

# AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA SENSIBILIDADE DA *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* FRENTE A DIFERENTES TIPOS DE ANTISSEPTICOS E DESINFETANTES E DETERMINAÇÃO DE SUA CURVA DE CRESCIMENTO

L.B. Santiago<sup>1</sup>, F.S.F. Alves<sup>2</sup>, R.R. Pinheiro<sup>2</sup>, V.W.S. dos Santos<sup>1</sup>,  
A.S. Rodrigues<sup>3</sup>, L. Chapaval<sup>2</sup>, I.F. de Brito<sup>1</sup>, F.G.C. de Sousa<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Vale do Acaraú, Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Av. da Universidade, 850, CEP 62040-370, Sobral, CE, Brasil. E-mail: lauanabs@hotmail.com

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito *in vitro* de antissépticos e desinfetantes contra a *Corynebacterium pseudotuberculosis* e descrever a curva de crescimento deste micro-organismo em caldo de infusão de cérebro e coração adicionado de 0,1% de Tween 80 (BHI + T), ao longo de 48 horas. Foram avaliados tintura de iodo a 10%, hipoclorito de sódio a 2,5%, permanganato de potássio a 5%, sabonete líquido antisséptico Aseptol® e álcool etílico absoluto (99,8%), por meio da metodologia da disco-difusão. Um swab estéril foi imerso na suspensão bacteriana produzida e semeado em placa de ágar Mueller-Hinton. Discos estéreis foram embebidos em cada solução a ser testada e distribuídos na superfície do ágar. Os resultados foram obtidos de acordo com o diâmetro do halo produzido ao redor dos discos. Para obtenção da curva de crescimento, colônias isoladas do micro-organismo foram inoculadas em frasco contendo BHI + T. A cada quatro horas, 2 mL eram retirados para medição da massa celular em espectrofotômetro e 1 mL para realização das diluições seriadas, plaqueamento em ágar sangue e contagem de células viáveis. Observou-se que, para a obtenção de uma concentração máxima de *C. pseudotuberculosis*, próxima a  $1.200 \times 10^5$  células viáveis/mL, deve-se manter o inóculo sob incubação adequada por um período de 28 a 40 horas. Quanto à prova de sensibilidade, verificou-se que a tintura de iodo a 10%, seguida pelo hipoclorito de sódio a 2,5% e permanganato de potássio a 5%, foram os antissépticos e desinfetantes com maior poder bactericida *in vitro* contra a *C. pseudotuberculosis*.

PALAVRAS-CHAVE: Antibiograma, bactericida, células viáveis, linfadenite caseosa, tratamento.

## ABSTRACT

IN VITRO EVALUATION OF THE SUSCEPTIBILITY OF *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* TO DIFFERENT KINDS OF ANTISEPTICS AND DISINFECTANTS, AND THE DETERMINATION OF ITS GROWTH CURVE. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* effect of antiseptics and disinfectants against *Corynebacterium pseudotuberculosis*, and to define the growth curve of this microorganism inoculated in brain heart infusion broth plus 0.1% of Tween 80 (BHI + T), for 48 hours incubation. For the susceptibility test, evaluations were made using 10% iodine, 2.5% sodium hypochlorite, 5% potassium permanganate, Aseptol® liquid soap, and absolute ethyl alcohol (99.8%), by way of the disc-diffusion method. A sterile swab was immersed in a bacterial suspension and plated in Mueller-Hinton agar. Sterile discs were immersed in each solution to be tested and distributed on the agar surface. The results were obtained according to the inhibition circle diameter formed around the disc. For the growth curve determination, colonies were inoculated in a bottle containing BHI + T. Every 4 hours, 2 mL was withdrawn to evaluate the cell mass in a spectrophotometer, and 1 mL was taken to perform serial dilutions, blood agar base plating and counting of viable cells. It was observed that in order to reach the maximum concentration of *C. pseudotuberculosis*, close to  $1,200 \times 10^5$  viable cells/mL, the inoculum must be maintained at appropriate incubation for a period of 28-40 hours. The sensibility test indicated

<sup>2</sup>Embrapa Caprinos e Ovinos, Departamento de Sanidade Animal, Laboratório de Bacteriologia e de Proteoma, Sobral, CE, Brasil.

