

RESISTÊNCIA A DROGAS EM BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS ISOLADAS DE SECREÇÕES PURULENTAS

Gilberti MORENO, Carlos A. M. LOPES e Regina M. S. T. DECARLIS

RESUMO

Determinou-se a resistência aos agentes antibacterianos em 81 amostras de bactérias isoladas de secreções purulentas de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas, correspondendo a 27 amostras de *Escherichia coli*, 12 de *Proteus mirabilis*, seis de *Proteus vulgaris*, duas de *Proteus rettgeri*, sete de *Proteus morganii* e 27 de *Pseudomonas aeruginosa*. Pesquisou-se ainda nessas amostras a presença de fator R, tendo o mesmo sido mobilizado para receptores em 12,34% das amostras analisadas.

INTRODUÇÃO

O isolamento de bactérias resistentes aos antibióticos e quimioterápicos assume percentagem alarmante. Este fato é decorrente da utilização abusiva e indiscriminada de drogas antibacterianas e da possibilidade que tem o microrganismo em adquirir resistência através de mutação e aquisição de fatores R.

Em nosso meio e particularmente para a espécie humana, a seleção de Gram negativos indica resistência simultânea a cinco ou mais drogas, sendo o cloranfenicol, a neomicina, a tetraciclina, a estreptomicina e a sulfadiazina as principais drogas comprometidas⁵. Como sabemos, esta polirresistência é consequência de aquisição de fatores R por parte do microrganismo, mecanismo de resistência mais trivial encontrado entre os Gram negativos.

O presente trabalho analisa a resistência a drogas oferecida por bactérias isoladas de secreções purulentas humanas. Indica ainda nessas amostras a presença de fatores R.

MATERIAL E MÉTODOS

1) Amostragem

Foram utilizadas 81 amostras de bactérias isoladas de secreções purulentas, obtidas de

pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas, correspondendo a: 27 amostras de *Escherichia coli*; 12 de *Proteus mirabilis*; seis de *Proteus vulgaris*; duas de *Proteus rettgeri*; sete de *Proteus morganii* e 27 de *Pseudomonas aeruginosa*.

As enterobactérias foram identificadas através de técnicas preconizadas por EDWARDS & EWING⁴. Para *Pseudomonas aeruginosa* empregou-se o ágar sangue de ovino como meio de isolamento inicial e procurou-se pesquisar a prova de: oxidase, V. M., V. P., catalase, produção de pigmento, atividade sobre a uréia e fermentação da glicose.

2) Resistência a drogas antibacterianas

A sensibilidade das amostras isoladas foi testada frente à sulfadiazina, à cefalotina, à hetacilina, ao cloranfenicol, à kanamicina, à neomicina, à tetraciclina, à estreptomicina, à ampicilina, à gentamicina, à eritromicina, à carbincilina e ao ácido nalidíxico. Utilizou-se a técnica da diluição do antibiótico em placa⁷ e concentrações das drogas que variaram de 1 a 1000 µg/ml.

3) Pesquisa de fator R nas amostras isoladas

3.1) Amostras receptoras

Foram usados dois tipos de receptores:

3.1.1) *Escherichia coli* 0111:B4, Lac⁺, resistente a 100 µg/ml de ácido nalidíxico e sensível a: 10 µg/ml de sulfadiazina; 5 µg/ml de cefalotina e ampicilina; 1 µg/ml de cloranfenicol, tetraciclina, hetacilina, kanamicina, estreptomicina, neomicina, gentamicina, eritromicina e carbinicilina, quando da conjugação com *Proteus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

3.1.2) *Escherichia coli* K12, Lac⁺, F⁻, pro⁻, met⁻, resistente a 100 µg/ml de ácido nalidíxico e sensível a: 5 µg/ml de sulfadiazina, cefalotina, hetacilina, cloranfenicol, kanamicina, neomicina, tetraciclina, estreptomicina, ampicilina, gentamicina, eritromicina e carbinicilina, quando da conjugação com *Escherichia coli*.

3.2) Verificação da Transferência de Resistência

3.2.1) Preparo das amostras doadoras e receptoras

Para esta finalidade empregou-se o Brain-Heart Infusion-Oxoid, onde as amostras doadoras e receptoras foram cultivadas por 24 horas a 37°C. Para o efeito da conjugação misturou-se 0,2 ml de cada cultura em 10 ml do meio acima referido. Todos os tubos foram colocados em estufa por 24 horas a 37°C.

