

ANÁLISE GENÉTICA DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM* FERMENTADORAS DE LACTOSE ISOLADAS NO RIO DE JANEIRO

Fernando Portela Câmara, Maria Amélia Cardoso e
Darcy Fontoura de Almeida

Salmonella typhimurium fermentadoras de lactose são comuns em São Paulo, porém, raras no Rio de Janeiro, onde descrevemos dois isolamentos. Um plasmídeo de 7,4 megadáltons, não auto-transferível, termorresistente e não eliminável pelo alaranjado de acridina foi identificado em cada uma das duas linhagens isoladas no Rio de Janeiro. O fato de uma dessas linhagens ser derivada de um plasmídeo que originalmente não expressa o caráter fermentação de lactose, permite-nos especular acerca da origem deste caráter nas Salmonellas brasileiras.

Palavras-chaves: *Salmonella* fermentadoras de lactose. *Salmonella typhimurium*. Plasmídeo. Epidemiologia de *Salmonella*.

Em 1975, Suassuna e cols,¹⁴ comunicaram o isolamento de uma *S. typhimurium* fermentadora de lactose no Rio de Janeiro, em um caso de gastroenterite infantil apresentado como autóctone. Essa linhagem, denominada H975, era resistente ao cloranfenicol, canamicina, cefalotina e sulfadiazina, e não pertencia a fagotipos conhecidos. Exceto pela não resistência à tetraciclina, as características citadas levaram Suassuna e cols¹⁴ a concluir ser a linhagem H975 semelhante àquelas então endêmicas em São Paulo, e que este isolamento poderia significar o início de uma extensão desta situação para o Rio de Janeiro. O caráter fermentação de lactose em *Salmonella* está associado a um plasmídeo de resistência a drogas antibacterianas^{1 10}. Plasmídeos Rlac são provavelmente formados pela inserção de um operon lactose de *Escherichia coli* em um plasmídeo R através de um elemento de transposição⁸.

Outra *S. typhimurium* portadora de um plasmídeo Rlac foi encontrada por Câmara⁴, entre salmonelas lactose-negativas isoladas de esgotos da cidade do Rio de Janeiro⁵. Esta *Salmonella* foi originalmente isolada como lactose negativa, entretanto, notou-se que após 48 horas de incubação as colônias apresentavam papilas vermelhas em agar MacConkey, indicando fermentação ativa de lactose⁴. Estas papilas eram isoladas como clones tipicamente fermentadores de lactose e foram designados como

linhagem E10f enquanto a linhagem original da qual derivou foi designada E10. Toledo e cols¹⁵ relataram o isolamento de *S. typhimurium* semelhantes à E10, em material clínico, na cidade de São Paulo. Esses autores consideraram tais linhagens como "fermentadoras tardias de lactose".

O presente trabalho estuda as propriedades genéticas das linhagens H975 e E10f de *S. typhimurium* isoladas na cidade do Rio de Janeiro, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Bactérias utilizadas – Ver Tabela 1.

Meios utilizados

Foram utilizados o caldo tripton-extrato de levedura (TE)¹² e agar MacConkey (BBL). A seleção dos transconjugantes foi realizada em agar MacConkey seletivo contendo rifampicina (100 µg/ml) e ampicilina (20 µg/ml) ou tetraciclina (40 µg/ml).

Estabilidade do plasmídeo

Foi testada na presença de alaranjado de acridina (50 µg/ml) segundo a técnica de Clowes & Hayes⁶ usando a *E. coli* RV/F⁺lac como controle (com perda do caráter lac acima de 95% na condição indicada). Para testar a termoestabilidade de plasmídeo¹⁶, culturas foram crescidas a 30, 37 e 42°C durante 24 a 72 horas e pelo menos 100 colônias foram testadas pelo método de "replica plating".

Produção de colicina

Foi realizada segundo a técnica de Meynell & Meynell¹¹ usando *E. coli* C600 como linhagem ¹Lac+ Em Ap Cf Ct Sd Tc Cm GmST

Conjugação

Culturas em início de fase log (caldo TE) das linhagens doadoras e receptoras eram diluídas 1:10,

Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro e Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, RJ.

Endereço para correspondência: Prof. Fernando Portela Câmara. Instituto de Microbiologia/UF RJ – Caixa Postal: 68040 – 21944 Rio de Janeiro, RJ.

Recebido para publicação em 10/2/89.

Tabela 1 – Bactérias utilizadas neste trabalho.