<sup>3</sup>Instituto Superior de Teologia Aplicada, Departamento de Pós Graduação, Sobral, CE, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Areia, PB, Brasil.

that 10% iodine, followed by 2.5% sodium hypochlorite and 5% potassium permanganate were the antiseptics and disinfectants with the most *in vitro* bactericidal effect against *C. pseudotuberculosis*.

KEY WORDS: Antibigram, bactericidal, caseous lymphadenitis, treatment, viable cells.

## INTRODUÇÃO

A Linfadenite Caseosa é uma doença infecto-contagiosa de ocorrência mundial, que acomete caprinos e ovinos, caracterizada pela formação de abscessos em gânglios linfáticos superficiais, podendo também acometer órgãos e linfonodos internos. Apresenta alta incidência em rebanhos caprinos da região Nordeste, a qual detém o maior contingente de animais (PINHEIRO *et al.*, 2000). É uma enfermidade crônica e debilitante causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis*, responsável por causar grandes perdas econômicas na caprinocultura e ovinocultura (ALVES *et al.*, 2007). O *C. pseudotuberculosis* caracteriza-se como um bacilo gram-positivo curto e irregular, que pode também apresentar aspecto cocoide, mostrando-se isolado ou formando agrupamentos irregulares ou em palicada. São imóveis, anaeróbios facultativos, fermentativos e não formam esporos (BATEY, 1986).

As perdas econômicas causadas pela infecção dos rebanhos ovinos e caprinos com a Linfadenite Caseosa ocorrem por meio da diminuição da produção de leite e carne, da condenação de peles e carcaças em razão da presença de abscessos, da deficiência na reprodução e com custos com medicamentos e mão-de-obra para tratamentos dos abscessos. A forma visceral da doença é a mais grave e mais preocupante, visto que o diagnóstico clínico é muito difícil e ela pode levar à debilitação do animal, disseminação de abscessos no organismo, condenação de vísceras e carcaça e, até mesmo, morte de indivíduos. Pelo fato da produção de peles de ovinos e caprinos apresentar-se como um produto de alto valor no mercado nacional e internacional, ressalta-se a necessidade do controle da Linfadenite Caseosa, uma das principais causas de danos a essas peles devido aos abscessos (FIGUEIREDO *et al.*, 1982; ALVES, 1988).

A ocorrência de ferimentos na pele dos animais atua como a principal porta de entrada para o micro-organismo, presente no meio ambiente devido à ruptura de abscessos de animais infectados pela doença (NAIRN; ROBERTSON, 1974).

O principal aspecto relacionado ao controle desta enfermidade, portanto, está no isolamento imediato dos animais acometidos e na drenagem cirúrgica do abscesso, antes do seu rompimento natural, já que o micro-organismo é capaz de sobreviver e persistir no meio ambiente por um longo período de tempo, constituindo uma constante fonte de infecção para os animais (WILLIAMS, 1980). O

tratamento atualmente preconizado para a doença consiste na drenagem e cauterização química dos abscessos, utilizando-se solução de iodo a 10%, quando estes encontram-se em estágio avançado de evolução. Dado este fato, tal procedimento representa grandes riscos de contaminação ambiental, seja através da ruptura espontânea inesperada do abscesso ou pela simples exposição ao meio externo de um material altamente contaminado. A aplicação de solução de formol a 10% diretamente no linfonodo já foi avaliada e constatou-se a morte do *C. pseudotuberculosis* no local, apesar do micro-organismo permanecer viável em outros linfonodos e vísceras do animal (ALVES; PINHEIRO, 2003). Entretanto, diversos problemas e transtornos têm sido observados, com relação à utilização deste produto no abscesso, como o aparecimento de fibrose, evolução da necrose, destruição dos tecidos epitelial e muscular adjacentes e provável comprometimento do osso mais próximo (ALVES; PINHEIRO, 2003). Além disso, sabe-se que o formol apresenta efeitos teratogênico, mutagênico e carcinogênico em animais de laboratório, sendo também responsável por causar anomalias congênitas e outras reações adversas (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2003).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito *in vitro*, contra o *C. pseudotuberculosis*, de antissépticos e desinfetantes de baixa toxicidade ao organismo animal e com baixo teor residual na carcaça para, em estudos futuros, serem avaliados *in vivo* no controle da Linfadenite Caseosa, sendo aplicados diretamente nos linfonodos dos animais. Entretanto, a determinação *in vitro* da eficácia bactericida de tais produtos exige o conhecimento de algumas informações relacionadas ao *C. pseudotuberculosis*, que não se encontram disponíveis na literatura como, por exemplo, o número de células bacterianas viáveis existentes no meio de cultura, ao longo de um determinado período de crescimento. Com isso, objetivou-se também descrever a curva de crescimento do *C. pseudotuberculosis* inoculado em caldo de infusão de cérebro e coração adicionado de 0,1% de Tween 80, ao longo de 48 horas de incubação, através da contagem do número de células bacterianas viáveis e da medição da massa celular pela turbidimetria. A partir da análise da curva de crescimento deste micro-organismo será possível simplificar e facilitar o desenvolvimento de inúmeros protocolos de pesquisa relacionados ao *C. pseudotuberculosis*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostra bacteriana

