

## SENSIBILIDADE "IN VITRO" À SULFADIAZINA E A 5 ANTIBIÓTICOS DE 166 AMOSTRAS DE *SHIGELLA*, ISOLADAS EM SÃO PAULO, BRASIL

Maria Eliza ZULIANI (1) e Luiz Rachid TRABULSI (2)

### R E S U M O

Determinou-se a sensibilidade de 166 amostras de *Shigella*, isoladas em São Paulo, entre 1962 e 1966, à Sulfadiazina, Estreptomina, Tetraciclina, Cloranfenicol, Neomicina e Hetacilina. Das amostras, 89,75% foram resistentes à Sulfadiazina, 42,17% à Estreptomina, 32,53% à Tetraciclina, 24,70% ao Cloranfenicol, 15,66% à Neomicina e 1,2% à Hetacilina. Considerando-as segundo o ano de isolamento, o número de resistentes à Estreptomina, Tetraciclina, Cloranfenicol e Neomicina, foi bastante mais elevado em 1966 do que nos anos anteriores. O número de amostras resistentes à Sulfadiazina, embora tenha aumentado discretamente, foi elevado desde 1962. Quanto à Hetacilina, as duas únicas resistentes foram isoladas em 1964. A maioria das amostras apresentou resistência simultânea à duas ou mais drogas, tendo sido raras aquelas resistentes à um só antibiótico. Amostras com resistência exclusiva à Neomicina ou ao Cloranfenicol, não foram encontradas. O número de amostras simultaneamente resistentes a duas ou mais drogas, foi mais elevado em 1966 do que nos anos anteriores, graças a um brusco aumento de frequência da amostra simultaneamente resistente à Sulfadiazina, Estreptomina, Tetraciclina, Cloranfenicol e Neomicina. Os resultados são discutidos e comparados com os de Autores que realizaram estudos semelhantes.

### I N T R O D U Ç Ã O

Várias publicações demonstram extensas modificações na sensibilidade de amostras de *Shigella* aos sulfamídicos e antibióticos. Basicamente, tais modificações compreendem: 1) aumento progressivo do número de amostras resistentes, quando se considera o comportamento das mesmas frente a cada uma das drogas<sup>1, 7, 8</sup> e 2) predomínio, nos últimos anos, de amostras com resistência simultânea à várias drogas, em particular daquelas resistentes à Sulfadiazina, Estreptomina, Te-

traciclina e Cloranfenicol<sup>5, 9, 10</sup>. Considerando a importância prática de tais verificações, bem como as suas implicações na compreensão do fenômeno da resistência bacteriana à drogas, resolvemos realizar o presente trabalho com o objetivo de verificar se as modificações acima mencionadas ou outras, têm ocorrido em amostras de *Shigella* isoladas em nosso meio.

Para fins de avaliação, incluímos ainda no presente trabalho, um novo antibiótico, a

Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Diretor: Prof. Dr. Carlos da Silva Lacaz)

- (1) Instrutora do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil e ex-bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- (2) Professor-Assistente Docente de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; Professor Regente da Cadeira de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, São Paulo, Brasil

Hetacilina, o qual, em provas preliminares, mostrou-se bastante ativo contra as mesmas bactérias.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Determinou-se a sensibilidade de 166 amostras de *Shigella* à Sulfadiazina (A/S Syntetic), Estreptomicona (Sulfato de Estreptomicona, Fontoura Wyeth), Tetraciclina (Cloridrato de Tetraciclina, Quimasa S.A.), Cloranfenicol (Lepetit), Neomicina (Sulfato de Neomicina, Squibb) e à Hetacilina (Potassium Hetacilin, Laborterápica Bristol). Todas as amostras foram isoladas em nossos laboratórios das fezes de pacientes, provenientes de várias áreas da cidade de São Paulo e identificadas por métodos bioquímicos e sorológicos. Desde a época do isolamento, foram mantidas em tubos de ágar nutriente, fechados com rôlha de cortiça parafinada. Como não se encontrou relação entre tipo sorológico e resistência, apresentamos na Tabela I apenas o número de amostras pertencentes a cada um dos subgrupos, de acordo com o ano de isolamento. Devemos salientar, porém, que às 6 amostras de *Shigella dysenteriae* correspondiam ao tipo 2, as 136 de *Shigella flexneri* a todos os tipos, com predomínio dos tipos 2, 3 e 1 e as 3 de *Shigella boydii* aos tipos 1, 2 e 12.

