

## NÍVEIS DE SENSIBILIDADE DE ENTEROBACTÉRIAS, EM PARTICULAR SALMONELLA TYPHI, A RIFAMICINA S.V. (\*)

Ivone R. Suassuna \*\* I. Suassuna e C. E. de V. Serpa

*Em face à predominante eliminação biliar da rifamicina S.V. atingindo concentrações muitas vezes superiores aos níveis séricos obtidos com as doses terapêuticas, e pelo possível interesse dessa verificação para o tratamento dos portadores biliares crônicos de Salmonella typhi determinou-se a concentração mínima inibitória de 165 estirpes de enterobactérias, incluindo 77 amostras de S. typhi.*

*Foi verificado que a maioria das cepas de Escherichia coli, Shigella e Proteus mirabilis correspondiam a uma concentração inibitória mínima entre 33 a 65 µg/ml. Entre 65 e 128 µg/ml foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas da maioria das outras espécies de Proteus, de Providencia e de Klebsiella. Para Salmonella e Enterobacter o limite mínimo de sensibilidade foi, em regra, igual ou superior a 128 µg/ml.*

*Diferenças mais acentuadas de comportamento entre as enterobactérias foram observadas quanto à ação bactericida da rifamicina S.V. De uma maneira geral, para E. coli e Shigella, as concentrações bactericidas observadas corresponderam ou muito se aproximaram das concentrações inibitórias mínimas já referidas. Para as espécies de Proteus e Providencia houve variação maior de comportamento, mas tendência a que o efeito bactericida fosse encontrado em concentrações que correspondiam a 4 vezes as bacteriostáticas para as mesmas espécies. Finalmente, de modo pouco feliz para os propósitos visados, em Salmonella, com a inclusão de S. typhi, não foi atingido um efeito bactericida, com as mais altas concentrações usadas as quais corresponderam em média a 6 vezes as concentrações bacteriostáticas para esse gênero.*

Desde os primeiros trabalhos sobre o novo grupo de antibióticos, coletivamente designados como as rifamicinas, assinalava-se o contraste da relativa resistência das bactérias Gram-negativas, em confronto com a extrema sensibilidade dos microrganismos Gram-positivos. Todavia foi possível verificar que alguns grupos de bactérias Gram-negativas eram inibidas por concentrações de rifamicina, passíveis de serem atingidas nos esquemas terapêuticos, como demonstrado pelos testes de sensibilidade *in vitro*. Em trabalho anterior (14), assinalávamos esse fato, comentando que devido à pequena série de

amostras de germes Gram-negativos que havíamos examinado, os nossos resultados apenas sugeriam que fossem revistos os dados sobre a ineficácia da rifamicina S.V. sobre essas bactérias. Antecipávamos, no entanto, a possibilidade de que o seu uso no combate a bactérias Gram-negativas, possivelmente limitar-se-ia às infecções do trato biliar, em face aos dados conhecidos sobre a farmacologia desse antibiótico.

Se bem que a introdução da rifampicina, um novo derivado das rifamicinas, tenha ampliado essa possibilidade, no que diz respeito à rifamicina S.V. ela persiste

\* Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

\*\* Chefe de Pesquisa do Conselho Nacional de Pesquisas.

tiu e, aparentemente, tornou-se pacífica diante de investigações clínicas e laboratoriais realizadas (11).

As verificações iniciais sobre o espectro de ação da rifamicina S.V. revelaram níveis de sensibilidade variáveis para enterobactérias, os mais elevados atingindo até 500 µg/ml para diversos grupos, e particularmente *Salmonella*, incluindo *S. typhi* (16, 4, 17). Todavia, descreveram Timbal & Brega (15) que ainda assim, as infecções experimentais provocadas no camundongo por microrganismos altamente resistentes como *Klebsiella* e *S. typhimurium* mostraram um retardo da taxa de mortalidade, embora não ocorresse a cura da infecção. Por outro lado, estudos farmacológicos sobre a rifamicina S.V. demonstraram que 90% de sua eliminação faz-se por via biliar (8) e que níveis tão altos quanto 2.000 µg/ml podem ser atingidos na bile, no homem (5), graças sobretudo a um ciclo entero-hepático que sustenta essas altas concentrações por períodos prolongados (1).

