

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

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

ESTUDOS SÔBRE GARROTILO

(Studies on Strangles)

- II — COMPORTAMENTO DE AMOSTRAS DE **STREPTOCOCCUS EQUI**,
DE RESISTÊNCIA INDUZIDA À PENICILINA, "IN VITRO".
- (II — THE "IN VITRO" BEHAVIOUR OF INDUCED PENICILLIN-RESIS-
TANT STRAINS OF **STREPTOCOCCUS EQUI**)

D. C. DE FREITAS

Assistente

Neste artigo completamos a pesquisa anterior (FREITAS, 1960), na qual procuramos evidenciar a possibilidade da ocorrência de amostras de **Streptococcus equi** naturalmente resistentes a antibióticos.

Baseados em trabalhos de GEZON e seu grupo de colaboradores (1948, a, b e c) sôbre indução de resistência 'in vitro', investigamos o comportamento do **Streptococcus equi** assim modificado. Fizemo-lo somente em relação à penicilina, por duas razões: a) pelo fato de havermos encontrado entre 31 amostras de **Streptococcus equi**, 7 capazes de se desenvolver em presença de 0,5 unidade de penicilina (com o emprêgo de discos de papel de filtro); b) pelo fato de ser a penicilina o antibiótico utilizado no tratamento da quase totalidade dos casos de garrotilho que ocorrem na Vila Hípica do Jockey Club Paulistano, onde obtivemos o material para o presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizamos neste trabalho, 28 amostras de **Streptococcus equi**, isolados e identificados segundo técnica descrita em trabalho anterior (FREITAS).

Para obter a adaptação progressiva dessas amostras à penicilina, cultivamo-las, sucessivamente, em meio de cultura líquido, ao qual adicionamos quantidades crescentes do antibiótico.

A constituição do meio de cultura visou a proporcionar condições nutritivas favoráveis ao desenvolvimento rápido do germe, com substâncias que não interferissem na ação antibacteriana da penicilina.

Conseguimo-lo com a fórmula seguinte:

Água destilada	1000 cm ³
Bacto triptose	10 g
Bacto neopeptona	10 g
Cloreto de sódio	5 g
Cloridrato de tiamina	5 mg
(U. S. P. Reference Standard)	
Glicose	1 g
pH 6,8 — 7,0	

Tal combinação (que será denominada “caldo” no decorrer do trabalho), permitiu desenvolvimento exuberante das culturas em 24 horas, sem prejudicar a ação da penicilina, o que foi possível verificar através da seguinte prova:

A uma série de 10 tubos com 5 cm³ de “caldo”, adicionamos 0,1 unidade de penicilina*, resultando concentração final de 0,02 unidade/cm³. Outra série de tubos sem penicilina serviu de controle. Semeamos nos tubos 1 de cada série 0,05 cm³ de cultura de 24 horas da amostra de *Streptococcus equi* C75 53, da coleção do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária, cuja sensibilidade era inferior a tal concentração. Após incubação a 37°C, durante 24 horas, observamos que o tubo com penicilina permaneceu límpido enquanto o controle acusou desenvolvimento abundante. A partir deste, semeamos os tubos n.º 2 das respectivas séries e prosseguimos a operação com in-

(*) Penicilina G potássica “Squibb”.

tervalos de incubação de 24 horas até que o germe passou a desenvolver-se em ambas as séries, traduzindo assim, a perda de atividade da penicilina para o microorganismo. Com esta técnica pudemos obter 6 culturas estéreis, o que demonstrou que nesse “caldo” a penicilina manteve-se ativa a 37°C, durante 6 dias pelo menos, prazo que nos permitiu boa margem de segurança na realização de experiências subsequentes.

Para conseguir a indução de resistência, repicamos sucessivamente 0,05 cm³ da cultura em 5 cm³ de “caldo”, adicionado de quantidades crescentes de penicilina em intervalos de incubação de 24-48 horas.

O limite da sensibilidade foi averiguado por tentativa. Somente consideramos uma amostra como resistente a determinada concentração quando houve desenvolvimento pleno da cultura, comparado com o observado em tubo testemunha onde a amostra original foi simultaneamente repicada (Quadro I).

As variantes resistente-induzidas foram observadas quanto ao aspecto morfológico, cultural, poder hemolítico e à virulência para camundongos. Neste particular, o ideal seria estabelecer a DL₅₀ da amostra original comparando-a com a DL₅₀ da equivalente resistente. O número elevado de camundongos que tal experiência exigiria, levou-nos a avaliar a DL₅₀ de uma das amostras, tomando-a como base para as restantes. Encontramos, como DL₅₀, o volume de 0,34 cm³ de cultura em “caldo”, de 24 horas e adotamos para as provas o volume de 0,5 cm³, dando larga margem de segurança à experiência (Quadro II).