3.2.2) Seleção das linhagens receptoras

O meio escolhido foi o MacConkey Agar n.º 3 Oxoid, onde 0,1 ml da cultura mista diluída a 1/1000 foi semeada. Quando da conjugação das amostras doadoras com *Escherichia coli* 0111:B4 (conforme 3.1.1) e *Escherichia coli* K12 (conforme 3.1.2) as placas seletoras, além das drogas a serem testadas, continham ainda ácido nalidíxico na concentração de 50 µg/ml.

Uma possível atividade antagônica entre as linhagens doadoras e receptoras foi controlada através de semeadura da cultura mista em placas contendo MacConkey Agar n.º 3 — Oxoid sem droga antibacteriana e incubadas a 37°C por 24 horas.

Utilizou-se nas placas seletoras a concentração de 25 µg/ml para todas as drogas consideradas. Após a purificação das amostras receptoras que receberam a resistência, três colônias de cada placa foram isoladamente semeadas em Brain-Heart Infusion-Oxoid, trabalhando-se a seguir como em 2.

RESULTADOS

Após a determinação dos níveis de resistência, procurou-se separar as amostras bacterianas em população sensível e população resistente. Para tanto foram consideradas resistentes obviamente doadoras as amostras que cresceram em: 50 µg/ml ou mais de sulfadiazina, cloranfenicol, neomicina, tetraciclina, estreptomicina e eritromicina; 100 µg/ml ou mais de kanamicina e ampicilina; 200 µg/ml ou mais de hetacilina e carbinicilina, quando tratava-se de *Escherichia coli*. A população resistente de *Pseudomonas aeruginosa* enquadrou-se em: 20 µg/ml ou mais de sulfadiazina, ácido nalidíxico e eritromicina; 50 µg/ml ou mais de tetraciclina; 100 µg/ml ou mais de hetacilina, cloranfenicol, neomicina, estreptomicina, ampicilina, gentamicina e carbinicilina; 200 µg/ml ou mais de cefalotina e kanamicina. Para *Proteus* considerou-se: 20 µg/ml ou mais de cefalotina, hetacilina, cloranfenicol, kanamicina, neomicina, tetraciclina e eritromicina; 50 µg/ml ou mais de sulfadiazina, gentamicina e carbinicilina; 100 µg/ml ou mais de estreptomicina e ampicilina. Estes resultados encontram-se sumariados nos Quadros I, II e III, respectivamente.

No Quadro IV observa-se que em *Escherichia coli* não foram encontradas amostras resistentes à cefalotina e à gentamicina. Resistência ao ácido nalidíxico só foi revelada em *Pseudomonas aeruginosa* (37,0%).

De todas as drogas utilizadas a gentamicina foi o antibiótico que melhor atividade antibacteriana demonstrou frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus*. Foram encontradas amostras resistentes à carbinicilina, 7,4% para *Pseudomonas aeruginosa* e 11,1% para *Proteus*.

No Quadro V estão contidos os sete modelos de resistência transferidos. Nota-se que *Escherichia coli* contribuiu com o maior

MORENO, G.; LOPES, C. A. M. & DECARLIS, R. M. S. T. — Resistência a drogas em bactérias Gram negativas isoladas de secreções purulentas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15:116-121, 1973.

QUADRO I

Níveis de resistência de 27 amostras de *Escherichia coli*, isoladas de secreções purulentas, segundo as concentrações em $\mu\text{g/ml}$ de cada droga. São Paulo, 1972

Drogas	$\mu\text{g/ml}$										Total
	1000	500	200	100	50	20	10	5	1	<1	
	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	
Sulfadiazina	19	1	2	2	1	—	—	—	—	2	27
Cefalotina	—	—	—	—	—	—	3	6	15	3	27
Hetacilina	3	2	3	—	—	1	4	5	9	—	27
Cloranfenicol	—	—	—	3	7	—	1	4	10	2	27
Kanamicina	—	—	—	4	—	—	—	2	1	20	27
Neomicina	—	—	—	—	5	—	2	2	3	15	27
Tetraciclina	—	—	—	10	9	—	2	3	3	—	27
Estreptomicina	1	—	—	—	5	—	3	5	6	7	27
Ampicilina	4	2	2	2	—	—	—	—	15	2	27
Gentamicina	—	—	—	—	—	—	—	—	3	24	27
Eritromicina	—	—	—	—	4	—	11	10	2	—	27
Carbincilina	5	2	2	—	—	—	1	3	10	4	27
Ac. Nalidixico	—	—	—	—	—	—	—	2	23	2	27

QUADRO II

Níveis de resistência de 27 amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, isoladas de secreções purulentas, segundo as concentrações em $\mu\text{g/ml}$ de cada droga. São Paulo, 1972

