganismo.

A coleta do material em tempo hábil e de forma correta e a remessa destes para o laboratório nas condições de conservação já mencionadas são os primeiros passos para o sucesso da diagnose.

Pode-se usar, ainda, para auxiliar na identificação, a coloração de Diene, feita nas placas de cultivo, onde as colônias de *Mycoplasma* ficam impregnadas de um azul intenso, enquanto as de outras bactérias perdem a coloração, que se difunde pelo ágar (Eichwald et al. 1973).

A sorologia também é prática utilizada em diversos países para detecção da Micoplasmose em

bovinos (Hájková & Jurmanová 1983), onde há possibilidade de adquirir os antígenos e os anti-soros marcados, sendo muito utilizada no estudo da micoplasmose humana (Clyde 1964).

Por não se dispor de anti-soros específicos, não foi possível a classificação dos *Mycoplasmas* isolados em espécies. Como esta classificação não pode ser feita em relação à morfologia das colônias, já que uma mesma espécie pode apresentar colônias grandes e pequenas e visto que existem infecções onde diferentes espécies de *Mycoplasmas* acometem um mesmo animal, os isolamentos foram considerados como sendo *Mycoplasma* sp.

Os resultados alcançados no cultivo e isolamento de *Mycoplasma* devem estar sempre associados a achados e lesões histopatológicas, que possam responsabilizar o *Mycoplasma* isolado como causador da enfermidade, já que existem representantes deste grupo de microorganismos tidos como saprófitas.

A procura de uma metodologia prática, eficiente e adaptada às condições econômicas e estrutura física dos laboratórios de diagnóstico é necessária, dado o número crescente de óbitos em bovinos com sintomatologia de afecções pulmonares não identificadas, diagnosticados no estado do Rio de Janeiro.

Este artigo científico teve por objetivo descrever os meios de cultivo que poderão ser utilizados na tentativa de isolamento de *Mycoplasma* de pulmões e traquéias de bovinos. As diferentes técnicas para classificação das espécies de *Mycoplasma* não foram mencionadas por serem extensas e fugirem ao propósito deste trabalho.

O trabalho apresentado, pioneiro no Estado, foi exaustivo, realizado durante quatro anos de pesquisa e, embora fornecendo resultados úteis para o diagnóstico da micoplasmose bovina, não é definitivo, devendo ser aprimorado para melhor auxiliar no controle e combate da enfermidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Collaborating Centre for Animal Mycoplasma, na Dinamarca, na pessoa do Dr. E. Freundt, que gentilmente remeteu amostras liofilizadas de *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma dispar* e *Acholeplasma laidlawii*, para que se testassem os meios empregados e houvesse maior familiarização com o microorganismo pesquisado, além da orientação técnica prestada durante o decorrer dos trabalhos.

REFERÊNCIAS

- ALUOTTO, B.B.; WITTLER, R.G.; WILLIAMS, C.O.; FABER, J.E. Standardized bacteriologic techniques for the characterization of *Mycoplasma* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 20(1):35-58, 1970.
- CLYDE JUNIOR, W.A. *Mycoplasma* species identification based upon growth inhibition by specific antisera. *J. Immunol.*, 92:958-65, 1964.
- EICHWALD, C.; ILLNER, F.; TROLLDENIER, H. *Micoplasmosis de los animales* Zaragoza, Acribia, 1973. 291p.
- ERNO, H. & STIPKOVITS, L. Bovine Mycoplasmas: cultural and biochemical studies. *Acta Vet. Scand.*, 14:436-63, 1973.
- HÁJKOVÁ, M. & JURMANOVÁ, K. Evaluation of serological tests for the detection of bovine *Mycoplasma*. *Arch. Exp. Veterinarmed.*, 37(3):405-8, 1983.
- MARTIN, J.; BOCKLISCH, H.; PFUTZNER, H.; ZEPEZAUER, V. Studies of mycoplasmas infections of calf. 3. Histological pattern of pneumonia caused by *Mycoplasma bovis*. *Arch. Exp. Veterinarmed.*, 37(3):499-507, 1983.
- OGATA, M.; OHTA, T.; OBARA, A.; PAN, I.Z. Investigation on growth media for *Mycoplasma*: Evaluation of infusions, peptones, sera, yeast extracts and other supplements. *Jap. J. Vet. Sci.*, 29:259-71, 1967.
- RAZIN, S. The mycoplasmas. *Microbiol. Rev.*, 42(2): 414-70, 1978.
- RUHNKE, H.L. & DREUMEL, A.A. van. The isolation of T-mycoplasma from pneumonic lungs of a calf. *Can. J. Comp. Med.*, 36(3):317-8, 1972.