

RESISTÊNCIA TRANSFERÍVEL EM CULTURAS DE *SALMONELLA* *TYPHIMURIUM* ISOLADAS NO RECIFE

Marcelo MAGALHÃES (1) e Adelma VÉRAS (1)

RESUMO

Entre 73 amostras polirresistentes de *Salmonella typhimurium* isoladas de crianças com menos de dois anos, 72 (98,6%) transferiram determinantes R para a *Escherichia coli* K12 durante a conjugação. Todas as culturas mostraram-se resistentes à ampicilina, cloranfenicol, neomicina, estreptomomicina, sulfas e tetraciclina. Mais da metade delas apresentou também outros determinantes de resistência, tais como a: cefalosporina, furazolidona, ácido nalidíxico e gentamicina. A maioria das amostras, entretanto, transferiu apenas parte do seu modelo de resistência. O fagotipo 193 foi o mais freqüente (65 casos) e as 8 culturas restantes não puderam ser tipadas.

INTRODUÇÃO

Em fins de 1970 observou-se, neste laboratório, o aparecimento de culturas multirresistentes de *Salmonella typhimurium* isoladas de crianças portadoras de gastroenterite. Essas culturas mostraram notável uniformidade em seus modelos de resistência, os quais abrangiam os principais antibacterianos empregados no tratamento das infecções intestinais: ampicilina (A), cloranfenicol (C), neomicina-kanamicina (K), estreptomomicina (S) sulfas (Su) e tetraciclina (T). Com o passar do tempo, as amostras polirresistentes tornaram-se predominantes na coletividade, constituindo importante causa de infecção hospitalar no Instituto de Medicina Infantil de Pernambuco. Com o objetivo de contornar o problema da resistência, novos esquemas terapêuticos, baseados nos antibiogramas, foram prescritos. Essa conduta veio ampliar, ainda mais, os padrões de resistência já existentes pela adição de outros determinantes, tais como: ácido nalidíxico (Nx), furazolidona (Fu), cefalosporina (Cp) e gentamicina (G).

Neste trabalho, pretende-se verificar a transferibilidade dos determinantes de resistência

das amostras de *S. typhimurium*, prevalentes na coletividade infantil do Recife.

MATERIAL E MÉTODOS

O material constou de 73 amostras de *S. typhimurium* isoladas, entre outubro de 1972 e janeiro de 1973, de crianças menores de dois anos, portadoras de gastroenterite, matriculadas no ambulatório ou internadas no Instituto de Medicina Infantil de Pernambuco.

Identificação das culturas e antibiograma — As culturas foram caracterizadas como *S. typhimurium* através de métodos bioquímicos e sorológicos⁷ e, em seguida, enviadas ao Enteric Reference Laboratory (ERL) de Londres para a determinação do fagotipo.

Os antibiogramas foram realizados e os critérios de resistência estabelecidos de acordo com a técnica de KIRBY & BAUER⁵.

Transferência de resistência — A capacidade de transferir os determinantes R foi verificada pelo emprego da conjugação. As

(1) Faculdade de Medicina, Disciplina de Microbiologia, Cidade Universitária. 50000 Recife, Pernambuco, Brasil.

culturas doadoras e receptora foram cultivadas separadamente em caldo de coração e cérebro (Difco) até a concentração de 1×10^8 células por mililitro e misturadas, respectivamente, nas quantidades de 0,1 e 0,9 ml em 4 ml do mesmo meio de cultivo. Após 16 a 18 horas de incubação a 37°C, 0,01 ml dos conjugantes foram depositados (spot test) em diferentes placas de Mac Conkey contendo os diversos antibacterianos para os quais a doadora apresentou resistência. No caso do sulfametoxazol o inóculo era diluído 100 vezes.

A concentração do antibiótico na placa seletora foi equivalente a 5 vezes a concentração inibitória mínima da cultura receptora, em idênticas condições de trabalho. A eliminação das doadoras foi conseguida pela inclusão nas placas seletoras de 50 µg de ácido nalidíxico ou de 100 µg/ml de rifamicina, dependendo da cultura receptora utilizada.

As culturas receptoras empregadas foram ERL 14R525 (*E. coli* K12 F⁻ Lac⁺ Nx^r) e ERL 20R764 (*E. coli* K12 F⁻ Lac⁺ Rif^r) gentilmente cedidas pelo Dr. E. S. Anderson.