A sensibilidade à antibióticos foi determinada pelo método da diluição em tubos, as seguintes concentrações de cada um tendo sido utilizadas: 1,56, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg da base do antibiótico por ml do meio de cultura. A Hetacilina foi dissolvida em tampão fosfato pH 8 e os demais antibióticos,

de acordo com as recomendações de GROVES & RANDALL<sup>2</sup>. O inóculo foi 0,01 ml de uma cultura em caldo, incubada durante 6 horas a 37°C. O meio de cultura foi caldo Lab-Lemco, Oxoid. Os resultados foram lidos após 20 horas de incubação a 37°C. A determinação da sensibilidade à Sulfadiazina foi feita pelo método da diluição em meio sólido, usando-se como meio de cultura, Agar Lab-Lemco, Oxoid, adicionado de sangue hemolisado de cavalo<sup>3</sup>. As seguintes concentrações de Sulfadiazina foram utilizadas: 1, 5, 10, 25 e 50 mg da base por 100 ml do meio de cultura. O inóculo foi o conteúdo de uma alça de platina de 2 mm de diâmetro, retirado de uma cultura de 20 horas a 37°C, em caldo Lab-Lemco, diluída a 1/1.000 no mesmo meio. Os resultados foram lidos após 20 horas de incubação das placas a 37°C. Tanto para as provas de sensibilidade com antibióticos como com Sulfadiazina, foi usada como testemunha da atividade das drogas, uma cultura de *Shigella flexneri* sensível a 1,56 µg/ml dos antibióticos e a 1 mg% de Sulfadiazina. As amostras que proliferaram na concentração de 12,5 µg/ml do antibiótico ou em concentrações mais elevadas e na concentração de 25 mg% de Sulfadiazina, foram designadas resistentes. As demais foram consideradas sensíveis.

#### RESULTADOS

Apresentaremos os resultados obtidos com a Sulfadiazina, Estreptomicona, Tetraciclina, Cloranfenicol e Neomicina separadamente dos obtidos com a Hetacilina.

TABELA I

Distribuição das amostras de *Shigella*, segundo os subgrupos e o ano de isolamento

Subgrupos	Ano de isolamento					Total
	1962	1963	1964	1965	1966	
<i>Sh. dysenteriae</i>	0	2	2	1	1	6
<i>Sh. flexneri</i>	11	33	31	30	28	133
<i>Sh. boydii</i>	0	0	1	0	2	3
<i>Sh. sonnei</i>	3	4	4	9	4	24
Total	14	39	38	40	55	166

Com relação aos primeiros, verifica-se na Tabela II, que das 166 amostras de *Shigella*, 149 proliferam na concentração de 50 mg% e as 17 restantes foram inibidas por 1 mg% de Sulfadiazina, não se encontrando assim, amostras com resistência às concentrações intermediárias da droga. Verifica-se ainda, na mesma Tabela, o número de amostras resistentes a cada uma das concentrações dos antibióticos. Deixando-se de considerar as amostras resistentes às concentrações mais baixas (1,56 — 6,25 µg/ml), a maioria foi

resistente à concentração de 100 µg/ml de Estreptomicina, Tetraciclina, Cloranfenicol e Neomicina. Entretanto, várias foram resistentes às concentrações de 12,5, 25 e 50 µg/ml das mesmas drogas. Ainda na mesma Tabela, encontra-se o número e percentagem das amostras designadas resistentes. A variação das mesmas segundo o ano de isolamento, é representada na Tabela III e Fig. 1. Os resultados obtidos indicam progressivo aumento do número de resistentes à Sulfadiazina e Estreptomicina, a partir de 1963, e às de

TABELA II

Número de amostras de *Shigella* resistentes às diferentes concentrações de Sulfadiazina, Estreptomicina, Tetraciclina, Cloranfenicol e Neomicina

mg %	< 1	1	5	10	25	50	Total	N.º de amostras resistentes à 25 mg% ou mais	
Sulfadiazina	17	0	0	0	0	149	166	149 (89,75%)	

µg/ml	< 1,56	1,56	6,25	12,5	25	50	100	Total	N.º de amostras resistentes à 12,5 ou mais µg/ml	
Estreptomicina	61	29	6	4	13	17	36	166	70 (42,17%)	
Tetraciclina	68	32	12	6	4	5	39	166	54 (32,53%)	
Cloranfenicol	34	85	6	4	3	7	27	166	41 (24,70%)	
Neomicina	33	106	1	3	3	3	17	166	26 (15,66%)	

