

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

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

## ESTUDOS SÔBRE MASTITES BOVINAS

### II — Verificação da sensibilidade de agentes etiológicos de mastites bovinas à penicilina e estreptomicina (\*)

STUDIES ON BOVINE MASTITIS

II — The sensibility of bovine mastitis microorganisms to penicillin and streptomycin

PAULO M. G. DE LACERDA JR.

D. C. DE FREITAS  
Assistente

LUIZ ZANI NETO  
Assistente

#### I -- GENERALIDADES

Os progressos recentemente feitos no campo da terapêutica anti-infecciosa com o uso de quimioterápicos e antibióticos foram logo aproveitados na clínica veterinária.

Da mesma forma que na medicina humana, o emprego de tais substâncias difundiu-se rapidamente e passou-se a fazer uso indiscriminado de antibióticos na maioria das infecções.

No caso particular das mastites, a infecção incipiente do úbere dificilmente é surpreendida, quer pelo proprietário, quer pelo veterinário. O profissional só é consultado nos casos mais avançados; quanto ao proprietário, não considera a mastite como doença enquanto a produção do leite não fôr suspensa ou, pelo menos diminuída a um ponto que lhe cause prejuízo econômico.

Como agravante lamentável, a liberalidade da legislação que permite a venda de antibióticos independente de qualquer prescrição, faculta ao proprietário, antes de consultar o veterinário, empregar quasi que sistematicamente a penicilina, sem considerar a etiologia particular de cada caso. Quando isso não acontece e é chamado o facultativo, êste, por dificuldades técnicas, geralmente inicia o tratamento com penicilina, sem conhecer a etiologia. Leva unicamente a vantagem de empregar dosagens adequadas.

Embora tal procedimento trouxesse inicialmente resultados animadores, a sua continuidade terminou por trazer um arrefecimento ao entusiasmo daqueles que reputavam a penicilina como droga milagrosa.

(\*) Apresentado ao II Congresso Pan-Americano de Medicina Veterinária, realizado em São Paulo, de 3 a 10 de abril de 1954.

A situação não é nossa particular e o mesmo ocorre em outros países. JACQUET, na França, assinalou que o emprêgo de antibióticos nas mastites resultou em seleção de espécies resistentes aos mesmos, no desaparecimento de certos germes a êles sensíveis e em um aumento do número de mastites provocadas por outros germes não habitualmente ligados à etiologia dêsse processos.

Esse fenômeno que ocorre em relação às mastites manifestou-se também em várias infecções do campo da medicina humana, apesar desta poder oferecer assistência e contrôle em grau mais elevado que a veterinária. Segundo observações de BARKER & ROZWADOWSKA, em casos de infecções estafilocócicas estudadas no Hammersmith Hospital, de Londres, 11,1% dos estafilococos isolados no ano de 1946 eram resistentes à penicilina; em 1947 a percentagem subiu para 38% e em 1948 para 59%. Observações semelhantes foram feitas por SPINK em relação a outros antibióticos.

Em veterinária as modificações não devem ser tão bruscas, porque uma boa parte dos nossos rebanhos vive sem qualquer assistência terapêutica, o que, aliás, parece nos oferecer melhores perspectivas.

O problema entretanto já existe, pelo que pudemos constatar nesta pesquisa inicial. Os dados aqui apresentados, poderão, acreditamos, contribuir como observação documentada para investigações futuras.

## II — MATERIAL E METODOS

a) *Material estudado*: — Este constou de 81 amostras de germes isolados de casos de mastites, segundo a técnica descrita na primeira parte do presente trabalho. Essas 81 amostras assim se distribuam:

<i>Micrococcus pyogenes</i> , var. aureus .....	20
<i>Micrococcus pyogenes</i> , var. albus .....	12
<i>Streptococcus agalactiae</i> .....	12
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> .....	2
<i>Streptococcus equisimilis</i> .....	1
<i>Streptococcus acidominimus</i> .....	1
<i>Streptococcus bovis</i> .....	6
<i>Streptococcus</i> sp. ....	3
<i>Escherichia coli</i> .....	4
<i>Aerobacter aerogenes</i> .....	2
Coliformes intermediários .....	9
<i>Corynebacterium pyogenes</i> .....	7
Bacilos difteróides .....	2
<b>Total</b> .....	<b>81</b>

b) *Técnica de estudo*: — Para a verificação da sensibilidade dos germes isolados, frente à penicilina e estreptomicina, utilizamos o método dos discos de papel de filtro proposto por VICENT & VICENT, BONDI JR. e col. e usados com sucesso por TAUNAY e col.

Este método, bastante prático, está sendo largamente usado pelos pesquisadores e já se encontram no comércio coleções de discos de várias procedências, para verificação da sensibilidade ou resistência de germes aos antibióticos mais comuns.