Mobilização da resistência — Nas culturas incapazes de transferir seus determinantes R pela conjugação simples, tentou-se a mobilização pela técnica do cruzamento tríplice^{2,3}. Isso consistiu em misturar a cultura de salmonela com a amostra K12 Nx^s Rif^s portadora do fator de transferência de resistência (RTF), durante 4 horas, antes do cruzamento com as receptoras definitivas K12 Nx^r ou K12 Rif^r.

RESULTADOS

Das 73 culturas examinadas, 65 pertenciam ao fagotipo 193 e as 8 restantes não puderam ser tipificadas. Entre estas, encontravam-se todas as 6 amostras resistentes à gentamicina.

Os modelos de resistência apresentados ao antibiograma e os respectivos conjuntos de determinantes R transferidos à *E. coli* K12 encontram-se resumidos na Tabela I. O modelo básico de resistência ACKSSuT esteve presente em todas as culturas examinadas e mais da metade delas mostrou ainda outros determinantes R, além daqueles.

TABELA I

Modelos de resistência e transferibilidade de fatores R em 73 amostras de *Salmonella typhimurium* isoladas no Recife

Fagotipo	N.º	Modelo R	N.º	R-transferência	N.º
193	65	ACKSSuT	35	{ ASSu } ACKSSuT	31 4
		ACKSSuTNx	9	{ ASSu } ACKSSuT	8 1
		ACKSSuTFu	9	{ ASSu } ACKSSuT	7 2
		ACKSSuTNxFu (*)	6	{ ASSu } ACKSSuT	3 2
		ACKSSuTCp	6	{ ASSu } CKT } ACKSSuT	4 1 1
Não tipável	8	ACKSSuTG	6	{ ASSuKG	6
		ACKSSuT	2	} ASSu	2

(*) uma cultura não transferiu

Exceto uma, todas as amostras multirresistentes de *S. typhimurium* estudadas foram capazes de transferir fatores R, embora não tenha sido transferido necessariamente o modelo completo de resistência. Na grande maioria dos cruzamentos férteis os fatores ASSu passaram para a K12, enquanto os determinantes Fu, Nx e Cp não puderam ser mobilizados em nenhuma ocasião.

DISCUSSÃO

Os presentes resultados mostram a gravidade do problema representado pela acentuada predominância de *S. typhimurium*, multirresistentes e portadoras de fatores R, na etiologia das salmoneloses infantis, no Recife. Quase 100% das amostras foram capazes de transferir seus determinantes R. Embora, isso contraste com outras observações, relativas ao gênero *Salmonella*, no qual os índices de transferência apresentados são menores^{6, 8, 9, 10}, tais discordâncias são explicáveis quando se considera a excepcional uniformidade de nossas culturas, seja do ponto de vista do fagotipo ou no que concerne aos modelos de resistência apresentados. A grande maioria pertencia ao fagotipo 193 e todas as culturas exibiram o modelo R básico ACKSSuT. Esses fatos sugerem a existência de um único fagotipo multirresistente de *S. typhimurium*, ligado às salmoneloses infantis, em nosso meio. Idênticos resultados foram obtidos na Inglaterra¹, em relação à *S. typhimurium* fagotipo 29, onde todas as culturas testadas foram capazes de transferir a totalidade ou parte de seu espectro de resistência.

Ao que parece, o fagotipo 193 portador dos determinantes ACKSSuT apareceu no Recife em outubro de 1970. A esta época, tipos enteropatogênicos de *E. coli*, com idêntico modelo R, foram também isolados. Em janeiro e fevereiro de 1971 houve o primeiro surto de enterite provavelmente relacionado com o fagotipo 193. Daí por diante ele tornou-se endêmico e, esporadicamente, provoca surtos de extensão limitada. O modelo R original ACKSSuT foi paulatinamente expandido em resposta aos novos esquemas terapêuticos. Ao término de 1971 e começo de 1972 apareceu a resistência ao ácido nalidíxico e furazolidona e no fim de 1972 emer-

giram as primeiras culturas gentamicina-resistentes.

