

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA
Diretor: Prof. Dr. Paulo M. G. de Lacerda Júnior

RESULTADOS PRELIMINARES DE INVESTIGAÇÕES
SÓBRE A OCORRÊNCIA DE *M. TUBERCULOSIS* RE-
SISTENTES À ESTREPTOMICINA E HIDRAZIDA EM
AMOSTRAS ISOLADAS DE ANIMAIS

(PRELIMINARY RESULTS OF INVESTIGATIONS ON THE OCCURRENCE
OF STREPTOMYCIN AND HYDRAZID RESISTANT STRAINS OF
M. TUBERCULOSIS FROM ANIMAL SOURCES)

D. C. DE FREITAS
Assistente

LUIZ ZANI NETO
Assistente

É fato consagrado clinica e experimentalmente que o bacilo de Koch adquire resistência aos antibióticos utilizados na terapêutica da tuberculose e que êsse fenômeno de adaptação atinge inclusive o grau de dependência (LENERT e HOBBY, 1949), HOBBY e LENERT, 1952). DOANE e BORGES (1951) fizeram uma interessante verificação: uma amostra por êles isolada, que se comportava como estreptomicino-dependente, foi incapaz de produzir infecção evolutiva em cobaias, tanto tratadas com estreptomicina como em testemunhas não tratadas. Dessa verificação ressaltou que o germe dependente tem sua virulência muito diminuída ou mesmo abolida para a cobaia. Os mesmos autores conseguiram, ainda, reverter êsse estado de dependência da amostra ao grau de sensibilidade à estreptomicina e — fato importante — os bacilos agora sensíveis eram virulentos para cobaias e estas, por sua vez, respondiam favoravelmente ao tratamento pelo antibiótico.

A possibilidade da transmissão de bacilos resistentes pode também ser admitida, à vista da observação de TINNIE e HENDERSON (1950), os quais isolaram de um recém-nascido, uma amostra estreptomicino-resistente, adquirida, segundo os autores, da própria mãe, que não havia recebido qualquer tratamento por essa substância.

VENNESLAND e col. (1947) demonstraram a ocorrência de variantes estreptomicino-resistentes na clássica amostra de laboratório H₃₇Rv e chamam a atenção dêsse fato para a explicação do mecanismo da aquisição da resistência *in vivo*.

A resistência à hidrazida também tem sido observada conforme, dentre outras, as comunicações de BUCK e SCHNITZER (1952), HOBBY e

LENERT (1952), STEENKEN e col. (1952) e ROSEMBERG, BRANDI e CARRIJO (1953). Estes últimos, embora hajam isolado de doentes não tratados com hidrazida, algumas amostras capazes de crescer em presença de pequenas quantidades dessa substância (0,01 e 0,1 mcg), não consideram esse fato como expressão da frequência comum de bacilos naturalmente hidrazido-resistentes, conforme opinião de outros autores.

Esses fatos nos levaram a investigar o problema no campo veterinário, pois algumas experiências de tratamento têm sido realizadas em animais (FRANCO MONTI, 1952); BALDELLI e BADIALI (1952); MORETTI e PEDINI (1952). Julgamos interessante verificar qual o estado atual da sensibilidade de amostras isoladas de animais, em nosso meio, o que nos permitirá acompanhar a evolução da questão.

Nosso trabalho refere-se ao estudo de 38 amostras isoladas de animais tuberculosos não submetidos a tratamento pela estreptomicina ou hidrazida.

MATERIAL E MÉTODO

Trabalhámos com 38 amostras isoladas de animais não submetidos a tratamento por estreptomicina ou hidrazida, sendo 27 de origem bovina e 11 de origem canina. O material de bovinos foi obtido, na maior parte, de gânglios retirados de animais abatidos em frigoríficos, cujas carcaças foram condenadas (23 amostras); 4 amostras foram isoladas de processos tuberculosos de bovinos necropsiados. As amostras provenientes de cães foram obtidas de casos apresentados ao ambulatório (geralmente quadros de ascite ou pleuriz com hidrotórax) que evoluíram para a morte ou o sacrifício do animal foi aconselhado pelo clínico.

O isolamento do *M. tuberculosis* foi obtido em meio de Löwenstein-Jensen com e sem glicerina, após tratamento do material com hidróxido de sódio, segundo a técnica de JOBS e LESTER (1942).

Enquanto as amostras de origem bovina só se desenvolveram no meio sem glicerina, as de origem canina cresceram melhor em meio glicerinado, o que sugere serem do tipo humano os bacilos isolados de cães.