Tais fatos indicaram a necessidade de melhor ser definida a sensibilidade das enterobactérias, quase todas agentes potenciais e freqüentes de infecções das vias biliares, destacando-se a possibilidade de sua ação sobre a *Salmonella typhi*, como do mais alto interesse do ponto de vista da Saúde Pública, pela freqüência dos portadores crônicos, eliminadores biliares desses germes, os quais têm resistido a todas as medidas terapêuticas mesmo em face à introdução sucessiva de diferentes antibióticos (2, 3, 6, 9, 10, 12).

Por êsse motivos foram feitas verificações quanto ao nível de sensibilidade de 165 amostras de *Enterobacteriaceae*, 77 correspondentes a *S. typhi* e 88 sendo representativas dos gêneros e espécies mais importantes da família.

#### MATERIAL E MÉTODOS

*Origem das amostras* — Oitenta e oito amostras de enterobactérias representativas de todos os grupos ou espécies, incluídos na família, exceto *Serratia*, *Citrobacter* e *Arizona* correspondiam a amostras de coleção, mantidas em laboratório há longo tempo.

Essas incluem 5 amostras de *Shigella*, correspondentes a uma amostra de *Sh. dysenteriae*, de *Sh. flexnerii* e de *sonnnei* e duas de *Sh. boydii*. Entre os *Enterobac-*

*ter*, incluíam-se *E. cloacae* (2), *E. liquefaciens* (2) e *E. aerogenes* (1). Quanto a *Salmonella*, 5 correspondiam a diversos sorotipos (*S. montevideo*, *S. Newport*, *S. muenchen*, *S. kottbus* e *S. paratyphi A*) e 9 *S. typhi*. Excluídas as amostras de *Salmonella* acima referidas, 36 amostras de *S. typhi* foram isoladas cu identificadas no nosso laboratório e 32 foram recebidas do Dr. Gobert A. Costa (Instituto Oswaldo Cruz) por êle identificadas e provenientes das cidades do Recife, Salvador e Porto Alegre, além da Guanabara. Nove outras amostras correspondiam a *S. typhimurium* (8) e *S. paratyphi B*, estudadas no nosso laboratório. Os outros grupos de enterobactérias são os referidos na Tabela 1, dos resultados.

*Teste de sensibilidade* — Quanto à determinação de efeito bacteriostático, foi utilizada a técnica de diluição seriada em meio líquido, de acordo com as instruções de Grove & Randall (7) usando-se um inóculo correspondente a 1/1000 de uma cultura de 24 hs., em caldo da mesma composição do que foi utilizado no teste. A leitura dos resultados foi realizada após 24 e 48 horas de incubação a 37°C, interpretando-se como concentração inibitória mínima (C.I.M.) a que revelava ausência completa de crescimento. Não havendo diferença substancial de interpretação quando comparados os dois tempos de leitura, salvo muito poucas amostras que revelaram diferença de uma única diluição, foram considerados apenas os resultados obtidos com 24 horas. Foi usada sempre como controle a amostra ATCC 6538 de *Staphylococcus aureus*.

Para evidenciar a dose bactericida, da C.I.M. e de todas as diluições imediatamente inferiores obtidas na determinação do efeito bacteriostático, retirava-se um inóculo e diluía-se 20 vezes (0,5 ml para 10 ml) no mesmo meio de cultura, incubando-se a 37°C por 48 horas.

O meio básico usado em todas as operações correspondeu a um caldo-triptose da seguinte composição (13).

"Tryptose" (Difco) .....	10,0 g
Extrato de levedura .....	3,0 g
Extrato de carne .....	1,5 g
Glucose .....	1,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2,0 g
Água destilada, 9.5 .....	1000 ml
pH 7.2 (antes da autoclavagem)	

Foram usadas duas partidas do sal sódico de Rifamicina S.V. cedidas pelos Laboratórios Lepetit S.A. Foram feitas diluições decrescentes a partir de 1280 µg/ml, na razão de ordem 2, estando os resultados corrigidos em função da atividade da droga utilizada (740 µg/mg).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos em relação ao efeito bacteriostático da rifamicina S.V. sobre as 165 amostras de enterobactérias, estão condensados na Tabela 1. Em que pese a variabilidade aparente em relação a alguns dos grupos considerados, particularmente *Escherichia coli*, verifica-se que a maioria das estirpes consideradas nessa espécie, além das de *Shigella* e *Proteus mirabilis* foram inibidas nas concentrações entre 33 e 65 µg/ml de rifamicina S.V. Segue-se um segundo grupamento, quanto ao nível médio de sensibilidade, com a moda oscilando entre 65 e 128 µg/ml que abrange as demais espécies de *Proteus*, o gênero *Providencia*, a elas inti-