O presente estudo foi realizado a partir de uma cepa regional de *C. pseudotuberculosis*, sendo que todas as análises foram desenvolvidas nos Laboratórios de Bacteriologia e de Proteoma da Embrapa Caprinos e Ovinos, localizada na Cidade de Sobral, CE. O material drenado do abscesso de um caprino suspeito para Linfadenite Caseosa foi plaqueado em ágar base enriquecido com 7% de sangue ovino e a placa mantida em estufa a 37° C por 48 horas. As colônias isoladas foram caracterizadas macroscopicamente, coradas pelo método de Gram e submetidas às provas da catalase, urease e fermentação de carboidratos, para identificação do agente etiológico.

### Determinação da curva de crescimento da *C. pseudotuberculosis*

Para determinação da curva de crescimento da *C. pseudotuberculosis*, a quantificação celular foi estimada através da avaliação da densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm, e posterior contagem em placas (TORTORA, 2005). Cinco colônias isoladas do micro-organismo foram, então, transferidas da placa de ágar sangue para um frasco Erlenmeyer contendo 75 mL de caldo de infusão de cérebro e coração adicionado de 0,1% de Tween 80 (BHI + T) e incubado em estufa a 37° C. Quatro horas após a inoculação do meio, 2 mL foram retirados para medição da massa celular em espectrofotômetro e 1 mL para realização das diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-9}$ ) em solução salina estéril (NaCl 0,95%), plaqueamento em ágar sangue e, após incubação a 37° C por 48 horas, contagem do número de células viáveis por mL. Esta etapa foi repetida sucessivamente, a cada quatro horas, ao longo das 48 horas de incubação a 37° C do meio inoculado. Um frasco contendo BHI + T estéril foi utilizado ao longo do experimento, como controle, para zerar o espectrofotômetro nos momentos de avaliação da densidade óptica. Para a montagem da curva do número de células viáveis por mL de meio de cultura foram utilizados os valores das menores diluições que possibilitaram sua contagem. Ao final do experimento, foi realizada a confirmação de pureza do micro-organismo no meio de cultura.

### Avaliação da sensibilidade *in vitro* do *C. pseudotuberculosis* frente aos antissépticos e desinfetantes

Para a determinação do perfil de sensibilidade do *C. pseudotuberculosis* foi utilizada a metodologia do antibiograma de disco-difusão descrita por BAUER *et*

