

SÔBRE O APARECIMENTO DE RESISTÊNCIA MÚLTIPLA AOS ANTIBIÓTICOS E QUIMIOTERÁPICOS EM AMOSTRAS DE SHIGELAS ISOLADAS NO RIO DE JANEIRO¹*

MARIA LUIZA PALMEIRA, ** PAULO DE P. BATALHA, ***
VERA LÚCIA P. GOMES ****

INTRODUÇÃO

Muitos caracteres bacterianos, tais como produção de colicina, resistência a antibióticos, sexualidade em *Escherichia coli* (6), bacteriófagos lisogênicos, produção de hemolisina (14) ou enterotoxinas (15) e outros, parecem ser determinados por gens transportados por episomas, os quais podem transferir-se de uma bactéria para outra através do fenômeno da conjugação, conforme já demonstraram vários pesquisadores.

No caso particular da resistência múltipla aos antibióticos e quimioterápicos pelas enterobactérias, os fatores responsáveis por essa resistência (fatores R) são episomas, os quais também condicionam resistência a outros agentes como: bacteriófagos, colicinas (5), sais de metais pesados (mercúrio, níquel e cobalto) (13), e irradiação ultravioleta (10).

O reconhecimento de que enterobactérias carregam episoma responsável pela resistência múltipla a drogas, estimulou inicialmente, o estudo desse fenômeno sob o ponto de vista médico. Porém, mais recentemente, com os trabalhos de WATANABE & FUKASAWA (17), MITSUHASHI, HARADA & HASHIMOTO (11) e outros, a atenção dos geneticistas foi orientada para esse interessante problema (18).

A descoberta de que bactérias portadoras de resistência múltipla a drogas, poderiam transferir esta resistência, por conjugação, para amostras não patogênicas de *Escherichia coli*, (1, 3, 11, 17) e outras bactérias (7), como ainda para *Vibrio comma*, *Proteus* e *Serratia*, resultou

¹ Recebido para publicação a 17 de julho de 1970.

* Trabalho da Seção de Bacteriologia

** Pesquisador em Biologia

*** Estagiário na Seção de Bacteriologia. Ex-bolsista do IOC

**** Estagiária na Seção de Bacteriologia.

dos estudos sôbre o comportamento de shigelas isoladas no Japão (19). O aumento progressivo da resistência múltipla a drogas em shigelas, isoladas nesse país, vem constituindo um sério problema de saúde pública, uma vez que nos indivíduos portadores de tais germens, essa resistência pode ser transferida a outras bactérias presentes no trato intestinal. Outrossim, embora a transferência dos fatores R ocorra, normalmente, em menor freqüência "in vivo" que "in vitro", devido à presença de agentes inibidores, tal transferência, todavia, pode ser acelerada sob a pressão seletiva dos quimioterápicos e antibióticos.

No tocante à distribuição geográfica dos fatores R não está circunscrita ao Japão, tendo sido assinalados nos Estados Unidos, na Inglaterra por DATTA (3), na Alemanha Ocidental por LEBEK (9). No Brasil, o trabalho de FERNANDES e TRABULSI (4) mostrou a existência destes fatores de resistência múltipla em amostras isoladas em São Paulo.

Com a finalidade de melhor conhecimento do problema, procuramos estudar as amostras de shigelas isoladas na Guanabara, comparando com os dados obtidos por outros pesquisadores.

MATERIAL E MÉTODOS

O meio líquido usado em tôdas as experiências de conjugação foi o caldo Penassay, segundo fórmula do Difco. O caldo simples foi usado para repique das amostras, quando se pretendia determinar a resistência média aos antibióticos e quimioterápicos. Os meios sólidos empregados foram: o meio de Levine, o agar Mueller-Hinton, com 2% de lactose e azul de bromotimol como indicador, além do agar simples-extrato de carne. Os antibióticos e quimioterápicos estudados foram: cloridrato de tetraciclina (Cyanamide Co.), cloranfenicol (Park-Davis), sulfato de estreptomicina (Fontoura-Wyeth), sulfato de Kanamicina (Laboratório-ca-Bristol S. A.) e sulfaguanidina (Spofa United Pharmaceutical Norks-Praha).

Tôdas as substâncias foram diluídas em água destilada estéril, de modo a se ter uma concentração de 1.000 microgramas por mililitro.

O estudo foi feito com 74 amostras de *Shigella flexneri*, 20 de *Sh. sonnei* e 18 de *Sh. dysenteriae* num total de 112 culturas de shigelas isoladas em áreas urbanas do Rio de Janeiro, no período de 1950-1969. Tais amostras serviram como doadoras, enquanto culturas-padrão de *Escherichia coli* K₁₂; F⁻ e Hfr foram empregadas como receptoras sensíveis.

DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA MÉDIA DAS AMOSTRAS DOADORAS E RECEPTORAS

Culturas de shigelas e *E. coli* crescidas em caldo simples a 37°C por 24 horas foram diluídas a 10⁻⁵ em solução de salina estéril, semeando-se 0,1 de mililitro desta diluição em placas de agar nutritivo, contendo

várias concentrações do antibiótico. A concentração da droga, na qual o número de colônias desenvolvidas aproximou-se ao da placa sem o antibiótico, foi tomada como a resistência média da cultura.

CONJUGAÇÃO BACTERIANA

Para seleção de conjugantes resistentes, usamos a seguinte técnica: culturas das amostras doadoras (Lac -) e receptoras (Lac +) repicadas e incubadas uma noite a 37°C em caldo Penassay, foram diluídas separadamente a 1:10 no referido caldo e a seguir misturadas na proporção de 1:10 (doadoras: receptoras). Após quatro horas a 37°C, a mistura foi diluída em série e 0.1 de mililitro das várias diluições plaqueadas em meio de Levine, contendo 10 microgramas por mililitro de estreptomicina (Sm), 25 microgramas por mililitro de tetraciclina (Tc), 25 microgramas por mililitro de cloranfenicol (Cm), 50 microgramas por mililitro de kanamicina e no mesmo meio sem antibióticos.

Para a seleção dos conjugantes resistentes à sulfa, usamos o meio de Mueller-Hinton com 100 microgramas por mililitro de sulfaguandina (Su).

As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas.

De cada placa foram isoladas dez colônias (Lac +) características das culturas receptoras, que se tornaram resistentes por conjugação. Essas colônias foram testadas para verificação da resistência às outras drogas.

TAXA DE RESISTÊNCIA

A determinação da taxa de resistência foi feita calculando-se o quociente obtido pela divisão do número de colônias (Lac +) da amostra receptora resistente às drogas, pelo número de colônias (Lac -) nas placas-testemunha, sem antibiótico.

ELIMINAÇÃO DO FATOR R POR TRATAMENTO COM ACRIDINA ORANGE

As culturas, com fator de resistência, foram semeadas em caldo Penassay, pH 7,6 contendo 30 microgramas de acridina orange. Depois de incubadas por 24 hs, a 37°C, foram diluídas e plaqueadas em agar nutritivo. Das colônias obtidas selecionavam-se vinte que eram suspensas, separadamente, em um mililitro de salina e repicadas em agar nutritivo, contendo 10 microgramas por mililitro de Sm, 25 microgramas por mililitro de Cm, 25 microgramas por mililitro de Tc para o isolamento dos clones sensíveis às drogas (18).

RESULTADOS

Das 112 culturas de Shigelas estudadas, 16% possuíam fator infeccioso de resistência. O tipo predominante de resistência múltipla foi para Sm e Su encontradas em 6 amostras, e para Sm, Tc, e Su encontradas em 5 amostras de *Shigella flexneri*. Outras combinações registraram-se, em que os modelos de resistência foram para Sm, Cm e Su, para Sm, Tc e Su e para Kn, Sm, Cm, Tc e Su. Resistência infecciosa a um único antibiótico, não foi encontrada entre as culturas.

As amostras de shigelas, com fator de resistência, foram também provadas com kanamicina e, apenas, uma apresentou resistência infecciosa a êsse antibiótico (Tabela I).

Das 112 culturas testadas, notou-se predominância de resistência a três, quatro e cinco drogas no grupo *flexneri*.

TABELA I

Modelos de resistência encontrados

	N.º de Amostras	% DE AMOSTRAS RESISTENTES								
		Sm	Tc	Cm	Sm Su	Tc Su	Sm Cm Su	Sm Tc Su	Sm Tc Cm Su	Kn Sm Cm Tc Su
1950 a 1959	51	0	0	0	7,8	0	0	1,9	0	0
1960 a 1969	61	0	0	0	3,2	0	3,2	4,9	8,1	1,6
TOTAL	112	0	0	0	11,0	0	3,2	6,8	8,1	1,6

Essas resistências foram transferidas por meio da conjugação para *E. coli* K₁₂, *E. coli* F⁻ e *E. coli* Hfr.

A freqüência de transferência dêsse fator de resistência foi afetada pela presença do fator F nas células receptoras, tornando-se maior em F⁻ e menor em Hfr e F⁺ conforme a tabela II.