A princípio utilizamos discos adquiridos no comércio, mas devido ao custo pouco acessível dos mesmos, resolvemos prepará-los em nosso laboratório, comparando-os com originais nacionais e americanos. Os resultados foram satisfatórios e passamos a adotar nossas preparações durante todo o trabalho.

O preparo dos discos pode ser assim descrito: uma folha de papel de filtro bem uniforme é perfurada com máquina de furar papel, obtendo-se discos de 5 mm. de diâmetro. Estes discos são esterilizados em calor seco a 180°C, durante 2 horas. Prepara-se a solução do antibiótico, partindo-se de uma quantidade bem definida (encontra-se à venda coleções de antibióticos padronizados em 20 mil unidades\*). Obtêm-se assim soluções de concentrações variáveis onde os discos serão embebidos de modo a se ter uma distribuição uniforme do antibiótico. Cada centímetro cúbico da solução permite embeber cerca de 50 discos. Os discos embebidos são distribuídos em placas de Petri esterilizadas e secos rapidamente no vácuo. São depois reunidos em pequenos tubos e conservados em geladeira. Depois de submetidos à comparações com discos padronizados, podem ser postos em uso.

Por esse processo preparamos discos de penicilina e estreptomicina contendo três concentrações correspondentes a meia, uma e 10 unidades.

c) *Técnica da prova de sensibilidade*: — O germe a ser testado é semeado na superfície de placas com meio de cultura adequado, perfeitamente secas. Sempre que possível, deve-se usar meios transparentes, pois facilitam a interpretação dos resultados. O "inoculum" deve ser distribuído com espátula de Dri-galski de modo a permitir um crescimento confluyente e uniforme, sem claros que possam confundir as áreas de antibiose. Por meio de uma pinça, coloca-se então assepticamente, os discos acima descritos.

As placas vão para a estufa a 37°C durante 24 horas, após as quais se faz a leitura, observando-se a presença ou ausência de halos estéreis em tórno dos

\* Antibiotic Diagnostic Kit. Chas. Pfizer & Co. Inc. New York, U.S.A.

discos. A interpretação dos resultados abrange quatro tipos de germes em função dos halos de antibiose:

- 1 — sensíveis
- 2 — pouco sensíveis
- 3 — resistentes
- 4 — muito resistentes

No quadro abaixo podemos esclarecer melhor essa interpretação, considerando o sinal + como crescimento em torno dos discos e o sinal — como ausência de crescimento e portanto antibiose.

QUADRO I

0,5 unidade	1 unidade	10 unidades	Interpretação
—	—	—	Sensível
+	—	—	Pouco sensível
+	+	—	Resistente
+	+	+	Muito resistente

Exporremos nossos resultados, analisando os germes estudados de acordo com a distribuição do quadro acima.

#### RESULTADOS

Reunimos no quadro seguinte os resultados obtidos nas provas de sensibilidade à penicilina e estreptomicina, a que foram submetidas as 81 amostras de germes isolados de mastites.

#### DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Como já dissemos, este trabalho é um estudo inicial. Terá que ser ampliado sob todos os aspectos. Maior número de amostras deverão ser estudadas, procurando-se ampliar o raio da zona de coleta de material de vacas com

QUADRO II

G e r m e	Número de amostras	Penicilina				Estreptomicina				Sensíveis à penicilina e estreptomicina	Resistentes à penicilina e estreptomicina
		S	PS	R	MR	S	PS	R	MR		
<i>M. pyogenes</i> , var. aureus .....	20	10	2	8	0	17	0	3	0	7	0
<i>M. pyogenes</i> , var. albus .....	12	8	1	0	3	7	1	1	3	7	3
<i>Streptococcus agalactiae</i> .....	12	3	0	5	4	2	3	3	4	1	7
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> ...	2	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1
<i>Streptococcus equisimilis</i> .....	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
<i>Streptococcus acidominimus</i> ...	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
<i>Streptococcus bovis</i> .....	6	3	2	0	1	4	0	1	1	2	1
<i>Streptococcus</i> cp. ....	3	3	0	0	0	3	0	0	0	3	0
<i>Escherichia coli</i> .....	4	0	0	1	3	3	0	0	1	0	1
<i>Aerobacter aerogenes</i> .....	2	0	0	0	2	1	0	1	0	0	1
Coliformes intermediários .....	9	1	0	0	8	3	1	2	3	1	5
<i>Corynebacterium pyogenes</i> ....	7		1	4	1	2	5	0	0	1	0
Difteróides .....	2	0	0	0	2	0	0	0	2	0	2
Totais .....	81	29	7	19	26	42	10	13	16	22	23

S — sensível PS — pouco sensível R — resistente — MR — muito resistente.

mastites e considerar fatores tais, como: idade, tipo de criação, época do ano, tratamento empregado, etc.