mamente relacionado, e, em adição, o gênero *Klebsiella*. Finalmente *Salmonella* e *Enterobacter* parecem representar os níveis mais altos de resistência à rifamicina S.V., com o limite mínimo de sensibilidade em regra igual ou superior a 128 µg/ml. Com as 77 amostras correspondentes a *S. typhi*, de acordo ainda com a tabela 1, verifica-se uma leve tendência a menores concentrações mínimas inibitórias, que as outras salmonelas, havendo 1,3% de amostras sensíveis a 17 µg/ml, 2,9% a 33 µg/ml, 18,2% a 65 µg/ml, mais da metade (67,5%) sensível a 128 µg/ml, o que corresponde à moda de comportamento da espécie, e seguindo-se apenas um número reduzido de amostras, 6,5% sensíveis a 320 µg/ml e 1,3% a mais de 965 µg/ml.

Os três padrões de comportamento assinalados entre as enterobactérias em relação ao efeito bacteriostático da rifamicina, são acentuados, e mais nitidamente definidos, quando se toma em consideração a ação bactericida do mesmo antibiótico. Na figura 1, representamos esses resultados, distribuindo 10 amostras de *E.*

TABELA 1

Concentrações inibitórias mínimas de Rifamicina S.V. para 165 amostras de Enterobacteriaceae.

Grupos provados	N.º	Concentrações inibitórias mínimas µg/ml						
		17	33	65	128	250	490	965 > 965
<i>E. coli</i>	10	1	3	3	1	2		
<i>Shigella</i>	5		3	2				
<i>Klebsiella</i>	5		2		1	2		
<i>Enterobacter</i>	5					3		2
<i>Providencia</i>	9			2	1	1	1	4
<i>Pr. rettgeri</i>	10			3	4			2
<i>Pr. morgani</i>	10			3	4	1	1	1
<i>Pr. vulgaris</i>	10		1	4	4		1	
<i>Pr. mirabilis</i>	10		3	6	1			
<i>Salmonella</i> sp.	14			1	6	7		
<i>Salmonella typhi</i>	77	1	3	14	53	5		1

