

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

Diretor: Prof. Dr. Paulo M. G. de Lacerda Jr.

ESTUDOS SOBRE GARROTILO

(Studies on Strangles)

I — PESQUISA DE AMOSTRAS DE **STREPTOCOCCUS EQUI**
NATURALMENTE RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

(I — RESEARCH ON NATURALLY ANTIBIOTIC-RESISTANT
STRAINS OF **STREPTOCOCCUS EQUI**)

D. C. DE FREITAS
Assistente

Desde 1951 este Departamento vem acompanhando os surtos de garrotilho que ocorrem no Jockey Club Paulistano. Grande número de animais é atacado, com sério prejuízo para seu treinamento sem contar os que são definitivamente afastados das pistas em virtude de sequelas naturais da moléstia.

LACERDA JR. (1952) focalizou o importante papel dos portadores de germe na perpetuação da cadeia epidemiológica: são eles as fontes de infecção das quais o **Streptococcus equi** é levado por diversas vias de transmissão aos animais suscetíveis recém-chegados dos vários haras, onde o garrotilho ocorre escassamente.

Os animais que contraem a moléstia são geralmente tratados com sulfas ou antibióticos e dentre estes últimos, principalmente com penicilina.

Não raro têm ocorrido casos, primários ou recidivados, rebeldes à penicilinoterapia.

Este fato levou-nos a realizar a presente pesquisa que visou a dois pontos fundamentais:

a) investigar a ocorrência de variantes resistentes a antibióticos, de **Streptococcus equi**, em animais doentes ou portadores de germe.

b) estabelecer o significado epidemiológico de tais variantes.

Neste trabalho focalizaremos a primeira questão.

Parece discutível a ocorrência de variantes resistentes de estreptococos. Pelo menos é o que se infere dos trabalhos de HART-

MAN e WEINSTEIN (1948), FORD e WILSON (1952), LACERDA JR. e col (1953), GASPARINI (1954) e das excedentes pesquisas de GEZON e cols. (1948 — a, b, c, d e e), (1950 — a e b). A literatura é todavia omissa em relação ao *St. equi*, justificando-se, portanto, o presente estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizamos 31 amostras de *Streptococcus equi*, identificados entre 77 amostras de estreptococo hemolítico isoladas das fossas nasais ou de gânglios abcedados de 225 eqüinos alojados na Vila Hípica do Jockey Club Paulistano, durante um surto de garrotilho. O grupo examinado incluiu 21 animais com infecção ativa, 93 clinicamente curados (possíveis portadores convalescentes) e 101 saudios (possíveis portadores sãos).

O isolamento e identificação das amostras, obedeceram às normas adotadas por LACERDA JR. (1952) e LACERDA JR. e FREITAS (1952), limitando-se porém ao emprêgo do caldo glico-nitreto de sódio-cristal violeta, agar-sangue de cavalo e agar-vermelho de fenol (B98 Difco) adicionado respectivamente de lactose, sorbita e trealose. Classificamos como *Streptococcus equi* as amostras beta-hemolíticas não fermentadoras dos açúcares referidos.

Para a verificação da sensibilidade a antibióticos, empregamos discos de papel de filtro impregnados com três concentrações de penicilina, estreptomina, aureomicina, terramicina e cloromicetina (FREITAS e ZANI NETO, 1957). Cultivamos as amostras de *Streptococcus equi* em caldo glicosado durante 24 horas a 37° C e semeamos 0,05 cm³ das culturas na superfície de placas de agar-triptose (B64, Difco). Com pinça flambada distribuímos os discos de antibióticos, em círculo, e finalmente incubamos as placas durante 24 horas a 37° C, ao fim das quais procedemos à leitura.

O critério de interpretação foi o seguinte: consideramos a amostra sensível a determinada concentração de antibiótico desde que, em torno do disco, pudesse ser observado um halo de antibiose, independente de seu diâmetro. Reciprocamente, a ausência de halo de inibição indicava resistência (Quadro I).

Do total de 31, 7 amostras exibiram resistência a 0,5 U de penicilina e 2 assim se comportaram frente a 1 mcg de estrepto-

QUADRO 1

Sensibilidade de amostras de *St. equi* isoladas de equinos P. S. I. de diversa condição epidemiológica. Método de discos de papel de filtro impregnados de antibiótico.