O elevado grau de transferência dos determinantes ASSu, geralmente sozinhos, sugere que no fagotipo 193 eles estão ligados, constituem um grupo independente de plasmídeos e estão permanentemente unidos ao RTF. Eles se comportam como plasmídeos da Classe I⁴, daí a elevada capacidade de autotransferência. Diferentemente de ASSu, os plasmídeos CKT foram transferidos com muito menor eficiência. Excetuando uma ocasião, eles somente foram transferidos simultaneamente com ASSu constituindo o plasmídeo ACKSSuT. Isso indica que os determinantes CKT estão dissociados do RTF ou mesmo, em algumas culturas, poderiam estar localizados no cromossomo. No que concerne aos demais fatores de resistência, apenas G foi transferível. A transferibilidade de G foi absoluta e todas as culturas portadoras de G transferiram também o fator K. Desde que a transferência de K, na ausência de G, é muito baixa é possível que G e K constituam um plasmídeo independente. O plasmídeo GK parece ser desprovido de RTF. Dessa maneira, ele somente é passível de mobilização nos cruzamentos tríplexes, envolvendo a K12 intermediária portadora de RTF, ou através de recombinação com o plasmídeo ASSu que é autotransferível. O plasmídeo GK foi observado em 6 das 8 culturas não tipáveis e isso pode ser interpretado de duas maneiras. Essas culturas seriam realmente cepas diferentes do fagotipo 193 ou, o que é mais provável o plasmídeo GK teria efeitos restritivos sobre os bacteriófagos utilizados na tipagem. A modificação do fagotipo de culturas de *S. typhimurium* devido à presença, na célula bacteriana, de determinados fatores R é fato bem conhecido^{2, 3}.

A origem da multirresistência no fagotipo 193 permanece indeterminada, assim como a maneira de como ele introduziu-se no Recife. No momento, sabe-se apenas que ele apareceu em nosso meio em 1970, ampliou progressivamente seu modelo de resistência, tornando-se o principal agente bacteriano de gastroenterites em crianças menores de 2 anos e importante causa de infecção hospitalar no Instituto de Medicina Infantil de Pernambuco.

SUMMARY

Transferable resistance in cultures of Salmonella typhimurium isolated in Recife-Brazil

Out of 73 polyresistant strains of *Salmonella typhimurium* recovered from children under two years of age, 72 (98.6%) were able to transfer R factors to *Escherichia coli* K12 during mixed cultivation. The whole of the cultures were resistant to ampicillin, chloramphenicol, neomycin, streptomycin, sulfonamide and tetracycline. Furthermore, more than a half of them presented also other R-determinants added to the basic R type, such as: cephalosporin, furazolidone, nalidixic acid and gentamycin. However, the majority of the strains transferred only part of its drug resistance pattern. The commonest phage type encountered was 193 (65 strains), the remaining 8 cultures being untypable.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. E. S. Anderson, Diretor do "Enteric Reference Laboratory" de Londres, pela fagotipagem de nossas culturas e fornecimento das amostras receptoras padrões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSON, E.S. — Origin of transferable drug-resistance factors in the *Enterobacteriaceae*. *Brit. Med. J.* 2:1289-1291, 1965.
2. ANDERSON, E.S. & LEWIS, M.J. — Characterization of a transfer factor associated with drug resistance in *Salmonella typhimurium*. *Nature* (London) 208:843-849, 1965.
3. ANDERSON, E.S. — The ecology of transferable drug resistance in the enterobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 22:131-180, 1968.
4. ANDERSON, E.S. & THRELFALL, J.E. — Change of host range in a resistance factor. *Genet. Res. (Camb.)* 16:207-214, 1970.
5. BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C. & TURCK, M. — Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Path.* 45:493-496, 1966.
6. BOROWSKI, J.; DZIERZANOWSKA, D.; TOMASZEWSKI, R. & BOBROWSKI, M. — The occurrence of transferable antibiotic resistance in enteric bacteria isolated in Poland. 43-46. In KRČMERY, V.; ROSIVAL, L. & WATANABE, T. (Eds.) *Bacterial plasmids and antibiotic resistance*. Prague, Avicenum, 1972.
7. EDWARDS, P.R. & EWING, W.H. — Identification of *Enterobacteriaceae*. (Eds.) Minneapolis, Burgess Publishing Company, 1972.
8. KONTOMICHALOU, P. — Studies on resistance transfer factors. *Path. Microbiol.* 30:71-93, 1967.
9. LEBEK, G. — Epidemiological investigations of R-factors in man and animals in Switzerland. 47-54. In KRČMERY, V.; ROSIVAL, L. & WATANABE, T. (Eds.) *Bacterial plasmids and antibiotic resistance*. Prague, Avicenum, 1972.
10. SANTOS, D.S. — Resistência transmissível a drogas na família *Enterobacteriaceae*. (Tese). São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1972.

Recebido para publicação em 28/12/1973.