*al.* (1966), seguindo as recomendações do NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (2002). Foram utilizadas placas de petri de 150 mm preenchidas com 70 mL ágar Mueller-Hinton incluído de 5% de sangue ovino. Foram transferidas cinco colônias de *C. pseudotuberculosis* de uma placa de ágar sangue para um tubo de ensaio contendo 2 mL de caldo BHI (brain heart infusion) incluído de 0,1% de Tween®, mantido sob incubação a 37° C, de forma a se obter um inóculo com uma concentração equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. O período de incubação do inóculo foi determinado pelos resultados obtidos neste estudo, por meio da curva de crescimento do *C. pseudotuberculosis*. Um swab estéril foi imerso na suspensão bacteriana produzida, com o cuidado de pressioná-lo contra as paredes do tubo para retirada do líquido em excesso, e semeado uniformemente, por estrias justapostas, nas placas de ágar Mueller-Hinton, em três direções e por toda a superfície do meio. Antes da inserção dos discos na placa, foram esperados 10 minutos para a secagem do inóculo semeado na placa. Foi avaliado o perfil de sensibilidade do *C. pseudotuberculosis* frente a cinco princípios ativos distintos de antissépticos e desinfetantes: tintura de iodo a 10%, hipoclorito de sódio a 2,5%, permanganato de potássio a 5%, sabonete líquido Aseptol®, e álcool etílico absoluto (99,8%). Discos estéreis de papel filtro, com 12,5 mm de diâmetro, foram embebidos em 75 µL de cada solução a ser testada e da solução controle (solução salina estéril, NaCl 0,95%) e mantidos em temperatura ambiente para secagem, durante um período de 10 minutos. Posteriormente, os discos foram distribuídos na superfície do ágar de maneira equidistante, com o auxílio de uma pinça estéril. Uma distância mínima de 24 mm foi mantida entre os centros dos discos na placa. Os resultados foram obtidos a partir da mensuração do diâmetro das zonas de inibição, onde observa-se a ausência total de crescimento bacteriano. Após a realização do testes, foi realizada a confirmação de pureza do micro-organismo no ágar.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o crescimento bacteriano em meio de cultura líquido, de maneira geral, as bactérias apresentam uma curva de crescimento padrão, quando este é expresso como o logaritmo do número de micro-organismos ao longo do tempo. Segundo KONEMAN *et al.* (2001), esta curva é composta por quatro fases de crescimento distintas: fase de arranque, fase exponencial de crescimento, fase estacionária e fase de declínio. A partir do momento no qual um micro-organismo é inoculado em um meio de cultura estéril, geralmente o crescimento não se inicia de imediato. Esta fase, conhecida como fase lag ou

de arranque, ocorre pela necessidade das células se adaptarem ao novo meio, até que possam dar início ao seu desenvolvimento (BROCK; BROCK, 1978). Já na fase logarítmica ou de crescimento exponencial, o número de células bacterianas aumenta em progressão geométrica na medida em que o tempo cresce em progressão aritmética. Na fase estacionária ou de equilíbrio, a contagem de micro-organismos viáveis permanece constante em seu valor máximo, já que o número de bactérias neoformadas é compensado pelo daquelas que começam a morrer. E, por último, segue a fase de declínio ou morte das bactérias (BIER, 1977; TORTORA, 2005).

Na Tabela 1 estão descritos os valores obtidos para densidade óptica e o número de células bacterianas viáveis existentes por mL de meio de cultura, ao longo de 48 horas de incubação. Na Figura 1, estão representadas as respectivas curvas de crescimento, com o número de células viáveis descrito em logaritmo na base 10.

Tabela 1 - Densidade óptica do meio de cultura e número de células viáveis por mL de *Corynebacterium pseudotuberculosis* inoculada em BHI + T, ao longo de 48 horas de incubação a 37° C.

Tempo (h)	Densidade óptica*	Nº de células viáveis (UFC/mL)
4	0,011	68 x 10 <sup>5</sup>
8	0,046	82 x 10 <sup>5</sup>
12	0,162	178 x 10 <sup>5</sup>
16	0,459	306 x 10 <sup>5</sup>
20	0,961	700 x 10 <sup>5</sup>
24	1,366	900 x 10 <sup>5</sup>
28	1,498	1.050 x 10 <sup>5</sup>
32	1,515	820 x 10 <sup>5</sup>
36	1,519	1.110 x 10 <sup>5</sup>
40	1,537	1.200 x 10 <sup>5</sup>
44	1,508	140 x 10 <sup>5</sup>
48	1,426	221 x 10 <sup>5</sup>

\*comprimento de onda de 600 nm.

A partir destes dados, observa-se que o *C. pseudotuberculosis* apresenta um crescimento relativamente lento em BHI + T, já que se aproxima de sua fase de equilíbrio, somente após 28 horas de crescimento. Depois de 40 horas de incubação, observa-se um grande declínio no número de células bacterianas viáveis. Assim, sugere-se que, para a obtenção de uma concentração máxima de *C. pseudotuberculosis* em meio BHI + T, próxima a 1.200 x 10<sup>5</sup> células viáveis por mL, deve-se manter o inóculo sob incubação adequada por um período

de 28 a 40 horas. A queda brusca deste valor é justificada pelo esgotamento de nutrientes do meio de cultura e pelo aumento dos produtos tóxicos provenientes do próprio metabolismo bacteriano (INSTITUTO..., 2009).