Entretanto, o interêsse em publicar estas observações, é não só ter-se uma documentação inicial, como principalmente ter em mãos dados positivos para apresentar e discutir com profissionais e criadores. Dependemos intimamente quer de uns, quer de outros, e o primeiro passo é convencê-los da oportunidade do estudo.

Do total de 81 microorganismos isolados, temos que, 45 ou seja 55,5%, são resistentes ou insensíveis à penicilina; e quanto à estreptomomicina, 29 dos 81 ou seja 35,8%, são resistentes.

Se considerarmos somente os germes Gram positivos, vemos no quadro II que de 64 amostras Gram positivas, 31 ou seja 48,4% são resistentes à penicilina. Quanto aos germes Gram negativos, que deveriam apresentar alta sensibilidade à estreptomomicina, de 15 estudados, 7 ou seja 46,6%, são resistentes a êsse antibiótico. Dos Gram positivos resistentes à estreptomomicina salienta-se o *Streptococcus agalactiae*, com 7 amostras resistentes entre as 12 amostras isoladas.

Dos dados expostos acima vemos que um número apreciável de amostras é resistente aos antibióticos aos quais deveria ser sensível, e, diversas são resistentes aos dois antibióticos experimentados. Tais fatos, vêm evidenciar a necessidade de ser feito o exame bacteriológico nos casos de mastites e a verificação de sensibilidade do agente causal aos antibióticos. Somente depois de tais exames realizados é que deveria ser resolvido o tratamento. Sabemos que tal orientação é inexequível em grande número de casos, porém em relação a vacas leiteiras de alta produção, que representam indiscutível valor econômico e que geralmente estão em propriedades localizadas próximo aos centros de maior recurso, tal medida poderia ser adotada.

#### RESUMO

Após tecerem considerações sobre os agentes etiológicos de mastites bovinas, os autores estudam o comportamento perante diferentes concentrações de penicilina e estreptomomicina, de 81 microorganismos que isolaram de vacas com mastites, assim distribuídos: 32 estafilococos, dos quais 11 resistentes à penicilina e 7 à estreptomomicina; 25 estreptococos, dos quais 13 resistentes à penicilina e 13 à estreptomomicina; 7 amostras de *Corynebacterium pyogenes*, das quais 5 resistentes à penicilina e 5 pouco sensíveis à estreptomomicina; 15 germes do grupo coliforme, dos quais 14 resistentes à penicilina e 7 à estreptomomicina; 2 bacilos difteróides, resistentes a ambos os antibióticos. Diversas dessas amostras se comportaram como resistentes tanto à penicilina como à estreptomomicina.

#### SUMMARY

Studies about conduct of 81 microorganisms isolated from cows affected with mastites, in presence of various concentrations of penicillin and streptomycin have been carried out.

The following results could be observed: from 32 staphylococci, 11 were penicillin resistant and 7 were streptomycin resistant; from 25 streptococci, 13 were penicillin resistant and 13 were streptomycin resistant; from 7 samples of *Corynebacterium pyogenes*, 5 were penicillin resistant and 5 were of little sensibility to streptomycin; in a group of 15 coliform germs, 14 were penicillin resistant and 7 were streptomycin resistant. Two difteroid microorganisms were resistant to both antibiotics. Some of strains were penicillin and streptomycin resistents.

#### BIBLIOGRAFIA

- BARBER, M. and ROZWADOWSKA-DOWSENKO, M. — 1948 — Infection by penicillin-resistant staphylococci. *The Lancet*, ii:641-44.
- BONDI JR., A.; E. H. SPAUDING and C. C. DIETZ — 1947 — A routine method for the rapid determination of susceptibility to penicillin and other antibiotics. *Am. Jour. Med. Sci.* 213:221-25.
- JACQUET, M. — 1953 — Mastites et antibiotiques. *Les Cahiers de Médecine Vétérinaire*, XXII — 4:110-11.
- SPINK, W. W.; W. H. HALL e V. FERRIS — 1945 — Clinical significance of staphylococci with natural or acquire resistance to the sulfamides and to penicillin. *J. A.M.A.* 128:555-559.
- TAUNAY, A. E. e SOUZA DIAS, M. C. — 1952 — Contribuição ao estudo da flora bacteriana das sinusites; verificação de sua sensibilidade aos antibióticos. *Rev. do Inst. Adolfo Lutz*, 12:39-45.
- VICENT, J. G. e H. W. VICENT — 1944 — Filter paper disc modification of the Oxford cup penicillin determination. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 55:162-164.