

BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS COM FATOR INFECCIOSO DE RESISTÊNCIA A DROGAS, ISOLADAS DE CRIANÇAS EM DOIS HOSPITAIS DO RIO DE JANEIRO^{1*}

MARIA LUIZA PALMEIRA **
CECILIA MARIA G. DA SILVA ***

SUMÁRIO: Enterobactérias com fator infeccioso de resistência a drogas, foram isoladas em fezes de 113 crianças internadas no Instituto de Puericultura da U.F.R.J. e no Hospital Jesus nos períodos 1960-1964 e 1970-1973, verificando-se que 71,6% das crianças excretaram bactérias resistentes, das quais 41,3% a uma única droga e 58,7% a várias drogas.

O fenômeno da resistência a drogas, transmissível, foi descoberto no Japão (^{12, 13}), ficando mais tarde evidenciado que essa resistência poderia ser transferida de *Shigella* e *E. coli* para uma amostra sensível, por conjugação.

Na Inglaterra, DATTA (²) demonstrou a existência de fatores R em amostras de *Salmonella* e, na Alemanha, LEBEK (⁶) isolou *E. coli* enteropatogênica com resistência a seis antibióticos. Desde então um grande número de amostras com fatores de resistência transmissível, ou fatores R, vem sendo isoladas em vários países. No Brasil, trabalhos realizados por FERNANDES e TRABULSI (⁴), PALMEIRA

e colaboradores (^{10, 11}) têm revelado a existência, em nosso meio, de amostras portadoras de fatores R.

Enterobactérias foram isoladas em crianças recolhidas nos dois referidos hospitais do Rio de Janeiro e uma investigação foi planejada não só para verificar, nessas amostras isoladas de processos patológicos, o aparecimento de fator múltiplo de resistência infecciosa a drogas, fatores R, como para determinar o mecanismo de formação dessas resistências.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras bacterianas vieram todas de fontes clínicas. Enterobactérias como *Shigella*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Ae-*

1 Recebido para publicação em 2 de outubro de 1973.

* Trabalho do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia — I.O.C. (FIOCRUZ).

** Pesquisador em Biologia.

*** Bolsista do I.O.C.

robacter, *Bethesda* e *Alkalescens*, isoladas no Instituto de Puericultura da U.F.R.J. e no Hospital Jesus, foram utilizadas como amostras doadoras, e uma amostra padrão de *E. coli* K12, usada como receptora.

MEIOS: O meio líquido empregado nas experiências de conjugação foi o caldo Penassay, segundo fórmula Difco, e como meios sólidos, o de Levine, o agar Muller-Hinton, com 2% de lactose e mais azul de bromotimol, como indicador, além do ágar simples-extrato de carne.

DROGAS: Os antibióticos e quimioterápicos estudados: Tc — cloridrato de tetraciclina (Cynamide Co); Cl — cloranfenicol (Park-Davis); St — sulfato de estreptomicina (Fontoura-Wyeth); Kn — sulfato de kanamicina (Laborterápica Bristol S.A.); Am — ampicilina (Laborterápica Bristol S.A.); He — hetacilina (Laborterápica Bristol S.A.) e Su — sulfadiazina (Spofa United Pharmaceutical Norks-Praha).

NÍVEL DE RESISTÊNCIA A DROGAS: O nível de resistência a drogas apresentado pelos organismos foi determinado segundo o método descrito em trabalhos anteriores⁽¹⁰⁾. O meio de Muller-Hinton empregou-se na determinação da resistência à sulfadiazina.

TÉCNICA DE CONJUGAÇÃO: Amostras de enterobactérias doadoras e receptoras cresceram, separadamente, em caldo Penassay por uma noite, sendo em seguida diluída a 1:100 e crescidas em frascos de Erlenmayer de 200 ml a 37°C, com agitação, até atingir a concentração de 3×10^8 bact/ml. Um volume de 0,8 mililitros da amostra doadora foi misturado a 1,2 mililitros da amostra receptora incubando-se a mistura em banho-maria a 37°C por 24 horas, sem agitação. Diluições em salina foram plaqueadas nos meios seletivos com os antibióticos e a sulfa, usando-se sementeiras em placas sem as drogas como controle.