Além disso, nota-se que a avaliação da densidade óptica do meio de cultura pode ser considerada um método eficaz para estimar a quantidade de células viáveis de *C. pseudotuberculosis* em BHI + T, somente até 40 horas de crescimento, ou seja, até o final da fase estacionária, já que a turbidimetria não é capaz de realizar a discriminação entre as células vivas e as células mortas no meio de cultura (Tabela 1 e Fig. 1). A avaliação da densidade óptica é baseada no fato de as células microbianas dispersarem a luz, podendo assim, ser detectadas, por medição da absorbância em um espectrofotômetro (INSTITUTO, 2009). Consiste em um método bastante simples e útil de se realizar a estimativa relativa da massa celular bacteriana. A turbidez do meio de cultura está diretamente relacionada ao número e ao peso das células bacterianas presentes (BIER, 1977).

A partir da observação dos dados descritos na Figura 1, é possível obter, ao longo das primeiras 40 horas de crescimento do *C. pseudotuberculosis*, a correlação existente entre a turbidez do inóculo e o número de células microbianas viáveis existentes por mL de meio de cultura.

Por meio da inserção de uma linha de tendência com regressão polinomial na curva do número de células bacterianas viáveis/mL, utilizando-se o Microsoft® Office Excel® 2007, parte do Microsoft Office Enterprise 2007, torna-se possível formular uma equação de terceiro grau ( $R^2 = 0,809$ ) capaz de estimar a concentração do número de bactérias viáveis existentes em um determinado período de tempo, por mL de meio de cultura, sendo ela:

A estimativa da concentração de células viáveis de *C. pseudotuberculosis*, a partir da análise das curvas de crescimento obtidas neste estudo, favorece o desenvolvimento de estudos relacionados à Linfadenite Caseosa que exigem o conhecimento de tal informação, tornando sua execução mais prática e rápida.

Em conformidade com o NATIONAL... (2002), a realização de testes *in vitro* para a determinação do perfil de sensibilidade de micro-organismos requer a utilização de uma cultura bacteriana com concentração equivalente a 1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, relacionados à curva de crescimento do *C. pseudotuberculosis*, a obtenção da concentração desejada será realizada a partir da incubação do inóculo a 37° C por um período entre 28 e 40 horas.