Ordem cronológica	Número de registro	Idade do animal Anos hípicos	Condição epidemiológica	Penicilina unid.			Estreptomicina mcg			Aureomicina (*) mcg			Terramicina (*) mcg			Cloromicetina (*) mcg		
				0,5	1	10	1	10	100	10	30	60	10	30	60	10	30	60
2	7	3	PS	R	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
1	18	5	PS	S	S	S	R	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
3	20	3	PS	S	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
4	165	3	PS	S	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
5	210	4	PS	S	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
6	140	2	PC	R	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
7	141	2	PC	S	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
8	171	2	PC	S	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
9	204	2	PC	R	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
10	61	2	D	S	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
11	131	2	D	S	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
12	132	2	D	S	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
13	148	2	D	S	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
14	150	2	D	S	S	S	R	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
15	151	2	D	S	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
16	155	2	D	S	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
17	159	2	D	S	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
18	159	2	D	S	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
19	164	2	D	R	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
20	170	2	D	S	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
21	195	2	D	S	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
22	196	2	D	S	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
23	200	2	D	S	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
24	201	2	D	S	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
25	207	2	D	S	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
26	203	2	D	S	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
27	214	2	D	S	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
28	215	2	D	S	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
29	218	2	D	S	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
30	221	2	D	S	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—
31	223	2	D	R	S	S	S	S	S	S	—	—	S	—	—	S	—	—

(*) As provas com aureomicina, terramicina e cloromicetina foram efetuadas apenas com discos de 10 mcg. Subentende-se que as amostras sensíveis a essa concentração o eram obrigatoriamente às demais.

PS — portador sadio
PC — portador convalescente
D — doente

S — sensível
R — resistente

micina. Tais amostras foram posteriormente testadas em meio líquido* adicionado de quantidades variáveis de penicilina e estreptomina (Quadro II).

RESULTADOS

Os resultados figuram nos quadros I e II (pgs. 3 e 4).

QUADRO II

Provas realizadas em meio líquido*, com 9 amostras de *St. equi* das quais 7 exibiram resistência a 0.5 unidade de penicilina e 2. resistência a 1 mcg de estreptomina.

Amostra n.º	Penicilina U cm ³			Estreptomina mcg/cm ³		
	0.005	0.05	0.5	0.01	0.1	1
7	0	0	0			
140	+	0	0			
164	0	0	0			
171	0	0	0			
203	+	0	0			
204	+	0	0			
223						
18				0	0	0
150				0	0	0

(*) "Inoculum" de 0,05 cm³ de cultura de 24 hs

+ — crescimento
0 — inibição

(*)	Bacto triptose	10,0 g
	Cloreto de sódio	5,0 g
	Bacto-neoptona	10,0 g
	Cloridato de tiamina (U. S. P. Reference Standard)	0,005 g
	Glicose	1,0 g
	Água destilada	1000 cm ³

DISCUSSÃO

A observação dos resultados expostos no Quadro I evidencia 7 amostras resistentes a 0,5 unidade de penicilina e 2 amostras resistentes a 1 mcg de estreptomicina. Frente à aureomicina, terramicina e cloromicetina tôdas as 31 amostras exibiram total sensibilidade. Todavia, as amostras resistentes, quando testadas em meio líquido, diante de concentrações menores dos respectivos antibióticos não confirmaram tal propriedade. Esse fato pode ser interpretado de duas maneiras:

a) tratar-se de menor acuidade do processo de discos em relação ao processo em meio líquido;

b) tratar-se realmente de amostras parcialmente resistentes, quando recentemente isoladas e que perderam essa propriedade depois de submetidas a diversos repiques durante o intervalo entre o isolamento, identificação e realização da prova, que abrangeu de 10 a 15 dias. Esta possibilidade, que encontrava apôio nos trabalhos de GEZON, foi confirmada em experiências posteriores, em relação à penicilina.

De qualquer forma, as observações expostas no presente artigo, negaram-nos resposta sôbre o papel epidemiológico de possíveis variantes resistentes de ***Streptococcus equi***. Procuramos obtê-la através de observação do comportamento de amostras de resistência induzida à penicilina "in vitro", assunto que será focalizado em trabalho subsequente. Os resultados da presente pesquisa, nas condições em que foram realizadas, conduzem a admitir que o ***Streptococcus equi*** não se apresenta naturalmente resistente aos antibióticos experimentados, ressaltando o comportamento discutível de algumas amostras em relação à penicilina.