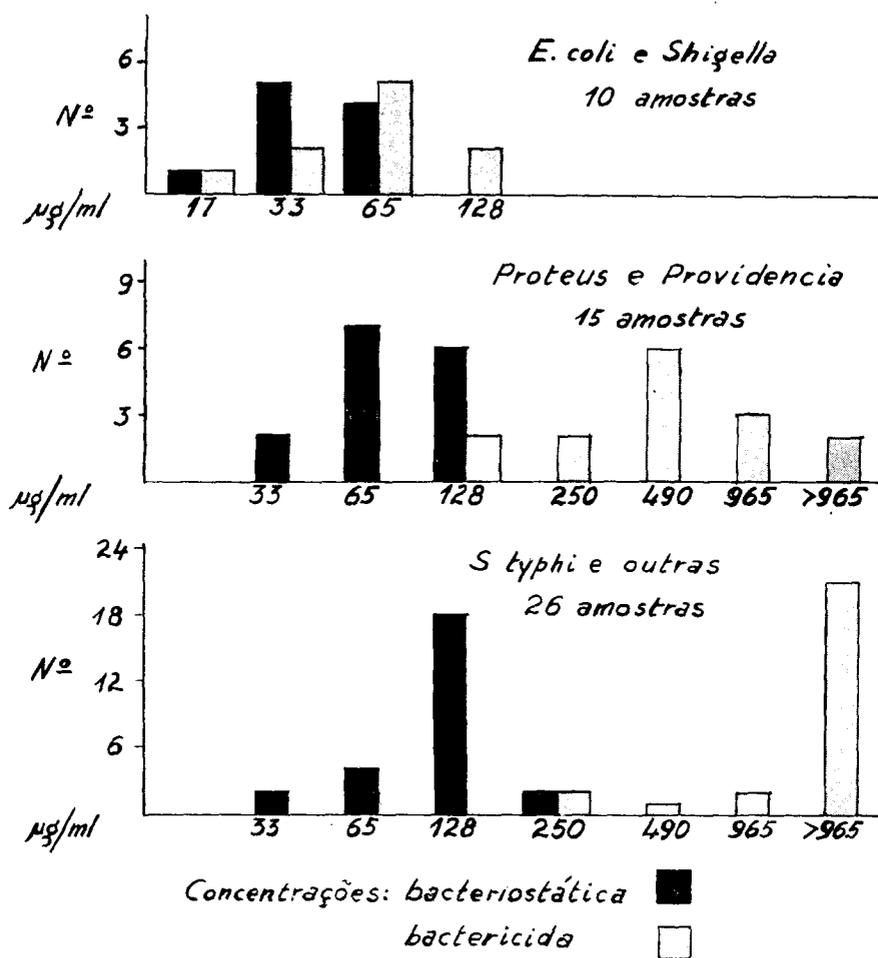


Fig. 1

Relações entre os níveis bacteriostáticos e bactericidas da rifamicina S.V., para alguns grupos de enterobactérias.

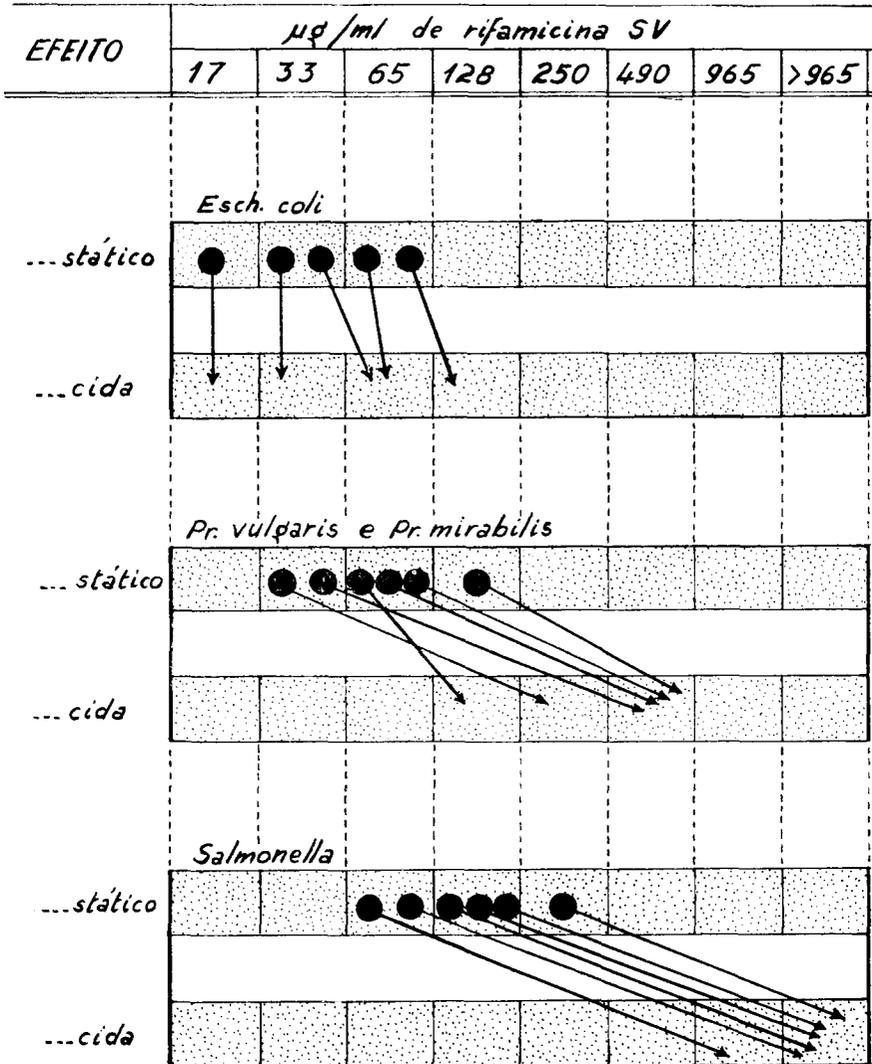


Fig. 2

Exemplos representativos do padrão de comportamento de Enterobacteriaceae em relação às concentrações bacteriostáticas e bactericidas da rifamicina S.V.

