

RESISTÊNCIA TRANSMISSÍVEL À GENTAMICINA EM ESTIRPES MULTIRRESISTENTES DE *SAFMONELLA TYPHIMURIUM*

Marcelo MAGALHÃES, Adelma VÉRAS e Ângela DÂMASO (1)

RESUMO

Estudou-se a evolução da resistência à gentamicina em linhagens multirresistentes de *Salmonella typhimurium*, isoladas de casos de gastroenterite infantil. Todas as 47 culturas examinadas auto-transferiram a gentamicina-resistência para a *Escherichia coli* K12, durante a conjugação. O modelo R mais frequentemente encontrado nos plasmídeos transferidos foi ASSuGK seguido do AGK. As características desses plasmídeos são semelhantes às descritas para o plasmídeo Gk, isolado na França de outras enterobactérias, especialmente *Klebsiella*, por Witchitz & Chabbert. Atribuiu-se a seleção e disseminação de Gk entre as salmonelas ao uso indiscriminado do antibiótico, via oral, no tratamento das gastroenterites infantis no Recife.

INTRODUÇÃO

Nos últimos quatro anos, linhagens multirresistentes de *Salmonella typhimurium*, a grande maioria pertencente ao fagótipo 193, tornaram-se a principal causa bacteriana de gastroenterites infantis, no Recife^{3, 8}. O modelo de resistência (R) dessas estirpes mostrou-se bastante uniforme incluindo geralmente a ampicilina (A); cloranfenicol (C); kanamicina-neomicina (K); estreptomicina (S); sulfametoxazol (Su); tetraciclina (T); ácido nalidíxico (Nx) e, eventualmente, a furazolidona (Fu). No segundo semestre de 1971, em virtude do crescente número de casos de gastroenterite ligados ao fagótipo 193, iniciou-se o emprego da gentamicina (G) em larga escala, por via oral, nos diversos serviços de pediatria da cidade, principalmente no Instituto de Medicina Infantil de Pernambuco (IMIP). Um ano após, surgiaram as primeiras culturas gentamicina-resistentes ampliando-se o espectro de resistência daquelas salmonelas pela adição do determinante G.

Neste trabalho, relata-se a evolução da resistência à gentamicina em linhagens mul-

tilresistentes de *S. typhimurium*, demonstra-se sua natureza extra-cromossômica e descreve-se as características dos plasmídeos G encontrados.

MATERIAL E MÉTODOS

Selecionou-se 47 culturas de *S. typhimurium*, gentamicina-resistentes, isoladas de igual número de crianças portadoras de gastroenterite. Os modelos R dessas culturas estão expostos, juntamente com os resultados dos cruzamentos, na Tabela II.

Antibiogramas — Foram realizados pelo método de BAUER & KIRBY⁴, quando se estudou, rotineiramente, a evolução da resistência à gentamicina. Na caracterização dos modelos R das culturas selecionadas e dos plasmídeos, resultantes dos cruzamentos, empregou-se a técnica das diluições em meio sólido. Neste método, determinada cultura foi considerada resistente se capaz de crescer numa concentração de droga, pelo menos 8

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

vezes superior à concentração inibitória mí-
nima da amostra susceptível padrão, *S. ty-
phimurium* fagotipo 36, em idênticas condi-
ções de trabalho. O meio sólido empregado
foi o agar de MacConkey (BBL), exceto nos
testes para o sulfametoazol quando foi
substituído pelo meio de Mueller-Hinton
(BBL).

Transferência de plasmídeo G — As cul-
turas doadoras e a receptora, *Escherichia
coli* K12 F⁻ Lac⁺ Rif^r (K12 F⁻) foram
cultivadas em caldo de coração e cérebro
(BBL) durante uma noite (1.5×10^9 uni-
dades viáveis por mililitro) e misturadas,
respectivamente, nas quantidades de 0,1 e
0,9 ml em 4 ml daquele meio de cultivo.
Com o propósito de detectar eventuais deter-
minantes G não auto-transferíveis, realizou-se
concomitantemente um teste de mobilização
pela técnica do cruzamento tríplice¹, envol-
vendo uma amostra de *E. coli* K12 (K12 Δ)
portadora do fator de transferência de re-
sistência (RTF) Δ. Os casais foram in-
cubados a 37°C durante 18 horas e pla-
queados em ágar de MacConkey contendo
8 µg/ml de gentamicina (Schering Co.) e
50 µg/ml de rifampicina para o isolamento
dos recombinantes droga-resistentes. Por-
tanto, todos os plasmídeos G estudados fo-
ram selecionados pela gentamicina.

