

## Multirresistência a antimicrobianos mediada por plasmídios R em cepas de *Shigella flexneri* isoladas no nordeste do Brasil

Multiple antibiotic-resistance mediated by R plasmid in *Shigella flexneri* strains isolated in the Northeast of Brazil

José Júlio C. Sidrim, José Luciano B. Moreira, Germana C. Paixão, Sérgio B. Lima, Renato Evandro M. Filho, Marcos Fábio G. Rocha e Aldo Ângelo M. Lima

**Resumo** Em amostras de *S. flexneri*, isoladas no período de 1989 a 1993, foi estudado o mecanismo molecular que mediava a multirresistência. Foram utilizadas no estudo 26 amostras de *S. flexneri*. Estas amostras foram submetidas a teste de sensibilidade a antimicrobianos, experimentos de conjugação e extração de plasmídios. Com relação ao padrão de resistência a antimicrobianos, observou-se que todas as amostras de *S. flexneri* eram resistentes a pelo menos três antimicrobianos. Das 26 amostras de *S. flexneri* doadoras submetidas ao processo de conjugação, 34,6% (9 amostras) resultaram em uma frequência variável de transconjugantes. Das amostras que conjugaram, 100% transferiram o fator de resistência relacionado à ampicilina; sendo que em todas as transconjugantes foi evidenciado apenas um plasmídio de 23,1Kb. Este plasmídio, encontrado em todas as amostras de *Shigellas*, caracterizou-se como o portador de marca de resistência para ampicilina.

**Palavras-chaves:** Multirresistência. Plasmídio. *Shigella*. Epidemiologia.

**Abstract** In *Shigella* strains were studied the molecular mechanism that mediated the multiply antibiotic-resistance. Twenty-six strains of *Shigella flexneri* were utilised in this investigation. These strains were submitted to disk diffusion test, mating experiments and plasmid isolation. In relation to antibiotics resistance standard it was observed that all *Shigella flexneri* strains were resistant to at least, three antibiotics tested. From twenty-six *Shigella flexneri* strains donors submitted to conjugation process, 34.6% (nine strains) resulted in variable frequency of transconjugants. From strains that conjugated, 100 %, transferred the resistance factor acquainted with ampicillin. Being that, in all transconjugants which were observed, just one plasmid with 23.1Kb was evidenced. This plasmid found in all strains was characterised as the causer of resistance to ampicillin.

**Key-words:** Multiply antibiotic-resistance. Plasmid. *Shigella*. Epidemiology.

---

Departamentos de Patologia e Medicina Legal e de Fisiologia e Farmacologia, Unidade de Pesquisas Clínicas do Hospital Universitário Walter Cantídio. Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

Órgão financiador: FUNCAP e CAPES.

Endereço para correspondência: Dr. José Júlio Costa Sidrim. Laboratório de Micologia Médica, Deptº de Patologia e Medicina Legal/UFC. R. Monsenhor Furtado s/nº - Rodolfo Teófilo, Caixa Postal 3163, 60441-750 Fortaleza, CE, Brasil.

Tel: (085) 243-9301; Fax: (085) 295-1736.

E-mail: JBF96@secrel.com.br

Recebido para publicação em 13/06/97.

Disenterias causadas por *Shigella* constituem um importante problema de saúde em países industrializados e em desenvolvimento<sup>4 7</sup>. Apesar de a shigelose ser usualmente autolimitada, a antibioticoterapia efetiva nessa enfermidade reduz a duração e a gravidade da disenteria, podendo diminuir os índices de morbidade e mortalidade<sup>5 18 19</sup>.

Em nosso meio, nos anos oitenta, a terapêutica preconizada para o tratamento das shigeloses era à base de ampicilina; por volta do final desta década e início dos anos noventa, observou-se um aumento significativo de amostras de *S. flexneri* resistentes a este antimicrobiano<sup>8</sup>.

Diante deste fato e reconhecendo-se, como em outras partes do mundo, que a resistência a antimicrobianos é mais freqüentemente mediada por plasmídios R, resolveu-se estudar os mesmos em amostras de *S. flexneri* estocadas, por cinco anos, na bacterioteca da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará.