Para a verificação do comportamento das amostras frente à estreptomicina e hidrazida, trabalhamos segundo a técnica adotada no Instituto Clemente Ferreira (*), da Divisão do Serviço de Tuberculose de

* Agradecemos nas pessoas dos Drs. L. N. Carrijo e Fausto Salemi, a colaboração que recebemos dessa Instituição.

São Paulo, descrita por BRANDI (1951) para a estreptomina e adaptada para a hidrazida, por ROSEMBERG e col. (1953). Tal técnica, em linhas gerais consiste em semear as amostras em tubos de meio ATS (batata — gema de ovo — glicerina — verde de malaquita, fórmula recomendada pela American Trudeau Society on the Evaluation of Laboratory Procedures) adicionados de quantidades crescentes das referidas substâncias.

A utilização de meios sólidos para provas dessa natureza tem, entre outras, a vantagem de fornecer uma idéia da relativa proporção da população antibiótico-resistente, uma vez que em geral, as culturas se constituem de uma mistura de bactérias sensíveis e resistentes (PASSOS e col., 1952).

Para o exame das amostras tipo bovino trabalhamos com ATS sem glicerina.

As quantidades de antibiótico adicionadas por cm³ de meio base foram: 10-50 e 500 mcg para a estreptomina, e 0,01-0,1-0,5-1,0-10 e 100 mcg para a hidrazida. As provas foram feitas em duplicata, com tubos testemunhas sem antibiótico.

O "inoculum" consistiu em 5 gotas de uma suspensão de bacilos em água destilada, espalhadas na superfície do meio de cultura. As séries foram incubadas a 37°C até que as culturas mostrassem crescimento. O prazo máximo que conservamos as culturas incubadas foi de 60 dias.

RESULTADOS

Apresentamos na tabela os resultados obtidos com as amostras examinadas.

DISCUSSÃO

Embora não possamos afirmar, pelo número de amostras examinadas, a inexistência de bacilos de Koch, naturalmente resistentes, em bovinos não tratados, parece-nos que esse fenômeno não deva ser comum. O fato de havermos encontrado em cães, uma amostra parcialmente resistente à estreptomina (C87) e outra resistente à estreptomina e hidrazida (C359), ao lado de 9 amostras sensíveis, leva-nos a pensar mais numa contaminação desses animais por bacilos já resistentes, possivelmente de fonte humana, a admitir a natural resistência dessas amostras às concentrações relativamente grandes de estreptomina e hidrazida, empregadas na pesquisa.

Amostras		Löwenstein		Estreptomicina (mcg)				Hidrazina (mcg)						
N.º de ordem	N.º de registro	G	SG	0	10	50	500	0	0,01	0,1	0,5	1	10	100
1	B1	o	++	+-	o	o	o	++	o	o	o	o	o	o
2	B2	o	++	++	o	o	o	++	o	o	o	o	o	o
3	B3	o	++	++	o	o	o	++	o	o	o	o	o	o
4	B4	o	++	++	o	o	o	+-	o	o	o	o	o	o
5	B5	o	++	++	o	o	o	++	o	o	o	o	o	o
6	B6	o	+	-	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o
7	B7	o	+	+	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o
8	B8	o	++	+	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o
9	B9	o	++	+	o	o	o	++	o	o	o	o	o	o
10	B10	o	++	+	o	o	o	++	+	o	o	o	o	o
11	C143	++	-	+	o	o	o	++	+	o	o	o	o	o
12	C359	++	+	++	++	+	+	++	++	++	++	++	+	+
13	B148	o	++	++	o	o	o	++	o	o	o	o	o	o
14	B163	o	++	++	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o
15	C170	++	-	++	o	o	o	++	+	o	o	o	o	o
16	B180	o	+	+	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o
17	B11	o	+	+	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o
18	B12	o	++	+	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o
19	B13	o	++	+	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o
20	B14	o	++	+	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o
21	C218	++	+	+	+	o	o	+	+	o	o	o	o	o
22	B15	o	++	+	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o
23	B16	o	++	+	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o
24	B17	o	++	+	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o
25	C261	++	+	+	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o
26	B18	o	++	+	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o
27	B19	o	++	+	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o
28	C276	++	+	+	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o
29	C294	++	+	+	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o
30	B20	o	++	+	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o
31	B21	o	++	+	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o
32	C344	++	+	+	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o
33	B440	o	++	+	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o
34	B22	o	++	+	+	o	o	+	o	o	o	o	o	o
35	C87	++	+	+	o	+	o	+	+	o	o	o	o	o
36	C162	++	+	+	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o
37	B23	o	++	+	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o
38	C194	++	+	+	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o

Legenda: B = Bovino; C = Cão; + = crescimento; o = estéril.