Drogas	$\mu\text{g/ml}$										Total
	1000	500	200	100	50	20	10	5	1	<1	
	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	
Sulfadiazina	7	7	4	3	3	3	—	—	—	—	27
Cefalotina	20	2	5	—	—	—	—	—	—	—	27
Hetacilina	5	8	6	8	—	—	—	—	—	—	27
Cloranfenicol	—	—	—	6	—	16	1	1	3	—	27
Kanamicina	—	—	1	—	—	13	10	1	2	—	27
Neomicina	—	—	1	6	—	15	3	—	2	—	27
Tetraciclina	—	1	1	14	10	—	1	—	—	—	27
Estreptomicina	—	1	1	1	—	1	6	16	1	—	27
Ampicilina	5	12	5	4	—	1	—	—	—	—	27
Gentamicina	—	—	—	1	—	—	15	10	1	—	27
Eritromicina	—	—	—	3	16	6	—	2	—	—	27
Carbincilina	1	—	—	1	—	—	6	19	—	—	27
Ac. Nalidixico	—	—	—	—	—	10	—	12	3	2	27

número de amostras que mobilizaram o fator R (25,9%), predominando o modelo Su-T-CI com 11,1%.

Para todas as amostras consideradas a mobilização do fator R alcançou o valor de 12,34%.

DISCUSSÃO

Depreende-se pela análise dos resultados que os microrganismos isolados de secreções purulentas comportaram-se como células resistentes as drogas antibacterianas empregadas.

MORENO, G.; LOPES, C. A. M. & DECARLIS, R. M. S. T. — Resistência a drogas em bactérias Gram negativas isoladas de secreções purulentas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15:116-121, 1973.

QUADRO III

Níveis de resistência de 27 amostras de *Proteus* isolados de secreções purulentas, segundo as concentrações em $\mu\text{g/ml}$ de cada droga. São Paulo, 1972

Drogas	$\mu\text{g/ml}$	1000	500	200	100	50	20	10	5	1	<1	Total
		N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	
Sulfadiazina		14	2	4	4	3	—	—	—	—	—	27
Cefalotina		—	1	—	3	1	1	—	1	3	17	27
Hetacilina		2	—	1	4	2	2	—	5	8	3	27
Cloranfenicol		—	—	1	2	3	3	—	5	11	2	27
Kanamicina		1	—	—	6	5	2	—	—	—	13	27
Neomicina		—	—	1	2	3	3	—	8	2	8	27
Tetraciclina		—	1	1	5	13	2	—	5	—	—	27
Estreptomícina		1	1	1	4	—	—	3	3	4	10	27
Ampicilina		—	—	1	3	—	3	1	3	8	8	27
Gentamicina		—	—	—	—	1	—	1	1	1	23	27
Eritromicina		1	—	—	5	7	6	—	8	—	—	27
Carbincilina		1	—	—	—	2	—	1	6	7	10	27
Ac. Nalidíxico		—	—	—	—	—	—	10	12	5	—	27

QUADRO IV

Porcentagem de amostras resistentes, isoladas de secreções purulentas, segundo o microrganismo e droga antibacteriana. São Paulo, 1972

Drogas	microrganismo	<i>Escherichia coli</i> %	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> %	<i>Proteus</i> %
Sulfadiazina		92,4	100,0	100,0
Cefalotina		—	100,0	22,2
Hetacilina		29,6	100,0	40,7
Cloranfenicol		37,0	22,0	33,3
Kanamicina		14,8	3,7	51,8
Neomicina		18,5	25,9	33,3
Tetraciclina		70,4	96,3	81,5
Estreptomícina		22,2	11,1	25,9
Ampicilina		37,0	96,3	14,8
Gentamicina		—	3,7	3,7
Eritromicina		14,8	92,6	70,4
Carbincilina		33,3	7,4	11,1
Ac. Nalidíxico		—	37,0	—

A divisão em duas populações bacterianas é perfeitamente válida, desde que se considere para as drogas utilizadas duas concentrações mínimas inibitórias. Uma para aquela população dita sensível e outra, obviamente mais elevada, para a população resistente, composta de células dotadas de mecanismos especiais e responsáveis pela seleção biológica

dos microrganismos frente aos antibióticos e quimioterápicos, referimo-nos aos mutantes e aos portadores de fatores R.