## MATERIAL E MÉTODOS

*Amostras bacteriana.* Foram inicialmente investigadas 38 amostras de *S. flexneri* que tinham sido isoladas, no período de 10/89 a 02/93, pela Unidade de Pesquisas Clínicas. Tais amostras eram provenientes de materiais clínicos (fezes) de pacientes com diarreia, conforme publicação anterior<sup>8</sup>, que foram monitorados em três localidades diferentes: 21 destas amostras eram provenientes da comunidade Gonçalves Dias, 6 do Hospital Universitário Walter Cantídio e 11 do Hospital Infantil Albert Sabin. Alguns critérios foram utilizados na pré-seleção das amostras a serem empregadas, tais como características bioquímicas, sorológicas e padrão de resistência a drogas antimicrobianas. Ao final, foram selecionadas 26 amostras de *S. flexneri* resistentes a ampicilina.

Foi utilizada como receptora padrão, em experimentos de conjugação, uma amostra derivada de *E. coli* K12, denominada de *E. coli* 711-AN<sup>R</sup> (ou E-711). Esta cepa bacteriana, originalmente albergando um plasmídio R, que mediava resistência para ampicilina<sup>3</sup> passou por um processo de cura para perder este réplicon, de acordo com a metodologia pré estabelecida<sup>5 12</sup>.

*Determinação do padrão de resistência a drogas antimicrobiana.* Em uma determinação inicial dos padrões de resistência a drogas, as

amostras bacterianas estudadas neste trabalho foram submetidas ao teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA), pelo método de Kirby e Bauer<sup>2</sup>, que corresponde à padronização estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Todas as transconjugantes obtidas nos experimentos de conjugação simples foram submetidas ao TSA, segundo a mesma metodologia.

A determinação do nível de resistência de cada amostra do presente estudo, frente à ampicilina e ao ácido nalidixico, foi realizada empregando-se o método de diluição em placa<sup>3</sup>. As concentrações finais obtidas nas placas foram de 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 e 1000µg/ml.

*Transferência de plasmídios por conjugação.* A conjugação de cada amostra doadora com a receptora seguiu a metodologia descrita por Mitsuhashi e cols<sup>10</sup>, onde as amostras doadoras e as receptoras eram cultivadas separadamente em meio líquido (BHI), e após 18 horas, misturavam-se os dois caldos de cultura, reincubava-se então esta mistura bacteriana por 24 horas e selecionavam-se os transconjugantes com o auxílio de antimicrobianos adicionados ao ágar Muller-Hinton, com concentração previamente estabelecida<sup>10</sup>.

*Extração e análise eletroforética de plasmídio.* Este ensaio foi utilizado para verificação do conteúdo plasmidial das amostras bacterianas estudadas, bem como para a determinação do peso molecular aproximado dos plasmídios encontrados em tais amostras.

A extração do DNA plasmidial foi feita através de uma série de etapas que envolveram o crescimento das amostras, a lise bacteriana e o tratamento com substâncias que separam o DNA plasmidial dos outros constituintes celulares, sendo estes tratamentos intercalados por centrifugações que permitiam o isolamento progressivo do DNA, com relação aos outros tipos de moléculas<sup>11 20</sup>. Numa primeira etapa, foram feitas extrações de todas as amostras previamente selecionadas como doadoras, bem como da receptora. Numa segunda etapa, foram feitas extrações das amostras que foram capazes de transferir o(s) plasmídio(s) e dos seus respectivos transconjugantes.

As 26 amostras de *S. flexneri*, a *E. coli* ANRAPS e as transconjugantes obtidas neste trabalho foram analisadas quanto ao seu conteúdo de DNA plasmidial sob eletroforese

em gel de agarose, através do qual foram determinados os pesos moleculares aproximados dos plasmídios de todas amostras deste trabalho, incluindo das transconjugantes. Para tanto, os lisados de tais bactérias foram submetidos à eletroforese em gel de agarose. Com base nas medidas de migração de cada plasmídio, tomadas em fotografia de cada gel, foram construídos gráficos de migração relativa dos plasmídios em estudo, frente aos fragmentos do DNA do fago  $\lambda$  digerido com endonuclease de restrição (Hind III). Estes fragmentos possuíam, respectivamente, os seguintes pesos moleculares: 23,1; 9,4; 6,5; 4,3; 2,3 e 2Kb. Os gráficos para análise dos pesos moleculares dos plasmídios foram construídos em papel Log x Log, conforme descrito por Meyers e cols<sup>9</sup>.