TABELA III

Distribuição das amostras de *Shigella* resistentes a cada uma das drogas segundo o ano de isolamento

Ano	N.º amostras	Sulfadiazina		Estreptomicina		Tetraciclina		Cloranfenicol		Neomicina	
		N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
1962	14	13	92,85	5	35,17	2	14,28	2	14,28	0	0
1963	39	32	82,05	8	20,50	9	23,07	6	15,38	2	5,12
1964	38	34	89,47	17	44,73	11	28,94	8	21,05	4	10,52
1965	40	37	92,50	19	47,50	12	30,00	10	25,00	6	15,00
1966	35	33	94,28	21	60,00	20	57,14	15	42,86	14	40,00
Total	166	149	89,75	70	42,17	54	32,53	41	24,70	26	15,66

mais drogas, a partir de 1962. É de se notar porém, que o número de amostras resistentes à Sulfadiazina, foi extremamente elevado desde o primeiro ano.

Na Tabela IV encontra-se o número de amostras com resistência isolada à Sulfadiazina e aos antibióticos, bem como o número daquelas apresentando resistência múltipla. Verifica-se: 1) 70 foram resistentes somente à Sulfadiazina; 2) apenas uma, foi resistente à Estreptomicina e outra à Tetraciclina; 3) não ocorreram amostras com resistência exclusiva ao Cloranfenicol ou à Neomicina; 4) das amostras com resistência múltipla, foram mais frequentes aquelas resistentes à Sulfadiazina e Estreptomicina;

Sulfadiazina, Estreptomicina e Tetraciclina; Sulfadiazina, Estreptomicina, Tetraciclina e Cloranfenicol; e Sulfadiazina, Estreptomicina, Tetraciclina, Cloranfenicol e Neomicina. Na Tabela V encontra-se a distribuição da amostra simultaneamente resistente às 5 últimas drogas, segundo o ano de isolamento. Estudo mais detalhado sobre a variação das amostras apresentando resistência múltipla, será publicado em separado. Finalmente, na Tabela VI, é apresentada a distribuição das amostras sensíveis e resistentes à uma ou mais drogas, segundo o ano de isolamento. Das 166, somente 17 foram sensíveis às 5 drogas e 149 resistentes. Destas, 72 foram resistentes apenas à uma droga e 77 à duas