Freqüência — Foi verificada inoculando-
se, diluições sucessivas dos cruzamentos fér-
teis, com uma alça de nicrome capaz de li-
berar 0,01 ml no meio de cultivo apropria-
do¹. Calculou-se a freqüência de acordo
com a proporção da população receptora que
recebeu o fator R em estudo².

Ligação de G com outros fatores R — Dez
colônias de cada cultura recombinante fo-
ram retiradas das placas onde se determi-
nou a freqüência e verificada a composição
de seus modelos R.

*Determinação da inibição da fertilidade
(Fi)* — Os diversos plasmídeos G foram
re-transferidos para a *E. coli* K12 Hfr Nx^r
(K12 Hfr), a qual foi então submetida ao
teste de susceptibilidade frente ao fago ma-
cho específico μ^2 .

Produção de bacteriocinas — A capaci-
dade das culturas doadoras produzirem bac-
teriocinas foi observada em se utilizando o
método clássico de FREDERICQ⁷.

RESULTADOS

A evolução da resistência à gentamicina,
em *S. typhimurium*, está sintetizada na Ta-
bela I. Encontraram-se 7 diferentes tipos de
modelos R, nas estípnes examinadas, destan-
cando-se ACKSSuTNxG como o mais fre-
quente (Tabela II).

Todas as culturas foram capazes de trans-
mitir plasmídeos G diretamente para a
K12 F⁻, embora, em alguns casos, os cru-
zamentos tríplices tenham fornecido maior
número de recombinantes. Dezenas linha-
gens auto-transferiram um único tipo de
plasmídeo G, 23 transferiram 2 e as 3 cul-
turas restantes transmitiram 3 diferentes mo-
delos R. O plasmídeo mais frequentemen-
te transferido foi ASSuGK (45 vezes), se-
guido de ACK (29). Por outro lado, fa-
tores R contendo os marcos C ou T foram
muito raros (5), enquanto os determinantes
Nx e Fu não puderam ser mobilizados, quer
diretamente ou com a ajuda de Δ (Tabe-
la II).

Os níveis de resistência à gentamicina nas
culturas de *Salmonella* oscilaram entre 8-64
µg/ml, enquanto na K12 F⁻ foram geral-
mente de 8, raramente ultrapassando 16
µg/ml. A freqüência de auto-transferência
dos plasmídeos G variou entre 5×10^{-1} —
 1×10^{-6} . Seus diferentes marcos foram
re-transferidos da K12 F⁻ para a K12 Hfr,
como um único grupo de ligação, indicando
um permanente estado associativo entre os
determinantes R e o RTF (Classe I). To-
dos os plasmídeos G estudados comporta-
ram-se como Fi⁻, permitindo a multiplicação
de μ^2 na K12 Hfr. Além disso, eles não
restringiram a multiplicação do fago femini-
no φ^2 na K12 F⁻. Embora a maioria das
culturas produzisse pequena quantidade de
bacteriocina, frente à receptora, não houve
prejuízo nos resultados dos cruzamentos nem
o fator Col foi mobilizável.

TABELA I

Percentuais de resistência à gentamicina em culturas multirresistentes de *Salmonella typhimurium* isoladas no Recife

| Proveniência | 1971 | | 1972 | | 1973 | | | |
|--------------|--------------|-----|--------------|-----|--------------|------|--------------|------|
| | 2.º semestre | | 1.º semestre | | 2.º semestre | | 1.º semestre | |
| | No Ex | % R | No Ex | % R | No Ex | % R | No Ex | % R |
| IMIP | 78 | 0,0 | 92 | 5,4 | 142 | 49,2 | 86 | 60,8 |
| Diversos | 82 | 0,0 | 124 | 1,6 | 127 | 25,2 | 151 | 35,1 |
| | | | | | | | 90 | 61,1 |
| | | | | | | | 105 | 41,9 |