De nossas observações, no entanto, infere-se um fato de real importância, pois uma vez que o cão pode se infectar com bacilos resistentes, poderá funcionar também como transmissor destes. Na mesma linha de idéias parece-nos plausível admitir a possibilidade da transmissão de bacilos resistentes através do leite de vacas tratadas em condições inadequadas.

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

O estudo de 38 amostras de *M. tuberculosis* isoladas de animais tuberculosos (27 bovinos e 11 cães) não tratados por estreptomicina ou hidrazida, revelou-nos a inexistência de amostras resistentes àquelas substâncias, nas 27 culturas obtidas de bovinos. Nas 11 amostras isoladas de cães encontrámos uma resistente a 50 mcg de estreptomicina e outra resistente a 500 mcg de estreptomicina e 100 mcg de hidrazida, ao lado de 9 amostras sensíveis.

À vista dos nossos resultados, julgamos que o aparecimento de formas naturalmente resistentes de *M. tuberculosis* em animais não tratados, não deve constituir fato comum. O encontro de 2 amostras resistentes em cães, sugerem, a nosso ver, uma contaminação por bacilos já resistentes, possivelmente de origem humana. No entanto, tal achado nos permite prever a possibilidade da transmissão de bacilos resistentes através de animais.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Concerning to the existence of naturally resistant strains of *M. tuberculosis* isolated from animals never treated with streptomycin or hydrazide, the study of 38 strains (27 bovines and 11 dogs) gave negative results in all those of bovine origin and in 9 of canine origin. One strain from dog grew up in presence of 50 mcg of streptomycin and other gave positive cultures in presence of 500 mcg of streptomycin and 100 mcg of hydrazide, being considered both resistant.

We think from our results that the occurrence of naturally streptomycin or hydrazide resistant strains of *M. tuberculosis* in not treated animals, is not a common fact. Concerning to the resistant strains found in dogs, we prefer to admit a contamination of those animals by resistant strains, possibly of human origin.

We call attention to the fact that animals harbouring resistant strains may have an important role in transmission of these strains among animals and man.

BIBLIOGRAFIA

- BALDELLI, B. — BADIALLI, L. — 1952 — L'idrazide dell'acido isonicotinico nella tubercolosi aviare spontanea. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.*, 7:450

- BRANDI, R. — 1951 — Determinação da estreptomicino-resistência (método de rotina do Instituto Clemente Ferreira). *Rev. Paulista Fisiologia*, 12:91
- DOANE, F. A. — BOGEN, E. — 1951 — Streptomycin-Dependent Tubercle Bacilli. *Amer. Rev. Tuberc.*, 64:192-195
- HOBBY, G. L. — LENERT, T. F. — 1952 — Resistance to isonicotinic acid hydrazide. *Amer. Rev. Tuberc.*, 65:771
- HOLM, J. and LESTER, V. — 1942 — Diagnostic Demonstration of Tubercle Bacilli. Comparison Between Cultivation and Inoculation of Guinea pigs. *Acta Tub. Scand.*, 16:310-29
- LENERT, T. F. — HOBBY, G. L. — 1949 — Streptomycin-Dependent Strains of Mycobacterium Tuberculosis. *Amer. Rev. Tuberc.*, 59:219-20
- MORETTI, B. — PEDINI, B. — 1952 — Primi rilievi sub trattamento, con idrazide dell'acido isonicotinico di forme acute di tubercolosi bocina. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.*, 7:459
- MONTI, F. — 1952 — L'idrazide dell'acido isonicotinico nella cura della tubercolosi extrapolmonare del gatto. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.*, 7:437
- PASSOS, A. C. DE MORAES — CHAPCHAP, A. — BRANDI, R. — 1952 — Resultados imediatos de 100 casos de tuberculose pulmonar tratados pela estreptomina, pelo PAS, pela estreptomina e PAS, e pelo TB1/698. *O Hospital* — fevereiro — 1952
- ROSEMBERG, J. — BRANDI, R. — CARRIJO, L. N. — 1953 — Resistência do bacilo de Koch à hidrazina do ácido nicotínico. *Rev. Bras. Tuberc.*, 21(145):63-6
- STEENKEN JR., W. — MEADE, G. M. — WOLINSKY, E. — COATES JR., F. O. — 1952 — Demonstration of increased drug resistance of tubercle bacille from patients treated with hydrazine of isonicotinic acid. *Amer. Rev. Tuberc.*, 65:754
- TINNE, J. E. — HENDERSON, J. L. — 1950 — Primary streptomycin resistant tuberculosis in a new-born child. *Lancet*, 30(23):901
- VENNESLAND, K. — EBERT, R. H. — BLOCH, R. G. — 1947 — The demonstration of naturally occurring streptomycin-resistant variants in the human strain of tubercle bacillus H₃₇R_v. *Science*, 106:476