## RESULTADOS

*Padrão de resistência a drogas das amostras de S. flexneri, isoladas no período 1989-1993. As amostras de S. flexneri, quando*

submetidas ao teste de sensibilidade a antimicrobianos, exibiram padrão de resistência variado. Todas as 26 amostras de *S. flexneri* mostraram-se resistentes à associação dos antimicrobianos sulfametoxazol + trimetoprima à ampicilina e à tetraciclina; 23 (88,4%) à carbenicilina e ampicilina + ácido clavulânico; 22 (84,6%) ao cloranfenicol; 3 (11,5%) à tobramicina; 2 (7,6%) à gentamicina e 1 (3,8%) resistente à ceftriaxona, cefalotina, cefuroxima e netilmicina. Já com relação ao ácido nalidíxico, aztreonam, ciprofloxacina, ceftazidima, cefoxitina, cefotaxima, imipenem e amicacina, não foi verificada resistência por parte das amostras testadas. As 26 amostras de *S. flexneri*, quanto ao padrão de resistência a drogas, estão discriminadas nas Figuras 1 e 2.

*Nível de resistência a drogas das amostras de S. flexneri, isoladas no período 1989-1993, e da E. coli 711 ANRAP<sup>S</sup>. Levando-se em consideração os resultados dos antibiogramas, selecionou-se, para estudo do mecanismo de resistência, a ampicilina como droga padrão*

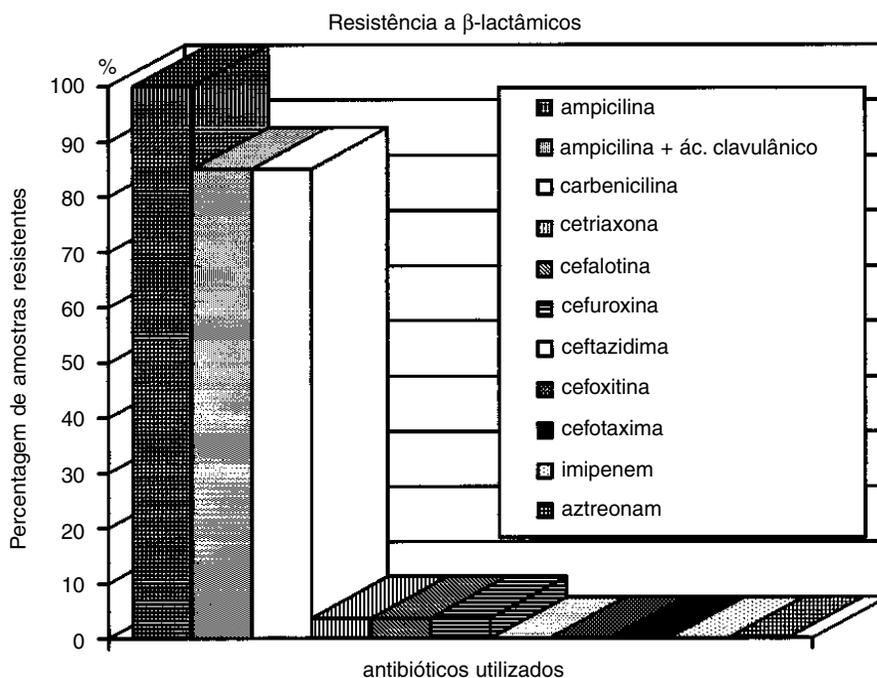


Figura 1 - O gráfico acima ilustra o padrão de resistência das amostras bacterianas aos  $\beta$ -lactâmicos, onde se observa a porcentagem de amostras de *S. flexneri* que mostraram-se resistentes a essas drogas.