*coli* e *Shigella*, representativas dos grupos de maior sensibilidade; 12 cepas de *Proteus* (3 de cada espécie) e 3 de *Providencia*, que representam o grupo de sensibilidade intermediária e 26 amostras de *Salmonella*, entre as quais 22 de *S. typhi*, que compreendem o grupo de maior resistência. Observe-se que embora não consideradas as amostras que apresentaram maior resistência em cada grupo, verifica-se discreto aumento da concentração necessária ao efeito bactericida, em relação ao efeito bacteriostático, para o grupo *Shigella* — *Escherichia*. Acentua-se a tendência a que as concentrações bactericidas se distanciem das bacteriostáticas em *Proteus* e *Providencia*, e, finalmente, concentrações bactericidas não foram atingidas nas condições da experiência (máxima de 965 µg/ml) para a maioria das amostras de *Salmonella* e *S. typhi*.

Independente do comportamento médio em face a concentrações bacteriostáticas de rifamicina S.V., *Pr. mirabilis* comporta-se como as demais espécies de *Proteus* e *S. typhi* como as demais *Salmonella* em relação a concentrações bactericidas do antibiótico. Isto é melhor apreciado na Fig. 2 onde se especificam as concentrações bactericidas e bacteriostáticas em relação a cada amostra, que representam os três padrões de comportamento acima assinalados. Observa-se que para *Escherichia* e *Shigella* as concentrações bactericidas coincidem ou estão nos limites do dobro da concentração inibitória mínima. Para as espécies consideradas de *Proteus* e para *Providencia*, houve variação maior de comportamento, mas é evidente a tendência para que o efeito bactericida seja encon-

trado em concentrações que correspondem a quatro vezes a concentração bacteriostática da rifamicina S.V. Finalmente, de maneira pouco feliz para os propósitos visados na presente investigação para *Salmonella* com a inclusão de *S. typhi*, um efeito bactericida não foi alcançado, ou somente foi atingido com concentrações seis vezes superiores àquela determinada como concentração inibitória mínima, esta já por si elevada.

Confrontados os presentes resultados com aqueles disponíveis na literatura e já anteriormente comentados, não parece animadora e expectativa de que a rifamicina S.V. possa atuar indiscriminadamente sobre quaisquer infecções por germes Gram-negativos nas vias biliares. A expectativa parece justificar-se em relação a *Escherichia coli*, e seria de admitir-se para alguns representantes de outros gêneros. Não parecendo ser de maior significação a sensibilidade de *Shigella*, por não se tratar de patogênico de importância nesse setor do organismo, cumpre destacar que apenas em relação a esse gênero e a *Escherichia* pode ser confirmada a assertiva de Viallier & Augagneur (18) de que em relação a enterobactérias as concentrações bacteriostáticas e bactericidas da rifamicina seriam vizinhas.

Finalmente, é desanimador considerarem-se os presentes resultados em relação ao problema ainda insolúvel do tratamento dos portadores biliares crônicos de *Salmonella*, particularmente *S. typhi*, onde se assinala uma ocorrência de 7,4% após o tratamento com cloranfenicol (2) ou de, pelo menos, 1% após o tratamento com ampicilina (10).

#### Summary

From the initial investigations on the antibacterial spectrum of rifomycin S.V. it was found that, contrary to the high sensitivity of the gram-positive bacteria, most gram-negative rods were relatively resistant to this antibiotic. Nevertheless rifomycin concentrations which inhibited the majority of the gram-negative organisms were far lower than the concentrations obtained in the biliary tract of man and experimental animals, as rifomycin is concentrated and eliminated through the bile.

These facts suggested the need of defining the bacteriostatic and bactericidal levels of rifomycin S.V., against pathogenic gram-negative enteric organisms, because of the importance of the *Salmonella* carriers and the unsolved problems of their treatment — and since some divergence were found in the few available reports on their sensitivity to rifomycin.

Seventy seven strains of *Salmonella typhi*, and 88 other strains which included representative strains of most groups among the Enterobacteriaceae, were tested. The serial dilution technique in a tryptose-phosphate-glucose-broth was adopted. Most the *Escherichia coli*, *Shigella* and *Proteus mirabilis* cultures

were inhibited within the range of 33-65  $\mu\text{g/ml}$  of rifamycin S.V. whereas the mean concentrations for inhibition of most strains of other groups of enteric bacteria including the remaining species of *Proteus*, *Klebsiella* and *Providencia* cultures varied between 65 and 128  $\mu\text{g/ml}$  of rifomycin. For *Salmonella* and *Enterobacter* in most cases the minimal inhibitory concentration was 128  $\mu\text{g/ml}$ . More striking differences among the tested bacterial groups were found as related to the bactericidal action of rifomycin S.V. For *Shigella* and *E. coli* strains the bacteriostatic and bactericidal concentrations of rifomycin S.V. closely paralleled each other. As to the four *Proteus* species and *Providencia* strains, in spite of some variability in most instances the bactericidal concentrations was four times greater than the minimal inhibitory one. Finally, and unfortunately for the above mentioned purposes, in relation to *Salmonella* (*S. typhi* included) when given a 6 times large concentration than the already high minimal inhibitory concentrations observed, such a concentration did not kill the strains tested.