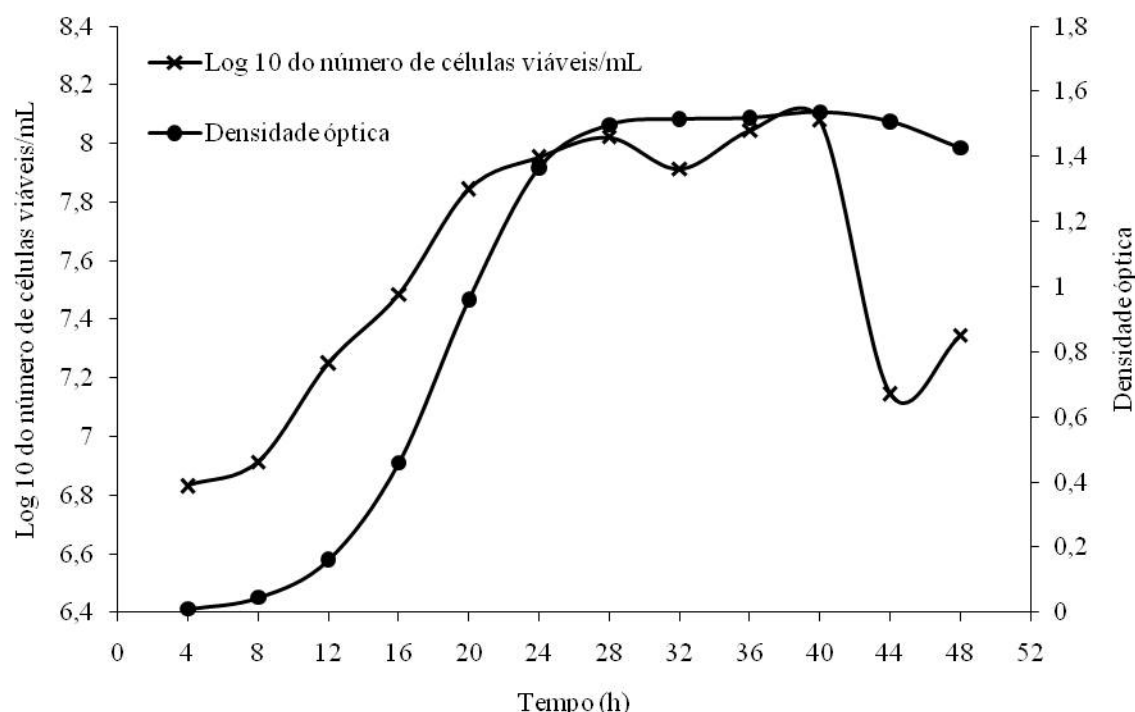


Fig. 1 - Curvas de crescimento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em meio BHI+T, em função dos valores obtidos para densidade óptica e do logaritmo na base 10 do número de células viáveis por mL, ao longo de 48 horas de incubação a 37° C.

Existem vários estudos na literatura que descrevem a curva de crescimento de diversos micro-organismos patogênicos, assim como avaliam os fatores externos que interferem no seu desenvolvimento (BUCHANAN *et al.*, 1993; BUCHANAN; BAGI, 1994; BOVILL *et al.*, 2000). Entretanto, ao se realizar uma busca na literatura, não foi encontrado nenhum tipo de trabalho que descrevesse, especificamente, a curva de crescimento do *C. pseudotuberculosis*, para uma possível comparação dos resultados obtidos neste experimento.

Os resultados do teste *in vitro* de formação das zonas de inibição pela técnica de disco-difusão estão dispostos na Tabela 2. Dentre os produtos analisados, observa-se que somente a tintura de iodo a 10%, o hipoclorito de sódio a 2,5% e o permanganato de potássio a 5% demonstraram atividade inibitória completa contra o *C. pseudotuberculosis*. O maior halo de inibição foi dado pela tintura de iodo a 10%, seguido pelo hipoclorito de sódio a 2,5% e, posteriormente, pelo permanganato de potássio a 5%. Um fato interessante observado neste estudo foi a formação

de outro tipo de halo ao redor de alguns discos, onde não se observava a inibição completa de crescimento bacteriano, mas sim, uma redução na quantidade de colônias de bactérias, quando comparada ao restante da placa. Este halo foi nomeado neste trabalho como zona de redução de crescimento bacteriano e seus valores também estão descritos na Tabela 2. Vale ressaltar que as colônias presentes no halo de redução também foram confirmadas como *C. pseudotuberculosis*. O permanganato de potássio a 5% apresentou, além da zona de inibição completa, uma zona de redução de crescimento bacteriano. Em relação ao Aseptol® e ao álcool etílico absoluto não foi observada formação da zona de inibição completa e sim, apenas da redução de crescimento. Portanto, estes dois produtos são considerados como ineficazes no controle do *C. pseudotuberculosis*. Vale ressaltar que os testes de sensibilidade *in vitro* realizados pelo método de disco-difusão sofrem interferência de alguns fatores incontrolláveis que podem ser responsáveis por gerar resultados variáveis como, por exemplo, o coeficiente de difusão de cada produto analisado (OSBALDISTON, 1973).

Tabela 2 - Perfil de sensibilidade do *Corynebacterium pseudotuberculosis* frente a tintura de iodo a 10%, hipoclorito de sódio a 2,5%, permanganato de potássio a 5%, Aseptol® e álcool etílico absoluto (99,8%).

Produto	Zona de inibição completa (mm)	Zona de redução de crescimento (mm)
Tintura de iodo 10%	63	0
Hipoclorito de sódio 2,5%	21	0
Permanganato de potássio 5%	15	23
Aseptol®	0	33
Álcool etílico absoluto (99,8%)	0	15

A determinação da tintura de iodo e do hipoclorito de sódio como os produtos mais eficazes, dentre os testados neste estudo contra o *C. pseudotuberculosis*, encontra-se de acordo com os resultados obtidos por PEDRINI; MARGATHO (2003). Entretanto, estes autores também avaliaram a atividade inibitória da clorexidina e do cloreto de benzalcônio, sendo que este último, em concentração de 1%, foi o produto que obteve maior efeito bactericida contra o *Corynebacterium* sp. Vale ressaltar que no trabalho citado, não foi avaliada a tintura de iodo na concentração de 10% e sim de 2%. Este fato explica a discrepância observada entre os halos de inibição produzidos pela tintura de iodo nos dois estudos. PEDRINI; MARGATHO (2003) descreveram um halo de 21 mm de diâmetro produzido pela tintura de iodo a 2%. O mesmo não foi observado com relação à solução de hipoclorito de sódio, já que os mesmos autores avaliaram o produto em uma concentração de 2%, semelhante à avaliada neste trabalho. Neste caso, foi relatado um halo de 18,5 mm de diâmetro.