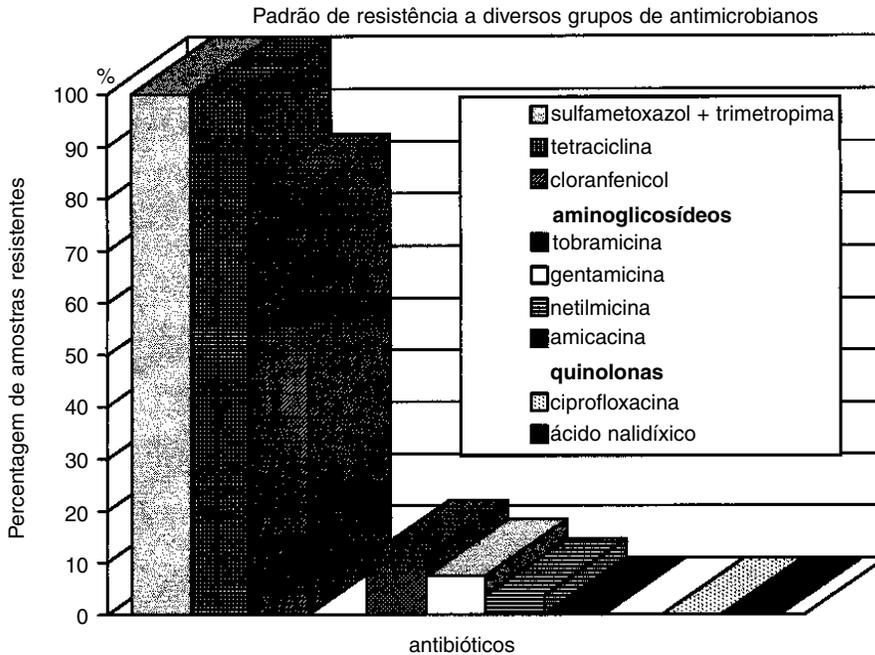


Figura 2 - O gráfico acima ilustra o padrão de resistência das amostras bacterianas ao sulfametoxazol + trimetoprima, cloranfenicol, aminoglicosídeos e quinolonas, onde se observa a porcentagem de amostras de *S. flexneri* que mostraram-se resistentes a estas drogas.

no estudo da resistência bacteriana aos  $\beta$ -lactâmicos. Foi determinado o nível de resistência de cada amostra de *Shigella* frente a esta droga. Foram, portanto, estudadas apenas as amostras sensíveis à ampicilina, num total de 26.

A amostra receptora (*E. coli* 711 ANR APS), conforme era esperado, apresentou sensibilidade à ampicilina, após o processo de cura, não crescendo em níveis iguais ou superiores a 5 $\mu$ g/ml desta droga. Em contrapartida, seu nível de resistência ao ácido nalidíxico mostrou-se elevado, alcançando valor superior a 1000 $\mu$ g/ml.

Com relação ao ácido nalidíxico, as amostras de *Shigellas* apresentaram níveis de resistência, variando de 2 $\mu$ g/ml a 5 $\mu$ g/ml.

*Transferência de plasmídios R de S. flexneri para E. coli 711 ANR APS por conjugação.* As amostras recombinantes, obtidas pelo processo de conjugação entre *S. flexneri* e *E. coli* 711 ANR APS, foram denominadas de Tc mais o número da *Shigella* da qual o plasmídio era proveniente. Todos os plasmídios conjugativos

apresentaram marcas de resistência, sendo que 9 (100%) amostras mostraram-se resistentes à ampicilina; 8 (88,8%) à carbenicilina, tetraciclina e ampicilina com o ácido clavulânico; 7 (77,7%) ao sulfametoxazol + trimetoprim, 3 (33,3%) ao cloranfenicol e apenas 1 (11,1%) à tobramicina. Estes resultados, com as características de resistência aos antimicrobianos, estão expressos na Figura 3.

*Eletroforese dos plasmídios das amostras de S. flexneri e da E. coli 711 ANR APS.* Foram demonstrados plasmídios em todas as amostras de *S. flexneri* estudadas por eletroforese em gel de agarose. Nas amostras S-5, S-8, S-10, S-15, S-18, S-19, S-20, S-22, S-23, S-24 e S-26 foi demonstrado apenas um elemento extracromossômico em cada uma delas; nas demais foram encontrados de dois a seis plasmídios. Já na amostra receptora *E. coli* 711 ANR APS, não foi observado elemento extracromossômico.