A visão dos Quadros I, II e III realça a distribuição da população sensível e resistente, relativamente as concentrações das drogas empregadas, e demonstra a polirresistência encontrada em amostra de *Escherichia*

QUADRO V

Transferência de fator R a partir de microrganismos isolados de secreções purulentas. São Paulo, 1972

	Amostras testadas	Amostras R +	Modelos (*) transferidos	Frequência de isolamento %
<i>Escherichia coli</i>	27/7		3 Su-T-Cl 2 Su-T-E 1 T 1 Su	11,1 7,4 3,7 3,7
<i>Proteus mirabilis</i>	12/2		1 Su-Cl-K-N 1 Su-E	8,3 8,3
<i>Proteus vulgaris</i>	6/1		1 Su-T-E-Cl	16,6

(*) Su = Sulfadiazina, T = Tetraciclina, Cl = Cloranfenicol, E = Estreptomicina, K = Kanamicina
N = Neomicina

coli, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus*, isoladas de secreções purulentas humanas. Esta resistência múltipla encontra-se devidamente comprovada^{5, 6, 7, 8, 9, 10, 11}, pelo menos no que se refere às enterobactérias e está relacionada com a presença de fatores R.

Como demonstra o Quadro V esses fatores puderam ser convenientemente comprovados em *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Proteus vulgaris*, atingindo esta população a porcentagem de 12,34% de células que mobilizaram o fator R.

No que diz respeito a dinâmica da transferência de resistência torna-se problemático explicar a transferência parcial revelada por receptores para *Escherichia coli*, já que as amostras doadoras apresentaram-se com polirresistência. Todavia, este fenômeno pode ser justificado pela ocorrência de dois ou mais fatores R com diferentes gens para resistência em uma só cultura. Esta justificativa encontra alicerce nos trabalhos de ANDERSON¹ e CHABBERT & LE MINOR^{2, 3}.

SUMMARY

Drug resistance of Gram-negative rods isolated from purulent discharges

The resistance of 81 strains of Gram-negative rods to several antibiotics was investigated by determining the minimal inhibitory concentrations in serial agar plate dilutions of the therapeutic agents. The above mentioned strains were recovered from purulent discharges showed by interned patients of the Clinical Hospital of the Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas. With this point of view were isolated and tested to drug resistance 27 strains of *Escherichia coli*, 12 strains of *Proteus mirabilis*, six strains of *Proteus vulgaris*, two strains of *Proteus rettgeri*, seven strains of *Proteus morgani* and 27 strains of *Pseudomonas aeruginosa*. As can be seen, was also analysed the presence and the transference of the R-factor to recipient microorganisms. The results obtained showed that 12.34% of the tested strains were able to transfer its resistance markers.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, E. S. — Factures de transfert et résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 112:547-563, 1967.
- CHABBERT, Y. A. & LE MINOR, L. — Transmission de la résistance à plusieurs

- antibiotiques chez les *Enterobacteriaceae*. I. Définition bactériologique générale du transfert. *Presse Med.* (Paris) 74:2047-2410, 1966.
3. CHABBERT, Y. A. & LE MINOR, L. — Transmission de la résistance à plusieurs antibiotiques chez les *Enterobacteriaceae*. II. Bactériologie générale de la résistance; rôle clinique. *Presse Med.* (Paris) 74:2479-2484, 1966.
 4. EDWARDS, P. R. & EWING, H. W. — *Identification of Enterobacteriaceae*. Atlanta, Georgia, Burgess Publishing Company, 1967.
 5. FERNANDES, M. R. F. — *Resistência infecciosa a drogas em culturas de Shigella*. (Tese). São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1968.
 6. FERNANDES, M. R. F. & TRABULSI, L. R. — Infections resistance in pathogenic enteric organism isolated in São Paulo, Brazil. (Preliminary report). *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 10:52-53, 1968.
 7. MORENO, G. — *Resistência infecciosa a drogas em amostras de Escherichia coli isoladas de animais*. (Tese). São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 1971.
 8. MITSUHASHI, S.; HASHIMOTO, H.; EGAWA, R.; TANAKA, T. & NAGAY, Y. — Drug resistance of enteric bacteria. IX. Distribution of R factors in Gram negative bacteria from clinical sources. *J. Bact.* 93:1242-1245, 1967.
 9. PALMEIRA, M. L.; BATALHA, P. de P. & GOMES, V. L. P. — Sobre o aparecimento de resistência múltipla aos antibióticos e quimioterápicos em amostras de shigelas isoladas no Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 69:145-152, 1971.
 10. TRABULSI, L. R. & ZULIANI, M. E. — Estudos sobre a *E. coli* 0111:B4. III. Sensibilidade "in vitro" à sulfadiazina e a seis antibióticos. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11:323-334, 1969.
 11. ZULIANI, M. E. & TRABULSI, L. R. — Sensibilidade "in vitro" e a 5 antibióticos de 166 amostras de *Shigella*, isoladas em São Paulo. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 10:70-77, 1968.
-
- Recebido para publicação em 3/10/1972.