TABELA II
Frequência de transferência do fator de resistência

Culturas resistentes	Culturas sensíveis	Ocorrência de transferência	Frequência de transferência
<i>Shigela flexneri</i> Cm Tc Sm Kn Su	<i>E. coli</i> K ₁₂	+	1,5 X 10 ⁻³
<i>Shigela flexneri</i> (Cm, Tc, Sm, Su)	<i>E. coli</i> F ⁻ <i>E. coli</i> Hfr <i>E. coli</i> K ₁₂	+ + +	0,6 X 10 ⁻¹ 2,4 X 10 ⁻³ 1,9 X 10 ⁻³
<i>Shigela flexneri</i> (Sm, Tc, Su)	<i>E. coli</i> K ₁₂	+	9,7 X 10 ⁻³
<i>Shigela flexneri</i> (Sm, Su)	<i>E. coli</i> K ₁₂	+	1,7 X 10 ⁻³

EFEITO DA ACRIDINA ORANGE NA ELIMINAÇÃO DO FATOR R

Os fatores de resistência múltipla a drogas, das amostras de *Shigella flexneri*, foram eliminados, tratando-se as células resistentes pela acridina orange. A frequência das células sensíveis após ação da acridina orange foi de 3,3%.

DISCUSSÃO

A numerosa bibliografia, que se vem acumulando nos últimos anos, tem confirmado dois fatos de extrema importância: a presença de um fator episomático de resistência nas amostras com resistência múltipla (19); e a transferência desse fator "in vitro" ou "in vivo" através do mecanismo genético da conjugação (17).

A presença universal deste fator, em população de entero-bactérias, expressa uma importante questão de saúde pública, já que essa resistência múltipla envolve os quimioterápicos e antibióticos mais eficientes usados na terapêutica das doenças entéricas.

Apesar dos estudos acuradamente procedidos em diversos países sobre esses fatores infecciosos de resistência, até o presente momento não se tornou possível, na prática, impedir o aparecimento da resistência conferida por tais fatores.

A simples presença no trato intestinal de bactérias, não patogênicas e possuindo fatores de resistência, poderá determinar, pelo fenômeno da conjugação, uma transferência de tais fatores às bactérias patogênicas, tornando-as resistentes a vários antibióticos e quimioterápicos. É interessante observar, que na década de 60-69 a incidência de amostras de shigellas com resistência múltipla, sofreu no Rio de Janeiro um aumento de cerca de 11,5% em relação ao período anterior.

O problema da resistência múltipla aos antibióticos e quimioterápicos no Rio de Janeiro, assemelha-se em alguns aspectos, ao que se observa em S. Paulo, bem como em outros países (3, 9, 12, 17).

Os nossos resultados mostram grande identidade com os encontrados no Japão, em que o modelo mais comum de resistência foi para Sm, Tc, Cm e Su, simultaneamente. Quanto ao modelo St, Tc e Su, descrito como raro no Japão, foi por nós encontrado em 6,8% das amostras estudadas.

No que diz respeito à resistência à kanamicina e neomicina de amostras isoladas em S. Paulo (4), os resultados se aproximam dos obtidos na Alemanha Ocidental (9), onde a partir de 1959, amostras neomicina resistentes, aparecem com frequência cada vez maior.

Este fato foi raramente encontrado por nós, no Rio de Janeiro (1,6% das amostras estudadas), e já referido como muito pouco frequente por DATTA (3) e CARPENTER e DRABBLE (2) na Inglaterra e por WATANABE (20), no Japão.

Tais divergências podem ser explicadas pelo uso intensivo desses antibióticos no tratamento de infecções entéricas, como ocorreu na Alemanha Ocidental.

Ainda em relação à resistência à kanamicina e neomicina, é interessante observar que, segundo WATANABE, os marcos genéticos para resistência à kanamicina e neomicina não segregam independentemente. Isto sugere que os determinantes genéticos para a resistência a essas drogas estão muito próximos ou, ainda, que a resistência à kanamicina e neomicina é controlada por um único determinante genético e em decorrência deste fato, na prática, quando uma bactéria é resistente à neomicina, também o é à kanamicina.

RESUMO

O aparecimento de shigellas, com resistência múltipla a drogas, se apresenta no Rio de Janeiro com idêntica gravidade já registrada em outros países. No período de 1950-1959, em 51 amostras testadas, 9,8% apresentaram resistência infecciosa a várias drogas, enquanto no período 1960-1969 a percentagem elevou-se a 21,3% em 61 amostras.