*Eletroforese dos plasmídios das amostras transconjugantes.* Das 26 amostras de *S. flexneri*,

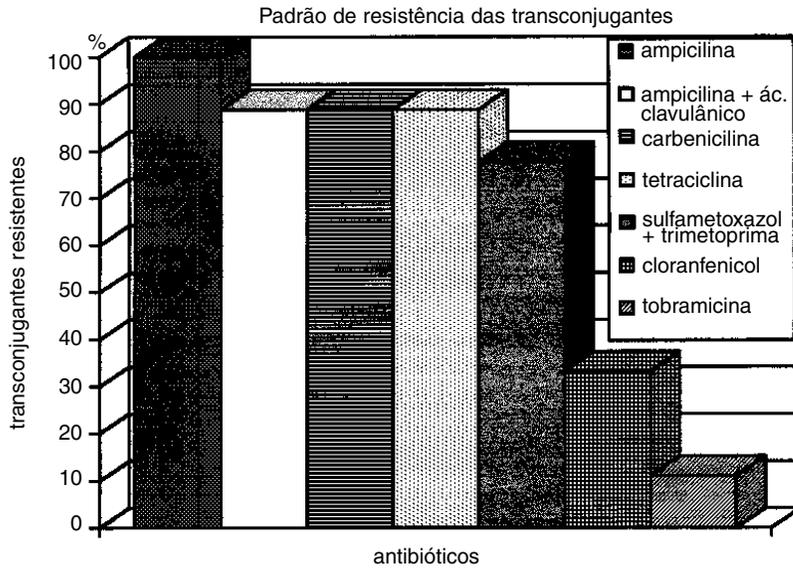


Figura 3 - Neste gráfico, podemos observar a porcentagem de amostras transconjugantes que apresentaram resistência frente aos antimicrobianos testados, evidenciando-se assim a transferência de genes, que codificam resistência da *S. flexneri* para *E. coli* 711 ANRAPS.

9 originaram transconjugantes, sendo observada a transferência de apenas um plasmídeo conjugativo por amostra, exceto para a amostra

Tc-06, que apresentou dois plasmídios conjugativos. A análise de plasmídeo das transconjugantes pode ser observada na

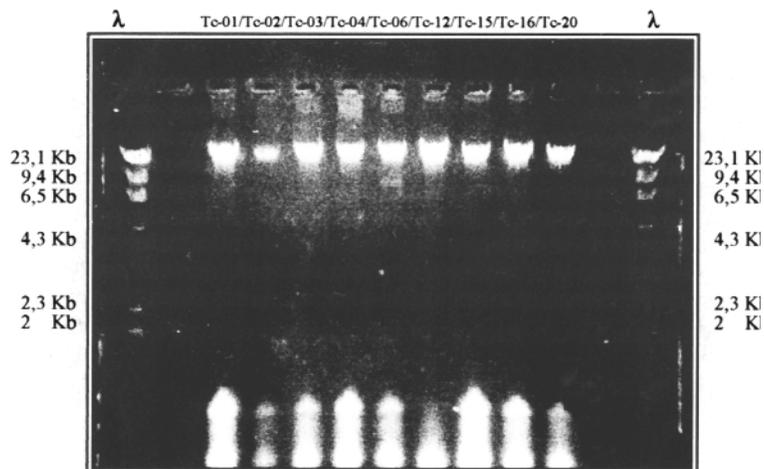


Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose do DNA λ digerido com *Hind* III e dos plasmídios das amostras transconjugantes originadas no experimento de conjugação entre as amostras de *Shigella flexneri* S-01, S-02, S-03...S-25, S-26 e a *Escherichia coli* 711 ANR APS. Os códigos Tc-01, Tc-02...Tc-20 mostram correlação da numeração da transconjugante com a amostra de origem da *Shigella flexneri*.

## DISCUSSÃO

Figura 4.

Das vinte seis amostras utilizadas, 100% apresentaram resistência para apenas três drogas; 23,0% para cinco drogas; 57,6% para seis drogas; 3,8% para sete drogas e 11,5% para oito drogas. Estando, assim, estes resultados compatíveis com achados de vários trabalhos da literatura, nos quais observou-se um aumento significativo no isolamento de amostras de *S. flexneri* multirresistentes<sup>14 15 16 17 22 24</sup>.