FREQÜÊNCIA DE TRANSFERÊNCIA: O cálculo da freqüência de transferência do fator R é obtido pelo quociente da divisão do número de células Lac⁺, da amostra receptora que se tornou resistente, pelo número de células Lac⁻ das placas-testemunho, sem antibiótico.

RESULTADOS

As enterobactérias resistentes a uma ou mais drogas foram isoladas da flora intestinal de 113 crianças internadas nos dois hospitais nos períodos 1960-1964 e 1970-1973, com o seguinte resultado: 71,6% das crianças eliminaram bactérias resistentes, das quais 41,3% a uma única droga e 58,7% a várias drogas.

Entre os diversos gêneros de enterobactérias encontramos, mais comumente, resistência múltipla entre amostras de *Echerichia coli*, *Shigella flexnery* e *Salmonella typhimurium*. Todavia, os outros gêneros estudados como *Klebsiella*, *Aerobacter*, *Alkalescens*, *Bethesda*, *Proteus*, *Citrobacter* e *Providencia*, possuíam, também, em proporções sensivelmente menores que em *E. coli*, *Shigella* e *Salmonella*, fatores de resistência.

Essas amostras revelaram que, em sua maioria, são capazes de transferir parte ou todos os marcos de resistência para uma amostra de *E. coli* K12 sensível.

Das dezessete amostras de *Salmonella typhimurium* obtidas no Hospital Jesus, em 1970, dezesseis apresentaram resistência para St-Tc-Cl-Kn-Am-He-Su. Nessas amostras os sete determinantes de resistência não se transferiram como um todo para a amostra receptora por conjugação. A maioria dos conjugantes, 68,7%, revelou resistência para St-He-Am-Su e 25% para Cl-St-He-Am-Su, cuidando ressaltar que tão-somente uma amostra não transferiu seus marcos de resistência para a amostra receptora. Os marcos de resistência para Tc e Kn não foram também transferidos, e com relação às freqüências de transferências dos diversos determinantes de resistência dessas amostras para *E. coli* K12 sensível, em cruzamentos de 24 horas, não se mostraram uniformes. No caso de Am e He foi de 10^{-4} por célula doadora, manifestamente superior às outras drogas cujas freqüências de transferências são da ordem de 10^{-5} para St e Su e 10^{-6} para Cl.

No que concerne ao número de amostras com fator R, isoladas em 1962, foi sensivelmente aumentado, chegando a ultrapassar a 100% em relação às amostras isoladas em 1961.

As resistências mais comumente encontradas entre as amostras com fator R, foram para Su, Am, St, St-Su e Su-Am-He. Assinale-se que até 1961 as resistências mais habitualmente encontradas são do tipo St, Tc, Su e das combinações dessas resistências, tais como St-Tc, St-Su e St-Tc-Su. Em 1962, começaram aparecer amostras resistentes a Am, num total de 48% das amostras testadas, como também resistência para Cl. Dessa data em diante surgiram modelos de resistência do tipo: Su-Am-He, Su-St-Am-He, Su-Tc-Am-He, Su-St-Tc-Am-He, Su-St-Tc-Cl-Am-He e Su-St-Tc-Cl-Kn-Am-He.

Todas as amostras Am resistentes são He resistentes, o que indica estarem estas resistências codificadas por gens ligados, ou que as resistências para Am e He estão provavelmente controladas por um único gen, a julgar pela ausência de segregação entre estas duas resistências, nas experiências de conjugação.

DISCUSSÃO

O principal escopo deste trabalho é verificar a incidência de fatores R entre as amostras isoladas de processos patológicos nos dois hospitais, como também determinar o processo pelo qual essas resistências apareceram nessas populações microbianas sensíveis.