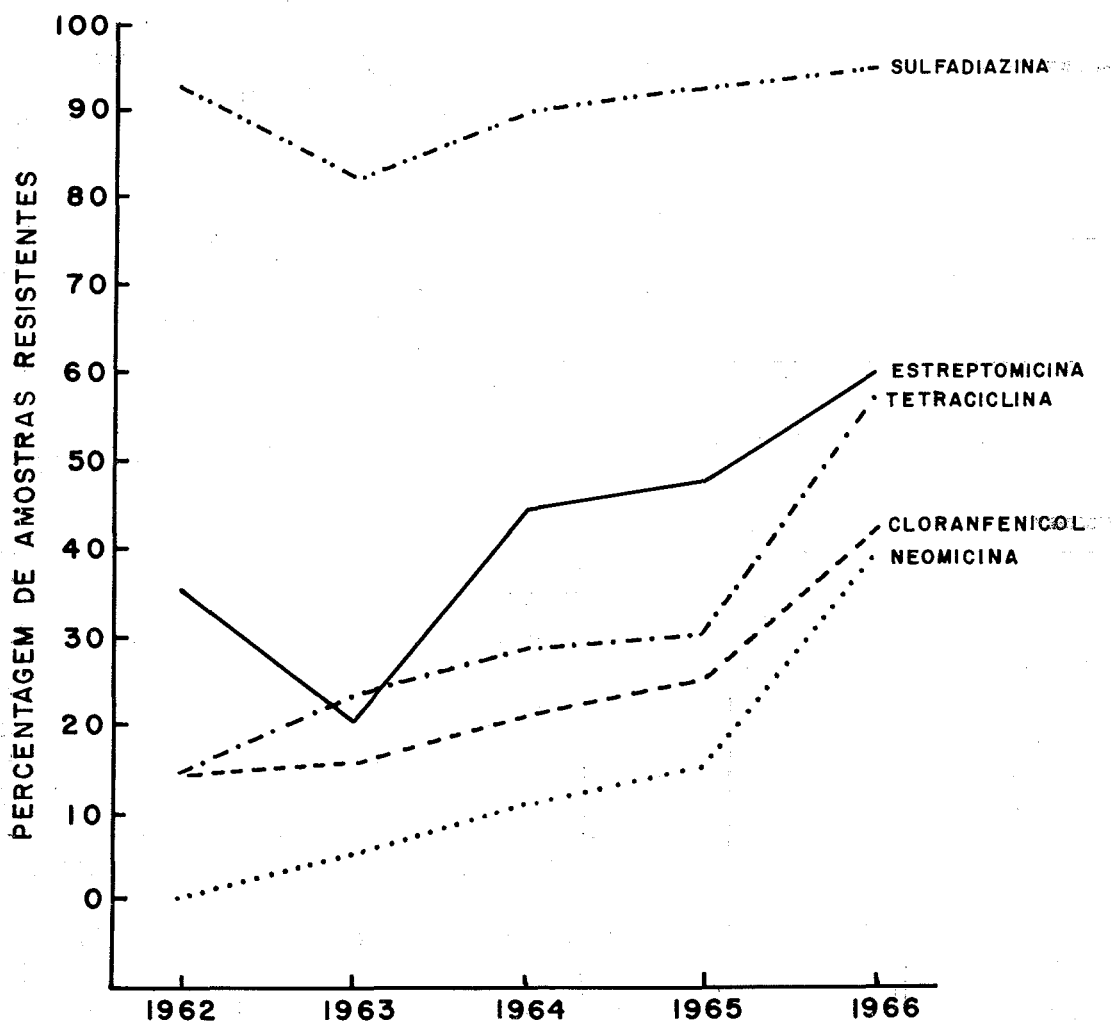


Fig. 1 — Distribuição das amostras de *Shigella* resistentes, segundo o ano de isolamento

TABELA IV

Modélos de resistência encontrados entre as 149 amostras de *Shigella* resistentes

Modélos de resistência	N.º de amostras
Sulfadiazina	70
Estreptomicina	1
Tetraciclina	1
Cloranfenicol	0
Neomicina	0
Su E	21
Su C	3
Su T	3
Su E T	9
Su T C	1
Su E C	1
Su E N	1
Su E T C	13
Su T C N	1
Su E C N	1
Su E T N	4
Su E T C N	19
Total	149

Su = Sulfadiazina  
 E = Estreptomicina  
 T = Tetraciclina  
 C = Cloranfenicol  
 N = Neomicina

ou mais drogas. Verifica-se, ainda, diminuição do número de amostras sensíveis às 5 drogas e do número daquelas resistentes à 1; ao contrário, ocorreu aumento progressivo do número de amostras resistentes à duas ou mais drogas.

Na Tabela VII encontram-se os resultados obtidos com a Hetacilina, observando-se que somente 2 amostras (1,2%) foram resistentes, sendo uma a 25 e outra a 100 µg/ml do antibiótico. Uma foi simultaneamente resistente à Hetacilina, Sulfadiazina, Estreptomicina, Tetraciclina, Cloranfenicol e Neomicina; outra foi resistente a todos, menos à Neomicina.

DISCUSSÃO

Considerando-se os resultados obtidos com a Sulfadiazina, Estreptomicina, Tetraciclina, Cloranfenicol e Neomicina, é evidente aumento progressivo do número de amostras resistentes, quer se considere o comportamento das mesmas frente a cada uma das drogas (Tabela III e Fig. 1) ou se as estude mais em conjunto, isto é, tomando-as como sensíveis ou resistentes às 5 drogas, resistentes à uma e resistentes à duas ou mais (Tabela VI). Assim, e de acôrdo com as verificações realizadas no Japão<sup>5, 10</sup>, ocorreu diminuição progressiva do número de amostras sensíveis, graças a um crescente aumento do número com resistência simultânea à várias drogas, uma vez que, o número de amostras com resistência exclusiva à uma droga, diminuiu gradualmente durante o mesmo pe-

TABELA V

Distribuição da amostra de *Shigella* simultaneamente resistente à Sulfadiazina, Estreptomicina, Tetraciclina, Cloranfenicol e Neomicina, segundo o ano de isolamento

	Ano de isolamento				
	1962 <sup>1</sup>	1963	1964	1965	1966
Amostras provadas	N.º 14	39	38	40	35
Amostra com resistência à Sulfadiazina, Estreptomicina, Tetraciclina, Cloranfenicol, Neomicina	N.º 0	1	3	5	10
	% 0	2,56	7,89	12,5	28,75

ríodo. Conforme mencionamos, o estudo da variação de freqüência das amostras com os diferentes modelos de resistência múltipla, será publicado em separado, mas vale notar aqui, que o aumento do número de resistentes se deve principalmente, a um brusco aumento de freqüência da amostra simultaneamente resistente às 5 drogas, isto é, à