Os resultados obtidos podem explicar alguns achados sobre a ocorrência de determinados tipos de enterobactérias resistentes a drogas encontradas em condições naturais. Toledo e cols<sup>23</sup>, pesquisando fatores R em amostras de *Shigella*, verificaram que a resistência a três ou mais drogas era quase sempre decorrente da presença de fatores R nestas bactérias. Sabe-se, por outro lado, que os fatores R não determinam resistência ao ácido nalidíxico, sendo raro o encontro de mutantes resistentes a esta droga<sup>18 21</sup>. Além disso, é extremamente raro encontrar-se resistência por mutação à sulfonamidas + trimetoprima, ampicilina, tetraciclina, carbenicilina, cloranfenicol e tobramicina em enterobactérias, sendo ainda achado comum que a resistência múltipla é, na maioria das vezes, mediada por fatores R<sup>6 13</sup>.

Observamos que todas as amostras de *S. flexneri* são portadoras de pelo menos um plasmídeo, e que as amostras conjugativas apresentaram de 1 a 6 plasmídios, o que nos leva a crer que a múltipla resistência a drogas apresentadas pelas bactérias estudadas deve-se à presença deste(s) plasmídeo(s). Além disso foi observado que todas as amostras de *S. flexneri* apresentavam um plasmídeo grande, apesar da diversidade de número e tamanho dos demais plasmídios de cada amostra. Uma vez que este plasmídeo, com peso molecular em volta de 23,1Kd foi isolado em localidades diferentes, sugere-se que este plasmídeo é epidêmico para as *Shigellas*.

Das 26 amostras de *S. flexneri* doadoras submetidas ao processo de conjugação, 9 (34,6%) amostras resultaram em uma frequência variável de transconjugantes. Como é sabido, quer se trate de plasmídios R ou outros tipos de plasmídios, existem réplicons que são conjugativos, isto é, capazes de promover sua auto-transferência e plasmídios não conjugativos<sup>1</sup>. Embora não tenhamos realizados experimentos

visando abordar esta questão, como a mobilização dos plasmídios, tomamos como base dados da literatura e acreditamos que a não obtenção de transconjugantes em 63,4% das amostras (17 amostras) deve-se ao fato destas apresentarem plasmídios não conjugativos. Isto significa dizer que as amostras de *S. flexneri* doadoras possuíam plasmídios R, que não tinham na sua composição genética o segmento FTR. Sendo assim, as conjugações entre *S. flexneri* e a amostra *E. coli* 711ANRAPS demonstram a existência de dois tipos de plasmídios: conjugativos e não conjugativos.

Pela análise do conteúdo plasmidial, através de eletroforese em gel de agarose das amostras do presente estudo, observamos uma multiplicidade de bandas plasmidiais, com pesos moleculares que variaram de aproximadamente 23,1Kb a 1,7Kb. Apesar disso, não se pode afirmar que cada banda de DNA corresponde a um único plasmídeo, permanecendo indeterminado se algumas bandas corresponderiam a diferentes formas moleculares do mesmo elemento extracromossômico.

Entretanto, em nosso trabalho, observamos uma transmissibilidade de 34,6% dos plasmídios de amostras de *S. flexneri* para *E. coli* 711ANRAPS. A ocorrência exclusiva de transconjugantes, apresentando um padrão de resistência semelhante a pelo menos cinco drogas (ampicilina, sulfametoxazol + trimetoprima, tetraciclina, ampicilina + ácido clavulânico e carbenicilina), e albergando apenas um plasmídeo, com pesos moleculares semelhantes, chama a atenção para a presença de um plasmídeo epidêmico em amostras de *Shigella*, visto que, mesmo não sendo conjugativas todas as amostras, 100% delas apresentaram um plasmídeo com peso molecular semelhante de aproximadamente, 23,1Kb. Este plasmídeo, encontrado em todas as amostras de *Shigellas*, deve ser portador de marca de resistência para ampicilina em 100 % das amostras.

Desta forma, podemos concluir que a ocorrência de multirresistência em uma porcentagem considerável das amostras de *S. flexneri* deve-se à presença de plasmídios R, sendo que o surgimento de transconjugantes foi confirmado, tanto por métodos biológicos, como por métodos físico-químicos. Não obstante, o perfil de resistência a antimicrobianos, mostrado pelos transconjugantes, comprovou a existência de

genes presentes na receptora, que foram oriundos de cada doadora. Diante deste fato, observamos que todas as transconjugantes apresentaram apenas um plasmídeo com o mesmo peso molecular, que eram comuns em amostras de *S. flexneri* e, provavelmente, provenientes das amostras bacterianas componentes da microbiota intestinal. Isto nos leva a crer que a pressão seletiva dos antimicrobianos nestas populações selecionou amostras bacterianas resistentes e que a utilização de novos antimicrobianos pode apresentar um sucesso temporário na batalha contra as bactérias resistentes; no entanto, a resistência é inevitável.