Conseguidas as variantes resistentes, passamos a cultivá-las sucessivamente em “caldo” sem penicilina, a fim de obter o retorno ao estado de sensibilidade, quando então observamos novamente suas propriedades. Os resultados destas experiências estão discriminados em dois Quadros (III e IV) porque as amostras foram divididas em dois grupos: o 1.º com 6 amostras, que serviu para observação do fenômeno e o 2.º com 22 amostras, para comprovação do mesmo.

RESULTADOS

Os resultados estão condensados nos quadros que seguem:

QUADRO I

Modificação da resistência de amostras de *St. equi* após 55 passagens sucessivas em "caldo" com quantidades progressivas de penicilina, em intervalos de 24-48 horas, a 37°C.

N.º da amostra	Resistência em U/cm ³		Aumento da resistência
	Inicial	Após 55 passagens	
18	0,002	0,180	90,0 x
20	0,006	0,200	33,3 x
131	0,006	0,250	41,6 x
132	0,006	0,240	40,0 x
140	0,006	0,180	30,0 x
141	0,002	0,200	100,0 x
148	0,001	0,040	40,0 x
150	0,002	0,180	90,0 x
151	0,002	0,150	75,0 x
158	0,002	0,180	90,0 x
159	0,002	0,028	14,0 x
164	0,005	0,046	9,2 x
165	0,006	0,070	11,6 x
170	0,005	0,150	30,0 x
171	0,004	0,160	40,0 x
195	0,003	0,150	50,0 x
196	0,002	0,048	24,0 x
200	0,004	0,080	20,0 x
201	0,001	0,100	100,0 x
202	0,005	0,080	16,0 x
203	0,002	0,140	70,0 x
204	0,006	0,140	23,3 x
210	0,001	0,080	80,0 x
214	0,005	0,120	24,0 x
215	0,002	0,120	60,0 x
218	0,005	0,120	24,0 x
221	0,002	0,120	60,0 x
223	0,005	0,140	28,0 x

QUADRO II

Modificações apresentadas pelas variantes resistentes de *St. equi* obtidas em "caldo" com penicilina, em relação às originais sensíveis, após 55 passagens.

Número da amostra	Aumento da resistência	Alterações morfológicas (*)		Aspecto em caldo		Poder hemolítico agar-sangue 5%		Virulência para camundongo (**)	
		S	R	S	R	S	R	S	R
18	90 x	O	L	D	F	C	A	C	A
20	33,3 x	O	L	D	F	C	A	C	A
131	41,6 x	O	L	D	F	C	A	C	A
132	40 x	O	L	D	F	C	A	C	A
140	30 x	O	L	D	F	C	A	C	A
141	100 x	O	L	D	F	C	A	C	A
148	40 x	O	L	D	F	C	A	C	A
150	90 x	O	L	D	F	C	A	C	A
151	75 x	O	L	D	F	C	A	C	A
158	90 x	O	L	D	F	C	A	C	A
159	14 x	O	L	D	F	C	PC	C	C
164	9,2 x	O	L	D	F	C	C	C	C
165	11,6 x	O	L	D	F	C	PC	C	C
170	30 x	O	L	D	F	C	A	C	A
171	40 x	O	L	D	F	C	A	C	A
195	50 x	O	L	D	F	C	A	C	A
196	24 x	O	L	D	F	C	A	C	A
200	20 x	O	L	D	F	C	PC	C	A
201	100 x	O	L	D	F	C	PC	C	A
202	16 x	O	L	D	F	C	PC	C	A
203	70 x	O	L	D	F	C	A	C	A
204	23,3 x	O	L	D	F	C	PC	C	A
210	80 x	O	L	D	F	C	A	C	A
214	24 x	O	L	D	F	C	PC	C	A
215	60 x	O	L	D	F	C	A	C	A
218	24 x	O	L	D	F	C	A	C	A
221	60 x	O	L	D	F	C	A	C	A
223	28 x	O	L	D	F	C	PC	C	A

(*) Morfologia observada em esfregaços corados pelo método de Gram.

(**) 0,5 cm³ de cultura de 24 horas, via intraperitoneal.

R — variante resistente-induzida

S — original sensível

O — sem alteração

L — alterações ligeiras

D — difuso

F — flocculento

C — conservado

A — abolido (a)

PC — parcialmente conservado

QUADRO III

Modificações apresentadas pelas amostras de *St. equi* do grupo 1, no retorno ao estado de sensibilidade, referentes ao aspecto em "caldo", poder hemolítico, virulência e grau de resistência.