Sulfadiazina, Estreptomicina, Tetraciclina, Cloranfenicol e Neomicina. De fato, verifica-se na Tabela V, que esta representou quase 30% das amostras de *Shigella* isoladas em 1966, embora não tivesse sido encontrada em 1962 e representasse apenas 2,56% das isoladas em 1963. Tais modificações assemelham-se, também, às registradas pelos Au-

TABELA VI

Distribuição das amostras de *Shigella* sensíveis e resistentes a uma ou mais drogas, segundo o ano de isolamento

Ano	Sensíveis às 5 drogas		Resistentes a qualquer das drogas		Resistentes a uma droga		Resistentes a duas ou mais drogas	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
1962	1	7,14	13	92,85	8	57,14	5	35,71
1963	7	17,94	32	82,05	22	56,41	10	25,64
1964	4	10,52	34	89,47	16	42,10	18	47,36
1965	4	10,00	36	90,00	14	35,00	22	55,00
1966	1	2,85	34	97,14	12	34,28	22	62,85
Total	17	10,24	149	89,75	72	43,37	77	46,38

TABELA VII

Número de amostras de *Shigella* resistentes às diferentes concentrações de Hetacilina segundo o ano de isolamento

Ano	N.º amostras	Hetacilina (µg/ml)							N.º de amostras resistentes a 12,5 µg/ou mais por ml
		< 1,56	1,56	6,25	12,5	25	50	100	
1962	14	5	8	1	0	0	0	0	0
1963	39	9	28	2	0	0	0	0	0
1964	38	7	27	2	0	1	0	1	2 (5,12%)
1965	40	5	31	4	0	0	0	0	0
1966	35	4	29	2	0	0	0	0	0
Total	166	30	123	11	0	1	0	1	2 (1,2%)

tores japoneses<sup>5, 10</sup>, diferindo, porém, quanto ao tipo de amostra que vem predominando nos últimos anos. No Japão, embora já se tenha isolado amostra com modelo de resistência idêntico ao encontrado na que tende a predominar entre as estudadas por nós<sup>6</sup>, tem sido mais freqüente naquele país uma, simultaneamente resistente à 4 drogas, isto é, à Sulfadiazina, Estreptomicina, Tetraciclina e Cloranfenicol<sup>5, 6, 10</sup>.

Os resultados expressos na Tabela IV, demonstram que embora ainda ocorram, com relativa freqüência, amostras com resistência exclusiva à Sulfadiazina, o mesmo não ocorre com relação aos antibióticos. A resistência à êstes foi, na quase totalidade das vezes, uma resistência múltipla, associada sempre com resistência à Sulfadiazina. A escassez de amostras de *Shigella* com resistência exclusiva à um só antibiótico, parece ser universal atualmente, pois tanto SCHUH & ALDOVÁ<sup>9</sup>, como WATANABE<sup>10</sup> e MITSUHASHI<sup>5</sup> referem resultados extremamente parecidos, respectivamente na Checoslovaquia e no Japão. Infelizmente, os Autores mencionados não fazem referência à Neomicina, mas a julgar pelos nossos resultados, parecem ser raras ou mesmo não ocorrem amostras de *Shigella* com resistência exclusiva à êste antibiótico. Aliás, fato idêntico foi verificado no Japão, com relação ao Cloranfenicol<sup>5, 10</sup>. Os diferentes modelos de resistência encontrados entre as shigelas estudadas, não podem ser comparados porque os Autores que realizaram trabalhos semelhantes não incluíram<sup>9</sup> ou deixam dúvidas quanto à inclusão da Neomicina em seus estudos<sup>5, 10</sup>. Em todo o caso, vale notar que todos os modelos referidos por êles, também foram encontrados por nós.

Procurou-se demonstrar ainda com os resultados expressos na Tabela II, o número de amostras resistentes às diferentes concentrações de cada droga, sendo interessante notar ausência de amostras com resistência às concentrações intermediárias de Sulfadiazina, o que nos indica ser sempre elevada a resistência de shigelas à esta droga, fato, aliás, já verificado por outros<sup>4</sup>. Já com relação aos antibióticos, o mesmo não ocorreu, pois, embora a maioria das amostras resistentes proliferassem na concentração de 100 µg/ml, foram relativamente freqüentes

amostras com resistência às concentrações de 12,5, 25 e 50 µg/ml. As possíveis relações entre níveis e natureza da resistência, estão sendo investigadas mais detalhadamente no momento.

