

## RESISTÊNCIA TRANSMISSÍVEL À GENTAMICINA EM ESTIRPES MULTIRRESISTENTES DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

Marcelo MAGALHÃES, Adelma VÉRAS e Ângela DÂMASO (\*)

### 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 fagotipo 193, tornaram-se a principal causa bacteriana de gastroenterites infantis, no Recife<sup>3, 8</sup>. 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 nalídixico (Nx) e, eventualmente, a furazolidona (Fu). No segundo semestre de 1971, em virtude do crescente número de casos de gastroenterite ligados ao fagotipo 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, surgiram 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-

tirresistentes de *S. typhimurium*, demonstrando-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 & KIRBY<sup>4</sup>, 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 mínima da amostra susceptível padrão, *S. typhimurium* fagotipo 36, em idênticas condições de trabalho. O meio sólido empregado foi o agar de MacConkey (BBL), exceto nos testes para o sulfametoxazol quando foi substituído pelo meio de Mueller-Hinton (BBL).

**Transferência de plasmídeo G** — As culturas doadoras e a receptora, *Escherichia coli* K12 F<sup>-</sup> Lac<sup>+</sup> Rif<sup>r</sup> (K12 F<sup>-</sup>) foram cultivadas em caldo de coração e cérebro (BBL) durante uma noite ( $1-5 \times 10^9$  unidades 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 determinantes G não auto-transferíveis, realizou-se concomitantemente um teste de mobilização pela técnica do cruzamento triplice<sup>1</sup>, envolvendo uma amostra de *E. coli* K12 (K12  $\Delta$ ) portadora do fator de transferência de resistência (RTF)  $\Delta$ . Os casais foram incubados a 37°C durante 18 horas e plaqueados 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. Portanto, todos os plasmídeos G estudados foram selecionados pela gentamicina.

**Frequência** — Foi verificada inoculando-se, diluições sucessivas dos cruzamentos férteis, com uma alça de nicrome capaz de liberar 0,01 ml no meio de cultivo apropriado<sup>1</sup>. Calculou-se a frequência de acordo com a proporção da população receptora que recebeu o fator R em estudo<sup>2</sup>.

**Ligação de G com outros fatores R** — Dez colônias de cada cultura recombinante foram retiradas das placas onde se determinou a frequência 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<sup>r</sup> (K12 Hfr), a qual foi então submetida ao teste de susceptibilidade frente ao fago macho específico  $\mu^2$ .

**Produção de bacteriocinas** — A capacidade das culturas doadoras produzirem bacteriocinas foi observada em se utilizando o método clássico de FREDERICQ<sup>7</sup>.

## RESULTADOS

A evolução da resistência à gentamicina, em *S. typhimurium*, está sintetizada na Tabela I. Encontraram-se 7 diferentes tipos de modelos R, nas estirpes examinadas, destacando-se ACKSSuTNxG como o mais frequente (Tabela II).

Todas as culturas foram capazes de transmitir plasmídeos G diretamente para a K12 F<sup>-</sup>, embora, em alguns casos, os cruzamentos triplices tenham fornecido maior número de recombinantes. Dezesesseis linhagens auto-transferiram um único tipo de plasmídeo G, 23 transferiram 2 e as 3 culturas restantes transmitiram 3 diferentes modelos R. O plasmídeo mais frequentemente transferido foi ASSuGK (45 vezes), seguido de ACK (29). Por outro lado, fatores 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  $\Delta$  (Tabela II).

Os níveis de resistência à gentamicina nas culturas de *Salmonella* oscilaram entre 8-64 µg/ml, enquanto na K12 F<sup>-</sup> foram geralmente de 8, raramente ultrapassando 16 µg/ml. A frequência de auto-transferência dos plasmídeos G variou entre  $5 \times 10^{-1}$  —  $1 \times 10^{-6}$ . Seus diferentes marcos foram re-transferidos da K12 F<sup>-</sup> para a K12 Hfr, como um único grupo de ligação, indicando um permanente estado associativo entre os determinantes R e o RTF (Classe I). Todos os plasmídeos G estudados comportaram-se como Fi<sup>-</sup>, permitindo a multiplicação de  $\mu^2$  na K12 Hfr. Além disso, eles não restringiram a multiplicação do fago feminino  $\phi^2$  na K12 F<sup>-</sup>. 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		2.º semestre	
	No	Ex % R	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	90	61,1
Diversos	82	0,0	124	1,6	127	25,2	151	35,1	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	1
		AGK	8
		CGK	1
		ASSuGK	9
		ACSSuGK	1
ASSuNxGK	1	AGK	1
		ASSuGK	1
ACSSuNxGK	8	AGK	5
		ASSuGK	8
ACSSuTGK	9	GK	1
		AGK	3
		CGK	1
		ASSuGK	9
		ACSSuTGK	1
ACSSuTNxGK	14	AGK	11
		ASSuGK	14
ACSSuFuNxGK	1	ASSuGK	1
ACSSuTFuNxGK	3	AGK	1
		ASSuGK	3
		ACSSuTGK	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 hospitalar<sup>8</sup>. Problema idêntico não se observou na África do Sul, em relação à *E. coli*, apesar do emprego oral da gentamicina no tratamento de gastroenterites<sup>6</sup>. 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 Fi<sup>-</sup>, mesmo em plasmídeos contendo o determinante C, característica rara em culturas selvagens<sup>11</sup>, indicam notável semelhança com o plasmídeo Gk, isolado na França, de diversas enterobactérias, especialmente *Klebsiella*, por WITCHITZ & CHABBERT<sup>12</sup>. Este plasmídeo governa a síntese de uma adenilase que inativa a gentamicina, kanamicina e tobramicina sem afetar os aminoglicosídeos do grupo paromomicina-neomicina<sup>5</sup>. Isso não implica, entretanto, que as culturas de *S. typhimurium* multirresistentes, portadoras de Gk, sejam susceptíveis 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<sup>9,10</sup>. 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<sup>-</sup>, 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 gentamicina<sup>8</sup>. 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 franceses<sup>13</sup>. 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* fagotipo 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%)<sup>8</sup>. 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 H/r 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 gastroenterites,

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 conseqüente inutilização terapêutica dos três mais potentes aminoglicosídeos disponíveis, atualmente.

#### SUMMARY

##### *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.

#### REFERENCIAS 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 *Salmonellae* 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. MAGALHÃES, 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.; OKSNIDHI, M.; KONDO, S.; HAMURA, K.; UTAHARA, R.; MAEDA, K. & MITSUHASHI, 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 a la gentamicine I — expression du caractère de résistance. *Ann. Inst. Pasteur* 121:733-742, 1971.
  13. WITCHITZ, J. L. & CHABBERT, Y. A. — Résistance transférable a la gentamicine II — transmission et liaisons du caractère de résistance. *Ann. Inst. Pasteur* 122:367-378, 1972.
- Recebido para publicação em 3/9/1974.