Das 112 culturas de shigellas testadas, 74 eram *flexneri*, 20 *sonnei* e 18 *dysenteriae*, notando-se predominância de resistência a três, quatro e cinco drogas no grupo *flexneri*.

SUMMARY

The appearance of *Shigella* with multiple resistance to drugs, turned up in Rio de Janeiro with identical gravity to that already resistance in other countries.

In the period 1950-1959, in 51 strains tested, 9,8% showed infectious resistance to one and various drugs, while in the period 1960-1969, the percentage, rose to 21,3% in 61 strains. Of 112 strains of *Shigella* tested, 74 were *flexneri*, 20 *sonnei* and 18 *dysenteriae*, is being noted the predominance of resistance to 3,4 and 5 drugs in conjunction with the others in the *flexneri* group.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — AKIBA, T., KOYAMA, K., ISHIKI, Y., KIMURA, S. & FUKUSHIMA, T., 1960, On the mechanism of the development of multiple drug-resistant clones of *Shigella*. *Japan J. Microbiol.* 4 : 219-227.
- 2 — CARPENTER, K P. & DRABBLE, W. T., 1965, Transferable antibiotic resistance. *Br. Med. J.* ii, 1553.
- 3 — DATTA, N., 1962, Transmissible drug resistance in an epidemic strain of *Salmonella typhimurium*. *J. Hyg.* 60 : 301-310.
- 4 — FERNANDES & TRABULSI, 1968, Infections resistance in pathogenic enteric. Organisms isolated in S. Paulo. *Inst. Med. Trop. S. P.* 10 : 52-53.
- 5 — FREDERICQ, F., 1957, "Colicins". *Annu Rev. Microbiol.* 11 : 7-22.
- 6 — HAYES, W., 1957, The kinetics of the mating process in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 16 : 97-119.
- 7 — HARADA, K., SUZUKI, M., KAMEDA, M. & MITSUHASHI, S., 1960, On the drug resistance of enteric bacteria — 2. Transmission of the drug-resistance among Enterobacteriaceae. *Japan J. Exptl. Med.* 30 : 289-299.
- 8 — HIROTA, T., 1960, The effect of acridine dyes on mating type in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 46 : 57-64.
- 9 — LEBEK, G., 1963, Ueber die Entstehung mehrfachresistenter Salmonellen. Ein experimenteller Beitrag. *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk — Abt. I Orig.* 188 : 494-505.
- 10 — MARSH E. B. & SMITH, D. H., 1969, R Factors improving survival *E. coli* K₁₂ after ultraviolet irradiation. *J. Bacteriol.* 100 : 128-139.
- 11 — MITSUHASHI, S., HARADA, K. & HASHIMOTO, H., 1960, Multiple resistance of enteric bacteria and transmission of drug-resistance to other strains by mixed cultivation. *Japan. J. Exptl. Med.* 30 : 179-184.
- 12 — NAKAYA, R., NAKAMURA, A. & MURATA, Y., 1960, Resistance transfer agents in *Shigella*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3 : 654-659.
- 13 — SMITH, D. H., 1967, R. Factor mediate resistance to mercury, nickel and cobalt. *Science* 156 : 1114.
- 14 — SMITH, H. W. & HALLS, S., 1968, The transmissible nature of the genetic factor in *E. coli* that controls hemolysin production, *J. Gen. Microbiol.* 47 : 153-161.
- 15 — SMITH, H. W., HALLS, S., 1968, The transmissible nature of the genetic factor in *E. coli* that controls enterotoxin production. *J. Gen. Microbiol.* 52 : 219-334.

- 16 — WATABANE, T., & FUKASAWA, T., 1960, Resistance transfer factor an episome in Enterobacteriaceae. *Biochem, Biophys. Res. Commun* 3 : 660-665.
- 17 — WATANABE, T. e FUKASAWA, T., 1961a, Episome-mediated — transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. I — Transfer of resistance — factor by conjugation. *J. Bacteriol.* 81 : 669-678.
- 18 — WATANABE, T. e FUKASAWA, T., 1961b, Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. II — Elimination of resistance factors with acridine dyes. *J. Bacteriol.* 81 : 679-683.
- 19 — WATANABE, T., 1963, Infective heredity of Multiple drug-resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev.* 27 : 87-115.
- 20 — WATANABE, T., AGATA, C. & SATO, S., 1964, Episoma-mediated transfer of drug resistance em Enterobacteriaceae. VIII — Six drug resistance R. factor. *J. Bacteriol.* 88 : 922-928.