Os compostos contendo iodo são reconhecidos como potentes germicidas, sendo capazes de destruir uma larga variedade de micro-organismos, tais como bactérias, fungos, leveduras, protozoários, vírus e até mesmo esporos. Possuem um alto poder de penetração ao reagir com o substrato proteico da célula bacteriana (HUBER, 1983). Entretanto, a utilização da tintura de iodo como antisséptico possui algumas desvantagens, como irritação da derme e elevada afinidade por matéria orgânica, fazendo com que seu potencial oxidante e, conseqüentemente, seu poder germicida seja reduzido nestes casos (BLATT; MOLONEY, 1961; KAUL; JEWETT, 1981).

O cloro e os derivados clorados também são caracterizados como bons germicidas, ao liberar, em solução aquosa, o ácido hipocloroso, que apresenta capacidade de penetrar na célula bacteriana e destruí-la (ANDRADE, 1988). O hipoclorito de sódio a 5% atua como um excelente desinfetante de equipamentos e utensílios, não devendo ser utilizado como antisséptico por ser extremamente irritante para os tecidos vivos. A ação bactericida do cloro é inativada em meio alcalino e na presença de matéria orgânica (MORIYA; MÓDENA, 2008).

O permanganato de potássio é um agente de oxidação forte possuindo propriedades desinfetantes e desodorizantes. Os íons resultantes da redução do permanganato exercem um efeito adstringente. Apesar de ter efeito bactericida *in vitro*, o seu valor clínico como tal é minimizado pela sua rápida redução na presença de fluidos corporais (HUBER, 1983; MORIYA; MÓDENA, 2008).

A partir daí, observa-se que os três produtos que demonstraram poder bactericida *in vitro* contra o *C. pseudotuberculosis* podem ter seu efeito reduzido na presença de matéria orgânica como sangue, pus ou fezes. Além disso, alguns fatores externos

incontroláveis podem interferir substancialmente nos resultados do teste, gerando certa variação nos dados. Com isso, torna-se evidente a importância do desenvolvimento de análises *in vivo* para avaliar a aplicação de antissépticos e desinfetantes diretamente no linfonodo, para o controle da Linfadenite Caseosa.

## CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste estudo a partir da descrição da curva de crescimento do *C. pseudotuberculosis* contribuem fundamentalmente para simplificar e facilitar o desenvolvimento de muitos protocolos de pesquisa relacionados à Linfadenite Caseosa. Com relação a sua sensibilidade *in vitro*, a tintura de iodo a 10% foi responsável pela formação do maior halo de inibição, seguida pelo hipoclorito de sódio a 2,5% e, posteriormente, pelo permanganato de potássio a 5%. Apesar do Aseptol® e do álcool absoluto não terem apresentado efeito considerável neste estudo, outros experimentos devem ser realizados para avaliar a sensibilidade de diferentes cepas de *C. pseudotuberculosis* frente a esses produtos. Além disso, o desenvolvimento de um experimento *in vivo* faz-se necessário para a confirmação da eficácia do novo tratamento sugerido para a Linfadenite Caseosa, já que os testes de sensibilidade *in vitro* podem sofrer ação de fatores externos incontroláveis e os produtos avaliados atuarem de forma diferente na presença de matéria orgânica.

## AGRADECIMENTOS

Ao laboratorista da Embrapa Caprinos e Ovinos, José Maria Martins, pelo excelente trabalho desenvolvido e fundamental contribuição neste estudo. Esta pesquisa foi financiada pela EMBRAPA Caprinos e Ovinos e pela Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa (FUNCAP).

## REFERÊNCIAS

- ALVES, F.S.F. *Immunokinetics of goats with C. ovis vaccination and infection*. 1988. 68f. Dissertação (Mestrado em Patologia Comparada) - University of California, Davis, 1988.
- ALVES, F.S.F.; PINHEIRO, R.R. Controle da Linfadenite Caseosa pela aplicação de solução de formol no abscesso. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.25, n.3, p.130-132, 2003.
- ALVES, F.S.F.; SANTIAGO, L.B.; PINHEIRO, R.R. *Linfadenite Caseosa: o estado da arte*. Sobral: EMBRAPA Caprinos e Ovinos, 2007. 60p. (EMBRAPA-CNPC. Documentos, 74).