É desconhecido o mecanismo de formação dos fatores R, por ignorarmos se os ascendentes desses fatores são múltiplos ou se eles se originaram uns dos outros em diferentes regiões, havendo WATANABE (12) apresentado a hipótese de que fatores R se desenvolveram como resultado de gens cromossomiais “pescados” por um episomo — RTF.

À evidência, a origem cromossomial dos determinantes de resistência é, no entanto, muito frágil se levarmos em conta que não só o mecanis-

mo de resistência apresentado por esses fatores é, de uma maneira geral, diferente dos de origem cromossomial (15), como igualmente o fato de que os altos níveis de resistência por eles apresentados iriam requerer vários passos mutacionais para serem atingidos.

Ora, se esses determinantes fossem originalmente cromossomiais deveria haver uma afinidade específica entre o fator de transferência e os gens de resistência, os quais seriam “pescados” pelos fatores de transferência. No caso das resistências múltiplas seriam pois, necessárias sucessivas “pescas”, o que torna essa explicação pouco aceitável para aclarar a origem desses determinantes (1).

O que de positivo se sabe, a respeito desses determinantes de resistência, é que são “replicons” independentes, os quais mantêm uma relação reversível com o fator de transferência, podendo portanto existir na célula hospedeira, mesmo com ausência do fator de transferência.

É óbvio o papel do antibiótico no estabelecimento dessas populações resistentes, porquanto já está fora de dúvida não serem os quimioterápicos os responsáveis diretos pelo aparecimento, em número cada vez maior, de amostras com resistência infecciosa. Atualmente já se tem notícia de amostras resistentes isoladas em período pré-antibiótico (15), e nós mesmos já encontramos fatores R para Su e Su-Am-He em amostras de *E. coli* isoladas respectivamente em 1937 e 1945 (trabalho em andamento).

Os quimioterápicos, fora de qualquer dúvida, ajudam a disseminação desses fatores por seleção de bactérias

que carregam fator de resistência, aumentando assim, grandemente, a possibilidade de passagem infecciosa de marcos de resistência para bactérias sensíveis ou mesmo para bactérias já possuidoras de um fator R. Esta seria a explicação aceitável quanto ao aparecimento dos diversos modelos de resistência encontrados.

O estudo por nós realizado demonstra ser notadamente alta, como já foi dito, a taxa de amostras resistentes, 71,6% entre 113 amostras isoladas nas fezes de crianças nos dois hospitais citados da Guanabara.

Até 1961 as resistências encontradas eram do tipo Tc, St e Su e combinações dessas resistências simples. Em 1962, abruptamente, começaram a aparecer resistências para Cl e Am, daí resultando amostras com espectros para Su-St-Tc-Cl e Su-St-Tc-Cl-Am-He, além de amostras com resistência para uma, duas e três drogas.

Em 1970, surgiram no Hospital Jesus dezessete amostras de *Salmonella typhimurium*, com resistência para Su-St-Tc-Cl-Kn-Am-He. Todas elas, segundo dados que nos foram fornecidos por ANDERSON, pertenciam ao mesmo tipo fágico 193, e apareceram de forma explosiva em vários lugares da América do Sul, o que o levou a concluir serem as mesmas provenientes de uma única amostra que se teria propagado por um processo epidêmico.

A alta frequência de isolamento de amostras possuidoras de fatores R, especialmente para três e quatro antibióticos, e os modelos de resistência encontrados, parecem indicar terem essas amostras se desenvolvido, certamente, como resultado de mutação seguida de seleção em um meio no

qual o uso indiscriminado das drogas há de, forçosamente, determinar a sobrevivência dos organismos possuidores de fatores R com resistência múltipla, além de que fatores R cada vez mais complexos seriam, então, sintetizados pela adição de novos gens de resistência por transferência conjugacional.