Número da amostra	Resistência		SUBCULTURAS EM MEIO SEM PENICILINA																
			1.º Repique			5.º Repique			10.º Repique			15.º Repique			22.º Repique				
	original	55.ª passagem	Caldo	Poder hemolítico (*)	Virulência (**)	Caldo	Poder hemolítico (*)	Virulência (**)	Resistência U/cm ³	Caldo	Poder hemolítico (*)	Virulência (**)	Caldo	Poder hemolítico (*)	Virulência (**)	Caldo	Poder hemolítico (*)	Virulência (**)	Resistência U/cm ³
18	0.002	0.180	F	A	A	F	A	A	0.040	D	PR	A	D	PR	A	D	R	R	0.010
20	0.006	0.200	F	A	A	D	PR	A	0.020	D	R	A	D	R	R	D	R	R	0.010
140	0.006	0.180	F	A	A	D	PR	A	0.020	D	R	A	D	R	R	D	R	R	0.010
141	0.002	0.200	F	A	A	F	A	A	0.020	D	R	A	D	R	R	D	R	R	0.010
150	0.002	0.180	F	A	A	F	A	A	0.020	D	PR	A	D	PR	A	D	R	R	0.010
151	0.002	0.150	F	A	A	D	PR	A	0.020	D	PR	A	D	PR	A	D	R	R	0.010

(*) Poder hemolítico em placa de agar sangue de cavalo a 5%

(**) Virulência: 0.5 cm³ de cultura de 24 horas, via intraperitoneal, camundongo

A — abelido (a)

D — difuso

F — flocoento

PR — parcialmente recuperado

R — recuperado

QUADRO IV

Modificações apresentadas pelas amostras de *St. equi* do grupo 2, no retorno ao estado de sensibilidade, após 15 repiques em meio sem penicilina e referentes ao aspecto em "caldo", poder hemolítico, virulência e resistência.

n.º da amostra	Resistência 55.ª pass. u/cm ³	Caldo	Poder hemolítico (*)	Virulência (**)	Resistência u/cm ³		
					0.002	0.005	0.010
131	0.250	D	PR	A	+	+	+
132	0.240	D	PR	A	+	+	+
148	0.040	D	R	R	+	O	O
158	0.180	D	PR	A	+	+	O
159	0.028	D	R	C	+	O	O
164	0.046	D	R	C	+	O	O
165	0.070	D	R	C	+	O	O
170	0.150	D	PR	R	+	O	O
171	0.160	D	PR	A	+	+	+
195	0.150	D	PR	A	+	+	+
196	0.048	D	PR	A	+	+	O
200	0.080	D	R	R	+	O	O
201	0.080	D	PR	A	+	+	+
202	0.100	D	R	R	+	O	O
203	0.140	D	PR	A	+	+	+
204	0.140	D	PR	R	+	+	O
210	0.080	D	PR	A	+	+	+
214	0.120	D	PR	A	+	+	O
215	0.120	D	PR	A	+	+	+
218	0.120	D	PR	A	+	+	O
221	0.120	D	PR	A	+	+	+
223	0.140	D	R	A	+	+	O

(*) Em agar-sangue de cavalo a 5%

(**) 0.5 cm³ de cultura de 24 horas, via intraperitoneal, camundongo

— resistente

O — sensível

A — abolida

C — conservado

D — difuso

PR — parcialmente recuperado

R — recuperado (a)

DISCUSSÃO

A questão que nos propuzemos indagar, levou-nos aos resultados expostos nos diversos Quadros apresentados.

Pela observação do Quadro I, deduz-se que é possível obter "in vitro" variantes resistentes de *Streptococcus equi*. Ao que parece, esta espécie não mostra diferente comportamento dos estreptococos do grupo C estudados por GEZON (c). Os níveis de resistência harmonizaram-se com o número de passagens efetuadas mas evi-

denciaram variação muito nítida entre as amostras estudadas. Observa-se também — e isto nos parece importante — que os valores de resistência atingidos ultrapassaram os níveis de concentração de penicilina no sangue, obtidos normalmente no cavalo, nas dosagens terapêuticas habituais e que variam de 0,019 a 0,038 U/cm³ de soro, em animais de idade entre 4½ meses e 5 anos (DOLL e DIMOCK, 1946). Obtivemos níveis de resistência de 0,9 U/cm³, ou seja, 47,3 e 23,6 vezes maiores que as citadas concentrações.