Linhagens	Características	Uso	Procedência
<i>S. typhimurium</i> H975	¹ Lac ⁺ Em Ap Cf Ct Sd	doadora	Dr. J. C. Andrade
<i>S. typhimurium</i> E10f	¹ Lac ⁺ Em Ap Cf ⁺ Ct Sd Tc Cm GmST	doadora	Nosso laboratório
<i>E. coli</i> RV/F ⁺ lac	¹ F ⁺ lac/Δ lac _{x74}	doadora	Dr. J. Walker
<i>E. coli</i> C600	² lac thr leu thi	indicadora	Nosso laboratório
<i>E. coli</i> LR-1	² C600 Rf	receptora	Nosso laboratório
<i>P. mirabilis</i> PM51	³ RTF	mobilizadora	Dr. D. Santos

1. fenótipo plasmidial

2. Fenótipo cromossômico

3. Fator de transferência de resistência.

Abreviações: Em, estreptomicina; Ap, ampicilina; Cf, cloranfenicol; Ct, cefalotina; Sd, sulfadiazina; Tc, tetraciclina; Cm, canamicina; Gm, gentamicina; ST, associação sulfametoxazol-trimetropin; lac, lactose; leu, leucina; thr, treonina; thi, tiamina.

misturadas em partes iguais e incubadas a 30 ou 37°C por 2 e 24 horas. Depois disto, eram diluídas convenientemente e plaqueadas em agar seletivo, incubando-se as placas por um período de 24 e 72 horas a 30 ou 37°C. As colônias transconjugantes crescidas eram reisoladas em agar seletivo para confirmação, e eram testadas bioquimicamente pelas provas de indol e H₂S em meio S.I.M. (Merck).

Mobilização do plasmídeo

Cultura das linhagens doadoras e *P. mirabilis* PM51 eram diluídas 1:10, misturadas em partes iguais e incubadas por 8 a 10 horas. Então era adicionado um volume igual de uma cultura diluída 1:10 da receptora *E. coli* LR1, incubando-se a mistura a 37°C por 24 horas. O procedimento de seleção era o mesmo descrito no item acima.

Avaliação do peso molecular do plasmídeo

Os plasmídeos foram isolados segundo a técnica de Guerry e cols⁷ e analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Utilizaram-se os plasmídeos pSF2124 (6,5 megadaltons), Sa (23 Md), RP4 (34 Md) e EntP (54 MD) como marcadores de referência. As distâncias de migrações eram comparadas aos respectivos pesos moleculares em gráfico bilogárfmico.

RESULTADOS

Os clones E10f são estáveis quanto ao caráter lactose-positivo e não revertem para o fenótipo que lhes deu origem, ou seja, E10. Esta última linhagem, de fenótipo lactose-negativo, começa a produzir papilas lactose-positivas após 48 horas (de onde se originam os clones E10f) e esta produção cresce com o tempo, predominando na cultura após 5 ou 7 dias.

O caráter R_{lac} das linhagens H975 e E10f era termostável a 42°C e não era eliminado pelo alarajado de acridina. Nenhuma destas linhagens mostrou-se produtora de colicina.

O caráter fermentação de lactose das linhagens H975 e E10f perdia-se espontaneamente numa frequência abaixo de 1%; entretanto, as colônias resultantes não tinham o fenótipo tipicamente lactose-negativo (de cor branca no agar MacConkey), pois, eram de cor rosa pálida, que nos sugeriu uma variante de fermentação lenta (talvez devido a perda da síntese de permease, uma das três enzimas do operon lactose). Observamos que na linhagem H975 a perda do caráter lac era concomitante ao da resistência à canamicina.

O caráter R_{lac} não era transferível por conjugação, seja na linhagem H975, seja na E10f. Entretanto, em ambas, o plasmídeo R_{lac} foi mobilizado pelo RTF de *P. mirabilis* confirmando-se, portanto, a natureza plasmidial deste caráter. A eletroforese em gel de agarose também confirmou a presença de um plasmídeo único em ambas as linhagens e de mesmo peso molecular nos dois casos, estimado em 7,4 megadaltons, aproximadamente.

Nos experimentos de conjugação acima citados, obtínhamos crescimento numa frequência média de 10⁻⁵, entretanto, estas colônias, julgadas "a priori" transconjugantes, não cresciam nas mesmas placas seletivas quando reisoladas, e os testes bioquímicos revelaram tratar-se das salmonelas doadoras, e não de *E. coli* transconjugantes.

DISCUSSÃO

As linhagens H975 e E10f assemelham-se geneticamente àquelas variantes lactose-positivas isoladas em São Paulo^{1,2}. A linhagem E10 também assemelha-se àquelas descritas como fermentadoras tardias da lactose^{1,5}, também isoladas naquela cidade.