#### AGRADECIMENTOS

Este trabalho só foi possível de ser realizado, graças ao apoio conjunto da Unidade de Pesquisas Clínicas e do Laboratório de Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson ES, Threlfall EJ. The characterization of plasmids in the enterobacteria. *Journal of Hygiene* 72: 471-487, 1974.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* 45:493-496, 1966.
- Gerhardt P, Murray RG, Costilow RN, Nester EW, Wood WA, Krieg NR, Briggs-Phillips G. *Manual of Methods for General Bacteriology*, 1ª edição. American Society for Microbiology, Washington, 1981.
- Henry FJ. The epidemiologic importance of dysentery in communities. *Review of Infectious Diseases* 13: S238-S244, 1991.
- Hoeprich PD, Jordan MC, Ronalda AR. *Infectious Diseases*, 5ª edição, JB Lippincott Company, Philadelphia, 1994.
- Kiehl LLF. A resistência bacteriana. São Paulo, *Rassegna Medicina Cultura*, 1973.
- Levine OS, Levine MM. Houseflies (*Musca domestica*) as mechanical vectors of Shigellosis. *Review of Infectious Diseases* 13:688-689, 1991.
- Lima AAM, Lima NL, Pinho MCN, Barro Jr EA, Teixeira MJ, Martins MCV, Guerrant RL. High frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, streptomycin, chloramphenicol and tetracycline isolated from patients with shigellosis in Northeastern Brazil during the period 1988 to 1993. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 39:256-259, 1995.
- Meyers JA, Sanchez D, Elwell LP, Falcow S. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology* 127:1529-1537, 1976.
- Mitsuhashi S, Harada K, Hashimoto H. Multiple resistance of enteric bacteria and transmission of drug-resistance to other strain by mixed cultivation. *Japan Journal Experimental Medicine* 30:179-184, 1960.
- Nahaie MR, Goodfellow M, Harwood CR. A rapid screening procedure for staphylococcal plasmid. *Journal of Microbiology Methods* 2:730-781, 1984.
- Novic RP. Extrachromosomal inheritance in bacteria. *Bacteriology Reviews* 33:210-263, 1969.
- Novic RP. Plasmids. *Scientific American* 243:77-89, 1980.
- Olukoya DK, Oni O. Plasmid profile analysis and antimicrobial susceptibility patterns of *shigella* isolates from Nigeria. *Epidemiology and Infection*. 105:59-64, 1990.
- Pal SC. Epidemic bacillary dysentery in West Bengal, India. *The Lancet* II:1462, 1984.
- Prieto G, Martinez A, Cepeda I. Prevalencia y evolucion de la resistencia en *shigella* aislada en venezuela. *Revista de Microbiologia* 16:101-112, 1985.
- Prieto CG, Vargas SJ, De Luengo HB. Estudio de la distribución etiológica y susceptibilidad a 31 agentes antimicrobianos, incluyendo ampicilina, sulbactam y tres nuevas quinolonas de 445 cepas de *Shigella* aisladas reciente en venezuela. *Archives Venezolanas de Puericultura y Pediatría* 53:70-78, 1990.
- Salam MA, Bennis ML. Therapy for shigellosis. 1. Randomized double blind trial of nalidixic acid in childhood shigellosis. *Journal of Pediatric* 113:901-907, 1988.
- Salam MA, Bennis ML. Antimicrobial therapy for shigellosis. *Review of Infectious Diseases* 13 (suppl 4):S332-S341, 1991.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Washington, 1989.
- Spratt BG. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 264:388-393, 1994.
- Tiemens KM, Shipley PL, Correia RA, Shields DS, Guerrant RL. Sulfamethoxazol-trimethoprim-resistant *Shigella flexneri* in Northeastern Brazil. *Antimicrobial*

- Agents Chemotherapy 25:653-654, 1984.
23. Toledo MRF, Zuliani ME, Trabulsi LR. Single and transferable resistance among clinically isolated *Shigella* strains. Review of Microbiology 1:1-11, 1970.
24. Varsano I, Eidlitz-Marcus T, Nussinovitch M, Elian I.