Tais valores teriam significado alarmante, se o **Streptococcus equi** tornado resistente, não sofresse alterações em suas propriedades. O Quadro II mostra que a maioria das variantes resistentes perdeu o poder hemolítico e a virulência e que tais modificações foram mais acentuadas nas amostras que atingiram maior grau de resistência. Referindo-se ao assunto, MATSUI (1950) interpretou o fenômeno como variação S-R.

Mas, no retorno ao estado da sensibilidade (Quadros III e IV), confirmando fato já referido por GEZON (a) e WEINSTEIN e TSÁO (1947), observamos a recuperação das propriedades originais do germe. Não nos parece, portanto, que se trate de variação S-R. O aspecto R nos estreptococos hemolíticos aparece normalmente em amostras recém-isoladas e virulentas. Porisso mesmo, TODD (1928) propôs a denominação 'Matt' para diferencia-las da clássica variante "Rough". Além disso, se a resistência conduzisse à variação R, não seria possível obter a recuperação das propriedades originais do germe através de simples subculturas e, principalmente, da virulência para camundongo. É plausível admitir — isto sim — que a penicilina pode provocar no estreptococo modificações morfológicas e culturais, alterar-lhe a propriedade hemolítica e a virulência, sem que, contudo, essas transformações sejam profundas (pelo menos com o número de repiques por nós efetuado) a ponto de criar variantes estáveis.

Em que pesem as limitações de um estudo "in vitro" e o fato de que, em se tratando de antibióticos, as relações "**vitro-vivo**" mostram-se por vezes paradoxais, êste trabalho conduziu-nos a admitir resposta à indagação inicial sôbre o papel epidemiológico de possíveis variantes penicilino-resistentes de **St. equi**.

Tais variantes, se por ventura surgissem no decurso de surtos de garrotilho, não teriam significado epidemiológico, pois não seriam capazes de provocar doença. Mesmo considerando que estir-

pes resistentes pudessem ser disseminadas por contágio, não chegariam a constituir problema, pois o estado de resistência apresentar-se-ia como fenômeno transitório e reversível.

Essa hipótese, contudo, não pôde ser comprovada neste trabalho, cujos resultados permitem concluir apenas que:

- 1 — repiques sucessivos de **Streptococcus equi** em meio de cultura com penicilina permitiram a obtenção de variantes resistentes;
- 2 — tais variantes evidenciaram alterações morfológicas e culturais e perderam, total ou parcialmente, o poder hemolítico e a virulência para camundongo;
- 3 — as variantes resistentes, cultivadas sucessivamente em meio de cultura sem penicilina, recuperaram as propriedades de suas parentes sensíveis;
- 4 — a variação “sensível-resistente” do **St.equi**, “in vitro”, não está relacionada à variação “S-R”, tendo em vista a reversibilidade do fenômeno.

SUMMARY

In this additional paper, the Author has obtained induced-resistant strains of **Streptococcus equi** through serial transfers in penicillin-added broth. These resistant strains exhibited morphological and cultural alterations, having lost their hemolytic power and virulence for mice.

After 55 transfers, the degree of resistance attained a minimum of 9.2 times and a maximum of 100.0 times, comparatively with the sensible parents.

The resistant strains were then sub-cultivated in penicillin-free broth and all of them have re-acquired their original properties, including the virulence for mice and the sensitivity to penicillin.

Considering the hypothesis that these phenomena could be established “in vivo”, during a survey of strangles, it is suggested that the occurrence of penicillin-resistant variants of **St.equi** would not have any epidemiological significance because they would not be able to produce the disease.

Even considering that these strains could be disseminated by contagium they would not represent any problem because the resistant phase is transitory and reversible.

BIBLIOGRAFIA

- DOLL, E. R. — DIMOCK, W. W. — 1946 — Penicillin dosage and blood levels for the horse. *J.A.V.M.A.*, 108(829):209-14
- FREITAS, D. C. — 1959 — Estudos sobre garrotilho: I. Pesquisa de amostras de *Streptococcus equi* naturalmente resistentes a antibióticos. *Rev. Fac. Med. Vet.*, S. Paulo, 6(3):303-10
- 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 studies on Beta hemolytic streptococci: III. Penicillin resistance acquired by group C organisms. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, N. Y., 67(2):215-9
- MATSUI, S. — 1950 — On the susceptibility of hemolytic streptococci to penicillin resistant strains. *Jour. Antib.*, 3(3):158-66
- TODD, E. W. — 1928 — Further observations on the virulence of hemolytic streptococci with special reference to the morphology of the colonies. *Brit. J. Exp. Path.*, 9:1-6
- WEINSTEIN, L. — TSÁO, C. C. L. — 1947 — In vitro development of temporary penicillin-resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, N. Y., 66(3):598-602