Isto não significa, contudo, que as linhagens aqui descritas sejam originárias de São Paulo. Suassuna e cols¹⁴ descreveram a linhagem H975 em um caso de gastroenterite autóctone no Rio de Janeiro, e a linhagem E10 foi proveniente de isolamento anterior a 1972⁹, pelo menos 1 ano antes de Pessoa¹³ ter relatado o isolamento de uma variante semelhante em São Paulo. Por outro lado, não houve situações epidêmicas no Rio de Janeiro em franco contraste com o que acontecia em São Paulo na década passada². Entretanto, o fenômeno de ativação do operon lactose na linhagem E10 resultando no fenótipo E10f (lactose-positivo) pode indicar uma fonte comum para a origem das variantes lactose-positivas de São Paulo e a linhagem H975 do Rio de Janeiro. As variantes "lactose-tardias" ou formadoras de papilas em agar MacConkey poderiam ser a linhagem prototípica da qual se originaram as variantes lactose-positivas, uma vez que, como já vimos, os clones fermentadores isolados das papilas são geneticamente estáveis. Ocorrendo também no Rio de Janeiro como em São Paulo, o caráter cosmopolita da variante lactose-tardia sofreria pressões seletivas a favor de variantes lactose-positivas, o que poderia ser uma hipótese de partida para se explicar a ocorrência destas em São Paulo e ausência no Rio de Janeiro.

Nos nossos experimentos, os plasmídeos H975 e E10f não foram transferidos por conjugação, sendo demonstrados apenas por mobilização com um RTF. Neste sentido, nossos resultados estão de acordo com os de Le Minor e col¹⁰, que estudaram as variantes lactose-positivas de São Paulo. Por outro lado, plasmídeos de baixo peso molecular tais como os do presente trabalho são geralmente não autotransferíveis³.

SUMMARY

Lactose fermenting Salmonella typhimurium are endemic in São Paulo, but not in Rio de Janeiro. Two isolations are described from the latter city. These Rio de Janeiro strains have a plasmid of 7.4 megadaltons. These plasmids were not auto-transferable, were thermostable and were not eliminated by acridine orange. One of these strains arose from a plasmid that had the lactose operon repressed, leading us to speculate about the evolution of the lactose fermenting character in Brazilian Salmonella.

Key-words: Lactose fermenting *Salmonella*. *Salmonella typhimurium*. Plasmid Epidemiology of *Salmonella*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Afonso MLT, Toledo MRF, Trabulsi LR. Natureza genética da fermentação de lactose em amostras de *Salmonella typhimurium*. Revista de Microbiologia São Paulo 8:110-116, 1977.
2. Almeida PCA, Trabulsi LR. Características culturais, bioquímicas, sorológicas e virulência de amostras de *Salmonella typhimurium* fermentadoras de lactose. Revista de Microbiologia São Paulo 5:27-35, 1974.
3. Broda P. Plasmids. W.F. Freeman Co., Oxford, p. 14-15, 1979.
4. Câmara, FP. Metaestabilidade genética em uma *Salmonella typhimurium* isolada em esgoto do Rio de Janeiro. 11ª Reunião Anual de Genética de Microorganismos, Londrina, p. 35, 1984.
5. Câmara FP, Costa GA, Hofer E, Almeida DF. Drug resistance in *Salmonella* strains isolated from raw sewage in Rio de Janeiro. Revista Brasileira de Biologia 42:421-424, 1982.
6. Clowes RC, Hayes W. Experiments in microbial genetics. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1968.
7. Guerry P, LeBlanc DJ, Falkow S. General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. Journal of Bacteriology 116:1064-1066, 1973.
8. Guiso N, Ullmann A. Expression and regulation of lactose genes carried by plasmids. Journal of Bacteriology 127:691-697, 1976.
9. Hofer E, Costa GA. Investigações sobre a ocorrência de *Salmonella* em esgotos sanitários da cidade do Rio de Janeiro. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 70:221-236, 1972.
10. Le Minor L, Coynault C, Pessoa GVA. Déterminisme plasmidique du caractère atypique "lactose-positif" de souches de *S. typhimurium* et de *S. oranienburg* isolées au Brésil lors d'épidémies de 1971 a 1973. Annales de Microbiologie Paris 125:261-285, 1974.
11. Meynell GG, Meynell E. Theory and practice in experimental bacteriology. Cambridge University Press, Cambridge, 1970.
12. Miller UH. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratories, New York, 1972.
13. Pessoa GVA. Sobre a ocorrência de uma variante de *Salmonella typhimurium* fermentadora de lactose. Revista do Instituto Adolfo Lutz 33:13-28, 1973.
14. Suassuna I, Suassuna IR, Judel VI. Isolamento de *Salmonella typhimurium* fermentadora de lactose, em caso autóctone no Rio de Janeiro. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 9:79-82, 1975.
15. Toledo MRF, Reis MHL, Murahovschi J, Cury R, Ramos SRTS, Fiore ES, Schussel EY, Trabulsi LR. Ocorrência de uma variante de *Salmonella typhimurium* que fermenta a lactose tardiamente. Revista de Microbiologia São Paulo 10:103-105, 1979.
16. Yoshida Y, Terawaki Y, Nakaya R. R plasmids with thermosensitive transferability in *Salmonella* strains from humans. Microbiology and Immunology 22:735-743, 1978.