#### Agradecimento

Agradecemos ao Dr. Gobert Araújo Costa, do Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro) parte das amostras de *Salmonella typhi* usadas no trabalho e aos Laboratórios Lepetit S.A. o antibiótico utilizado na presente investigação.

#### BIBLIOGRAFIA

1. ACOCELLA, G. & MUSCHIO, R. Dimostrazione dell'esistenza nell'uomo di un circolo entero-epatico della rifomicina S.V. *Riforma Médica*, 75: 1490-1493, 1961.
2. ARMIJO, R., PIZZA, A. & LOBOS, H. Prevalence of typhoid carriers after treatment with chloramphenicol. *Bol. Ofic. Sanit. Panamer.* (English edition selection from 1967: 60-65, 1967.
3. BAYARD S. T. & UTZ, J. P. Factors influencing the cure of *Salmonella* carriers *Ann. Int. Med.* 57:871-882, 1962.
4. CASSANO, A. FILICE, A., COSTA C. & TRIMARCO, C. La rifomicina S.V.: studio "in vitro" dell'attività antibatterica. *Clin. Therap.*, 21 bis (Suppl. 4): 296, 1961.
5. FÜRESZ, S. & SCOTTI, R. Rifomycin. XX. Further studies on rifomycin S.V.: "in vitro" activity absorption and elimination in man. *Farmaco (Ed. Sci.)*, 16:262-271, 1961.
6. GOTOFF, S. P. & LEPPER, M. H. Treatment of *Salmonella* carriers with colistin sulfate. *Amer. J. Med. Sci.* 249:399-403, 1965.
7. GROVE, D. C. & RANDALL, W. A. Assay methods of antibiotics. A laboratory manual. *Medical Encyclopedia Inc.*, N. York 238 p. 1955
8. MAFFII, G., BIANCHI, G., SCHIATTI, P. & GALLO, G. G. Rifomycin. XIX. Absorption, biliary excretion and distribution of Rifomycin. S.V. *Farmaco (Ed. Sci.)*, 16:246-261, 1961.
9. MICHAUX, J. L. Le traitement des porteurs de germes typhiques par la pénicilline. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 43: 61-66, 1963.
10. RUSSEL, E. M., SUTHERLAND, A. & WALKER, W. Ampicilin for persistent typhoid excretors, including a clinical trial in convalescence *Brit. Med. J.* 2:555-557, 1966.
11. SENSI, P. Recentes progressos na investigação de novos antibióticos. *O Médico (Pôrto)*, 43:793-806, 1967.
12. SIMON, H. J. & MILLER, R. C. Ampicillin in the treatment of chronic typhoid carriers. Report on fifteen treated cases and a review of the literature. *N. Engl. J. Med.*, 274:807-815, 1966.
13. SUASSUNA I. Estudos sobre o gênero *Proteus*. Tese. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado da Guanabara. *Ric de Janeiro*, 145 p., 1963.
14. SUASSUNA, I. R., von HUBINGER, M. G. & SUASSUNA, I. Atividade antibacterianas da Rifamicina S.V. em face a outros antibióticos. *Hospital*, 63: 1093-1103, 1963.
15. TIMBAL, M. T. & BREGA A. Rifomycin. XVII. Rifomycin S.V. treatment of experimental infections. *Farmaco (Ed. Sci.)*, 16: 191-199, 1961.
16. TIMBAL, M. T., PALLANZA, R. & CARNATI, G. Rifomycin. XVI. Bacteriological studies of rifomycin S.V. in vitro. *Farmaco (Ed. Sci.)*, 16: 181-190, 1961.
17. VERNA, L. C. Rifamicina S.V.: estudio de su actividad antimicrobiana "in vitro". *Dia Médico* 34: 2614, 1962.
18. VIALLIER, J. & AUGAGNEUR, J. Recherches sur l'activité bactericide de la rifamycine. *C. R. Soc. Biol.*, 158: 1669-1671, 1964.