- ANDRADE, N.J. O uso de compostos clorados na indústria de laticínios. *Informe Agropecuário*, v.13, n.155, p.48-52, 1988.
- BATEY, R.G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Australian Veterinary Journal*, v.63, n.9, p.269-272, 1986.
- BAUER, W.; KIRBY, W.M.; SHEERRIS, J.C.; TURCCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, v.45, p.493-496, 1966.
- BIER, O. *Bacteriologia e microbiologia*. 18.ed. São Paulo: Melhoramentos, 1977. 1056p.
- BLATT, R.; MOLONEY, J.V. Evaluation of the iodophor compounds as surgical germicides. *Surgery Gynecologic & Obstetrician*, v.113, n.6, p. 699-704, 1961.
- BOVILL, R.; BEW, J.; COOK, N.; D'AGOSTINO, M.; WILKINSON, N.; BARANYI, J. Predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. *International Journal of Food Microbiology*, v.59, p.157-165, 2000.
- BROCK, T.D.; BROCK, K.M. Basic microbiology with applications. 2.ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1978. 608p.
- BUCHANAN, R.L.; SMITH, J.L.; McCOLGAN, C.; MARMER, B.S.; GOLDEN, M.; DELL, B. Response surface models for the effects of temperature, pH, sodium chloride, and sodium nitrite on the aerobic and anaerobic growth of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Safety*, v.13, p.159-175, 1993.
- BUCHANAN, R.L.; BAGI, L.K. Expansion of response surface models for the growth of *Escherichia coli* 0157:H7 to include sodium nitrite as a variable. *International Journal of Food Microbiology*, v.23, p.317-332, 1994.
- FIGUEIREDO, E.A.P.; SHELTON, M.; PANT, K.P. Goats skins. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, 3., 1982, Tucson, EUA. Proceedings. Scottsdale: Dairy Goat Journal, 1982. p.488-490.
- HUBER, W.G. Antissépticos e desinfetantes. In: JONES, L.M.; BOOTH, N.H.; McDONALD, L.E. (Ed.). *Farmacologia e terapêutica em veterinária*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983.
- INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DO SUL. Portugal. Manual prático de microbiologia Capítulo 9. Disponível em: <[http://www.egasmoniz.edu.pt/ficheios/alunos/anos\\_antiores/microbiologia/pratica/CAPITULO09.pdf](http://www.egasmoniz.edu.pt/ficheios/alunos/anos_antiores/microbiologia/pratica/CAPITULO09.pdf)>. Acesso em: 15 fev. 2009.
- KAUL, A.F.; JEWETT, J.F. Agents and techniques for disinfection of the skin. *Surgery, Gynecology & Obstetrics*, v.152, p.677-685, 1981.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C.J. *Diagnóstico microbiológico*. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora Medsi, 2001. 1465p.
- MORIYA, T.; MÓDENA, J.L.P. Asepsy and antiseptic: technics of sterilization. *Medicina*, v.41, n.3, p.265-273, 2008.
- NAIRN, M.E.; ROBERTSON, J.P. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep: role of skin lesions and dipping fluid. *Australian Veterinary Journal*, v.50, n.12, p.537-342, 1974.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, Wayne: NCCLS, 2002. (NCCLS Document v.22, n.1).
- OSBALDISTON, G.W. *Laboratory procedures in clinical veterinary bacteriology*. Baltimore: University Park Press, 1973. 265p.
- PEDRINI, S.C.B.; MARGATHO, L.F.F. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.70, n.4, p.391-395, 2003.
- PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F.; HADDAD, J.P.A.; ANDRIOLI, A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, n.5, p.534-543, 2000.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. Comissão de Segurança-Cbiot. Produtos químicos de uso frequente no Cbiot. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/cbiot/CS/CS\\_Cbiot08.htm](http://www.ufrgs.br/cbiot/CS/CS_Cbiot08.htm)>. Acesso em: 22 out. 2003.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. 8.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 894p.
- WILLIAMS, C.S.F. Differential diagnosis of caseous lymphadenitis in the goat. *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician*, v.75, n.7, p.1165-1169, 1980.

Recebido em 15/10/09  
Aceito em 29/10/10