Os resultados obtidos com a Hetacilina (Tabela VII) demonstram que êste antibiótico foi extremamente ativo, pois entre as 166 amostras de *Shigella* estudadas, apenas duas (1,2%) isoladas em 1964 foram resistentes à concentrações elevadas. O número de amostras resistentes à cada uma das demais drogas, foi bastante superior, em particular, se considerarmos as isoladas mais recentemente. Tais resultados poderiam ser esperados, pois a Hetacilina é ativa contra os germes Gram-negativos e ainda não foi empregada em nosso meio.

#### SUMMARY

"In vitro" sensitivity of 166 *Shigella* strains isolated in São Paulo, Brasil, to Sulphadiazine and five antibiotics

Sensitivity of 166 *Shigella* strains isolated in São Paulo to Sulphadiazine and five antibiotics, was determined by the tube dilution method. All the strains were isolated in São Paulo, between 1962 and 1966. 89.75% of the strains were resistant to Sulphadiazine, 42.17% to Streptomycin, 32.53% to Tetracyclin, 24.70% to Chloramphenicol, 15.66% to Neomycin and only 1.2% to Hetacillin. If the strains are considered according to year of isolation, the number of resistant to Streptomycin, Tetracyclin, Chloramphenicol and Neomycin was significantly higher in 1966 than in previous years. A discrete increase in the number of strains resistant to Sulphadiazine was also observed, but the number of the sulpha-resistant strains was very high since 1962. In regard to Hetacillin the only two resistant strains were isolated in 1964. The majority of the strains was simultaneously resistant to two or more drugs. Strains with exclusive resistance to one antibiotic were very rare and none with exclusive resistance to Neomycin or Chloramphenicol was found. The percentage of strains simultaneously resistant to two or more drugs was higher in 1966 than in the previous years. The main reason for that

was a remarkable increase in the number of a strain simultaneously resistant to Sulphadiazine, Streptomycin, Tetracyclin, Chloramphenicol and Neomycin. The results are discussed and compared with those reported by some Authors in other countries.

#### AGRADECIMENTOS

A Dra. Wilma Regis Stangl, da Faculdade de Medicina da Universidade da Bahia, pela colaboração prestada no início deste trabalho e ao Instituto Brasileiro de Estudos e Pesquisas de Gastroenterologia, pelo auxílio financeiro.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FISCHLER, E. & WALLIS, K. — Investigation of drug sensitivity in *Shigella* and its correlation with "in vivo" sensitivity. *Ann. Pediat.* 201:49-63, 1963.
2. GROVE, D. C. & RANDALL, W. A. — *Assay Methods of Antibiotics. A Laboratory Manual.* New York, Medical Encyclopedia, Inc., 1955.
3. HARPER, G. J. & CAWSTON, W. C. — The "in vitro" determination of the sulpho-namide sensitivity of bacteria. *J. Path. Bact.* 57:59-66, 1945.
4. MARBURG, K.; ALTMAN, G. & ESHKOL-BAUCK, A. — Observation on resistance to sulphadiazine and antibiotics in shigellosis. *Amer. J. Trop. Med.* 7:51-57, 1958.
5. MITSUHASHI, S. — Transmissible drug-resistance factor R with special reference to replication. *Gunma J. Med. Sc.* 4:169-209, 1965.
6. MITSUHASHI, S. — Comunicação pessoal, 1967.
7. OLARTE, J.; GARLINKO, E. & JOACHIN, A. — Sensitivity of *Salmonella*, *Shigella* and Enteropathogenic *Escherichia coli* species to Cephalotin, Ampicilin, Chloramphenicol and Tetracycline. New York, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, págs. 787-793, 1962.
8. ROSANSKY, R.; BIRBAUN, M. D. & BAUARI, J. — Sensitivity of *Shigella* isolated during 1954 and 1957 to five antibiotics. *J. Lab. Clin. Med.* 52:728-732, 1958.
9. SCHUH, V. & ALDOVÁ, E. — Multiple drug resistant *Shigellae*. *Zbl. Bakt. (Naturwiss)* 200:460-467, 1966.
10. WATANABE, T. — Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bact. Rev.* 27:87-115, 1963.

Recebido para publicação em 28/9/1967.