Se resistência múltipla infecciosa se desenvolve na natureza, por esse mecanismo, será possível concluir que novos fatores R se formarão pela incorporação de um número cada vez maior de marcos de resistência a drogas, o que irá determinar, no futuro, sérios problemas à quimioterapia.

Poucas são as informações sobre incidência de fatores R em bactérias normais do intestino de pessoas sadias, como também não nos foi possível obter dados quanto à procedência das amostras testadas, isto é, se já estariam presentes no trato intestinal antes da admissão, ou se foram adquiridas nos próprios hospitais.

A ocorrência de resistência múltipla a drogas em enterobactérias patogênicas, isoladas nos dois hospitais examinados, está bem documentada, parecendo indicar que as enterobactérias com fatores R são, possivelmente, as responsáveis pelo número cada vez maior desses microrganismos nas infecções adquiridas em hospitais. Essa possibilidade é assunto de futura investigação.

SUMMARY

Enterobacteriae with R factor were isolated from faeces of 113 children interned in the Instituto de Pue-

ricultura da U.F.R.J. and Hospital Jesus in the periods of 1960-1964 and 1970-1973. The results obtained show that a high percentage of the children

71,6% eliminated resistant bacterias of wich 41,3% was resistant to one drug and 58,7% was resistant to various drugs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — ANDERSON, E. S., 1968, The ecology of transferable drug resistance in the Enterobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 22: 131-180.
- 2 — DATTA, N., 1962, Transmissible drug resistance in an epidemic strain of *Salmonella typhimurium*. *J. Hyg. (Camb)*. 60: 301-310.
- 3 — DATTA, N., 1969, Drug resistance and R factors in the bowel bacteria of London patients before and after admission to hospital. *Brit. Med. J.* 2: 407-411.
- 4 — FERNANDES, M. R. F. & L. R. TRABULSI, 1968, Infections resistance in pathogenic enteric organisms isolated in S. Paulo. *Rev. Inst. Med. Trop. S. P.* 10: 52-53.
- 5 — ISENBERG, H. D. & J. I. BERKMAN, 1971, The role of drug-resistant and drug-selected bacteria in nosocomial disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 182: 52-58.
- 6 — LEBEK, G., 1963, Under die Entstehung mehr fachre sistenter Salmonellen. Ein experimenteller Beitrag. *Zentr. Bakteriol. Parasitenk. Abt. I. Orig.* 188: 494-505.
- 7 — MITSUHASHI, S., H. HASHIMOTO, R. EGAWA, T. TANAKA & Y. NAGAI, 1967, Drug resistance of Enteric Bacteria — IX — Distribution of R factors in Gram-negative bacteria from clinical sources. *J. Bacteriol.* 93: 1242-1245.
- 8 — MOORHOUSE, E. C. & L. MCKAY, 1968, Hospital study of transferable drug resistance. *Brit. Med. J.* 2: 741-742.
- 9 — MOORHOUSE, E. C., 1969, Transferable drug resistance in Enterobacteria isolated from urban infants. *Brit. Med. J.* 2: 405-407.
- 10 — PALMEIRA, M. L., P. R. BATALHA & V. L. P. GOMES, 1971, Sobre o aparecimento de resistência múltipla aos antibióticos e quimioterápicos em amostras de *Shigellas* isoladas no Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 69, fasc. 1: 145-152.
- 11 — PALMEIRA, M. L., 1972, Capacidade receptora de *Salmonella typhi* a fatores R. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* Tomo 70, fasc. 1: 89:95.
- 12 — WATANABE, T. & T. FUKASAWA, 1961a, Episome-mediated-transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae — I Transfer of resistance factor by conjugation. *J. Bacteriol.* 81: 669-678.
- 13 — WATANABE, T., 1963, Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev.* 27: 87-115.
- 14 — WATANABE, T., C. OGATA & S. SATO, 1964b, Episome-mediated-transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae — VIII — Six-drug resistance R factor. *J. Bacteriol.* 88: 922-928.
- 15 — WATANABE, T., 1971, The origin of R factors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 182: 126-140.