TABELA II

Modelos de resistência de 47 estirpes de *S. typhimurium* e composição dos plasmídeos G transferidos

| Modelos R | N.º | Plasmídeos G | N.º |
|--------------|-----|----------------------------------------|-----------------------|
| ACSSuGK | 11 | GK AGK CGK ASSuGK ACSSuGK | 1 8 1 9 1 |
| ASSuNxGK | 1 | AGK ASSuGK | 1 1 |
| ACSSuNxGK | 8 | AGK ASSuGK | 5 8 |
| ACSSuTGK | 9 | GK AGK CGK ASSuGK ACSSuTGK | 1 3 1 9 1 |
| ACSSuTNxGK | 14 | AGK ASSuGK | 11 14 |
| ACSSuFuNxGK | 1 | ASSuGK | 1 |
| ACSSuTFuNxGK | 3 | AGK ASSuGK ACSSuTGK | 1 3 1 |

DISCUSSÃO

A análise da Tabela I mostra que o aparecimento de linhagens gentamicina-resistentes de *S. typhimurium* ocorreu simultaneamente nos diversos serviços de pediatria da cidade, embora evoluísse mais rapidamente no IMIP, onde, desde 1971, cepas multirresistentes daquele microrganismo constituem

importante causa de infecção hospitalar⁸. Problema idêntico não se observou na África do Sul, em relação à *E. coli*, apesar do emprego oral da gentamicina no tratamento de gastrorenterites⁶. Provavelmente, as elevadíssimas doses orais (20-30 mg/kg de peso ao dia), usadas em nosso meio, associadas ao caráter multirresistência e à espécie bacteriana envolvida, contribuíram decisivamente na seleção e disseminação de plasmídeos G, no Recife.

Os plasmídeos responsáveis pela resistência à gentamicina, na *S. typhimurium*, caracterizaram-se pela excepcional capacidade de auto-transferência (100%) e por governarem, concomitantemente, resistência à kanamicina. Essas propriedades, ao lado do caráter F_i^- , mesmo em plasmídeos contendo o determinante C, característica rara em culturas selvagens¹¹, indicam notável semelhança com o plasmídeo Gk, isolado na França, de diversas enterobactérias, especialmente *Klebsiella*, por WITCHITZ & CHABBERT¹². Este plasmídeo governa a síntese de uma adenilase que inativa a gentamicina, kanamicina e tobramicina sem afetar os aminoglicosídeos do grupo paromomicina-neomicina⁵. Isso não implica, entretanto, que as culturas de *S. typhimurium* multirresistentes, portadoras de Gk, sejam suscetíveis à paromomicina. Na verdade, nessas culturas, Gk co-existe com outro fator muito mais antigo, o determinante Kp, o qual, além de fosforilar a kanamicina, inativa também o grupo neomicina-paromomicina^{9, 10}. Assim, as culturas multirresistentes de *S. typhimurium* podem inativar a kanamicina através de dois mecanismos, fosforilação e adenilação, dependendo

do tipo de plasmídeo presente. Desde que, diferentemente de Gk, Kp apresenta baixo índice de transferibilidade, a adenilação é mais freqüentemente encontrada na cultura receptora. No presente trabalho, apenas 27 plasmídeos G, resultantes do cruzamento de 14 culturas de *S. typhimurium* com a *K12 F-*, foram estudados frente à paromomicina. Por esse motivo, preferiu-se, nos modelos R dos plasmídeos, não se fazer distinção entre Gk e Kp no que concerne à kanamicina-resistência. Daqueles 27 plasmídeos, 7 apresentaram, além de Gk, o determinante Kp. Portanto, o índice de transmissibilidade de Kp, em culturas portadoras de Gk, é de 25,9% contra 16,6% em culturas susceptíveis à gentamicina⁸. Esse fato, associado ao encontro de um plasmídeo com o modelo KpGk, poderia sugerir eventual mobilização de Kp pelo plasmídeo auto-transferível Gk.

Apesar da semelhança, os plasmídeos Gk isolados no Recife não exibiram o mesmo modelo R dos plasmídeos franceses¹³. Nestes, o tipo R mais comum foi ACSuGk, enquanto no Recife foi ASSuGK. Isso parece traduzir mais uma questão de estabilidade e segregação de determinantes R, ligados à espécie bacteriana hospedeira, que diferenças reais de identidade dos próprios plasmídeos. Assim, por exemplo, na *S. typhimurium* fagótipo 193, a salmonela multirresistente mais comum no Recife, os determinantes SSu constituem um grupo de ligação e apresentam, associados a A, elevadíssima capacidade de auto-transferência (98,5%)⁸. É possível que, nessas salmonelas, Gk, uma vez selecionado, combine-se com ASSu ou substitua SSu através de eventos recombinacionais formando os plasmídeos ASSuGk e AGK, respectivamente. A co-existência de ASSuGK e AGK em grande número de culturas, ao lado da ausência de segregação de SSu nas retransferências para a *K12 Hfr* sugere que ambos os plasmídeos não se excluem permitindo à cultura hospedeira o estado de hetero-R. Evidentemente, a determinação dos grupos de incompatibilidade de nossos plasmídeos permitirá o estabelecimento de correlações mais acuradas com os plasmídeos Gk isolados em Paris.