SUMMARY

The Author investigated the occurrence of naturally antibiotic-resistant strains of ***Streptococcus equi***. A lot of 31 strains was isolated from nostrils or suppurated lymph glands of race horses, along a survey of strangles in Jockey Club Paulistano — São Paulo — Brasil.

Between them, there were 31 animals with active strangles, 93 clinically healed and 101 healthy adult horses.

All strains identified as *Streptococcus equi* were tested by the disc-plate method against penicillin, streptomycin, aureomycin, terramycin and chloromycetin in variable concentrations of the antibiotics.

Seven out of all showed resistance against 0,5 unit of penicillin and two others against 1 mcg of streptomycin.

Repeating the test, now by the dilution test tube method, the same strains did not confirm those fastness properties.

The results suggest two possibilities:

a) the disc-plate method was not so accurate as the dilution test tube method;

b) the strains were really resistant when recently isolated but along subcultures they have lost their drug-fastness. As a matter of fact, this condition was confirmed in another investigation, when resistant strains were obtained by successive transfers in broth with penicillin.

The actual data suggest that naturally antibiotic-resistant strains of *Streptococcus equi* do not occur, exception not so clear being made for some strains in relation to penicillin.

BIBLIOGRAFIA

- FORD, Ch. M. — WILSON, J. B. — 1952 — The penicillin resistance of *Streptococcus agalactiae* isolated before and after penicillin therapy. *Cornell Vet.*, 42(3): 291-5
- FREITAS, D. C. — ZANI NETO, L. — 1957 — Método prático para avaliação de resistência a antibióticos. VII Congresso Brasileiro de Veterinária, Recife — Brasil — 12 a 19 de Outubro
- GASPARINI, G. — 1954 — Sulla sensibilità "in vitro" dello *Streptococcus agalactiae* a diversi antibiotici. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.*, 8:762-74
- GEZON, H. M. — 1948 (a) — Antibiotic studies on beta-hemolytic streptococci: I. Penicillin resistance acquired by group A organisms. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, N. Y., 67 (2): 208-12
- GEZON, H. M. — 1948 (b) — Antibiotic studies on beta-hemolytic streptococci: II. Penicillin resistance acquired by group B organisms. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, N. Y., 67(2):212-5
- GEZON, H. M. — 1948 (c) — Antibiotic on beta-hemolytic streptococci: III. Penicillin resistance acquired by group C organisms. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, N. Y., 67 (2):215-9

- GEZON, H. M. — COLLINS, G. R. — 1948 (d) — Antibiotic studies on beta-hemolytic streptococci: IV. Penicillin resistance induced in mice and embryonated eggs. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, N. Y., **69**(2):312-4
- GEZON, H. M. — CRYST, E. E. — 1948 (e) — Antibiotic studies on beta-hemolytic streptococci: V. Streptomycin acquired resistance by group A, B and C organisms. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, N. Y., **68**(3): 653-7
- GEZON, H. M. — FASAN, D. M. — 1950 (a) — Antibiotic studies on beta-hemolytic streptococci: VI. Acquired "in vitro" and "in vivo" resistance to Aureomycin. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, N. Y., **73**(1): 10-5
- GEZON, H. M. — FASAN, D. M. — COLLINS, G. — 1950 (b) — Antibiotic studies on beta-hemolytic streptococci: VII. Acquired "in vitro" resistance to bacitracin. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, N. Y., **74**(3): 505-9
- HARTMAN, T. L. — WEINSTEIN, L. — 1948 — Drug sensitivity of hemolytic streptococci isolated from cases of scarlet fever treated with penicillin. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, N. Y., **69**(2):314-6
- LACERDA JR., P. M. G. de — 1952 — Etio-epizootiologia da adenite equina. *Rev. Fac. Med. Vet.*, S. Paulo, **4**(4):559-71
- LACERDA JR., P. M. G. de — FREITAS, D. C. — 1952 — O emprêgo do nitrogênio de sódio em meios seletivos para estreptococos. *Rev. Fac. Med. Vet.*, S. Paulo, **4**(4):553-7
- LACERDA JR., P. M. G. de — FREITAS, D. C. — ZANI NETO, L. — 1953 — Estudos sobre mastites bovinas: II. Verificação da sensibilidade de agentes etiológicos de mastites bovinas à penicilina e estreptomomicina. *Rev. Fac. Med. Vet.*, S. Paulo, **5**(1):65-71