Concluindo: o emprego abusivo da gentamicina oral, no tratamento de gastriteenterites,

influiu decisivamente na seleção e disseminação do plasmídeo Gk entre as linhagens multirresistentes de *S. typhimurium*, no Recife. A eficiente capacidade de auto-transferência, demonstrada pelo plasmídeo envolvido, permite prever seu espalhamento entre outras espécies de Gram negativos e a consequente inutilização terapêutica dos três mais potentes aminoglicosídeos disponíveis, atualmente.

S U M M A R Y

Transferable gentamicin-resistance among multiresistant strains of Salmonella typhimurium

The evolution of gentamicin-resistance among *S. typhimurium* strains recovered from infants with gastroenteritis was studied. All the 47 cultures that have been examined auto-transferred gentamicin-resistance to *E. coli* K12 during mixed cultivation. The more frequently R type found in transferred plasmids was ASSuGK followed by AGK. The properties of these plasmids are similar to those described for plasmid Gk found in other enterobacteria, especially *Klebsiella*, by Witchitz & Chabbert. The selection and spreading of Gk among salmonellae have been ascribed to misuse of gentamicin in treatment of infantile gastroenteritis.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. E. S. Anderson, Diretor do Enteric Reference Laboratory de Londres, pelo fornecimento das culturas receptoras e fagos específicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSON, E. S. & LEWIS, M. J. — Characterization of a transfer factor associated with drug resistance in *Salmonella typhimurium*. *Nature (London)* 208:843-849, 1965.
2. ANDERSON, E. S. & THRELFALL, J. E. — Change of host range in a resistance factor. *Genet. Res. (Camb.)* 16:207-214, 1970.
3. ANDERSON, E. S.; THRELFALL, J. E.; CARR, J. M. & FROST, J. A. — Transferable drug resistance in *Salmonallae* in South

and Central America. *Proc. Soc. Gen. Microbiol.* 1:66, 1974.

4. BAUER, A. W.; KYRBY, W. M.; SHERRIS, J. C. & TURCK, M. — Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Path.* 45:493-496, 1966.

5. BENVENISTE, R. & DAVIES, J. — R factor mediated gentamicin resistance a new enzyme which modifies aminoglycosides antibiotics. *Febs Letters* 14:293-296, 1971.

6. COETZEE, M. & LEARY, P. M. — Gentamicin in *Esch. coli* gastroenteritis. *Arch. Dis. Child.* 46:646-650, 1971.

7. FREDERICQ, P. — Actions antibiotiques réciproques chez les *Enterobacteriaceae*. *Rev. Belge Path. Med. Exp.* 29(Suppl. 4): 1-107, 1948.

8. MAGALHAES, M. & VÉRAS, A. — Resistência em culturas de *Salmonella typhimurium* isoladas no Recife. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* (no prelo).

9. OKANISHI, M.; KONDO, S.; UTAHARA, R. & UMEZAWA, H. — Phosphorylation and inactivation of aminoglycosidic antibiotics by *E. coli* carrying R factor. *J. Antibiotics* 21:13-21, 1968.

10. UMEZAWA, H.; OKANISHI, M.; KONDO, S.; HAMURA, K.; UTAHARA, R.; MAEDA, K. & MITSHUASHI, S. — Phosphorylative inactivation of aminoglycosidic antibiotics by *E. coli* carrying R factor. *Science* 157: 1559-1561, 1967.

11. WATANABE, T.; NISHIDA, H.; OGATA, C.; ARAI, T. & SATO, S. — Episome-Mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae* VII. Two types of naturally occurring R factors. *J. Bact.* 88:716-726, 1964.

12. WITCHITZ, J. L. & CHABBERT, Y. A. — Résistance transférable à la gentamicine I — expression du caractère de résistance. *Ann. Inst. Pasteur* 121:733-742, 1971.

13. WITCHITZ, J. L. & CHABBERT, Y. A. — Résistance transférable à la gentamicine II — transmission et liaisons du caractère de résistance. *Ann. Inst. Pasteur* 122:367-378, 1972.

Recebido para publicação em 3/9/1974.