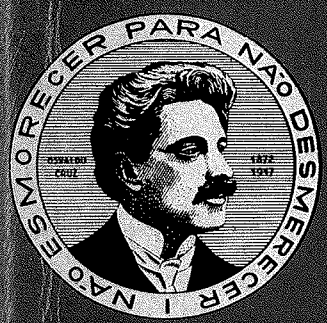
SUPLEMENTO
ESPECIAL
Janeiro 1973

REVISTA DE MICROBIOLOGIA



Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo - Brasil

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A *Revista de Microbiologia* é uma publicação oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia. Publica trabalhos originais e de revisão em todos os campos da Microbiologia e da Protozoologia. Revisões e atualizações serão publicadas a convite do corpo editorial.

Os manuscritos devem ser enviados em duplicata (original e cópia) a L. R. Trabulsi, rua Bennett, 1311, São Paulo, SP, Cód. 05464, ou a Ítalo Suassuna, Instituto de Microbiologia da Universidade Faderal do Rio de Janeiro, Av. Pasteur 250, fundos, Rio de Janeiro, GB, Brasil.

NORMAS GERAIS — Todo manuscrito apresentado à *Revista* deve representar pesquisa original inédita e que não será publicada em outro órgão. Os manuscritos podem ser redigidos em português, inglês ou espanhol. Uma vez aceitos pela *Revista* não poderão ser reproduzidos, mesmo em parte, sem consentimento oficial dos editôres.

O estilo editorial da *Revista* segue essencialmente o *Style Manual for Biological Journals* (2.ª ed., AIBS, 1964). Os símbolos genéticos deverão seguir essencialmente as recomendações de DEMEREC et al. (*Genetics*, 54:61, 1966). Abreviaturas bioquímicas devem seguir essencialmente as regras da IUPAC-IUB (*J. Biol. Chem.* 241:527, 1966). Atividade enzimática deve ser expressa em têrmos de unidades internacionais (*Enzyme Nomenclature*, Elsevier Publishing Co., 1965). Para expressar comprimentos, pêsos e volumes, os prefixos nano (n) e pico (p) devem ser usados em lugar de milimicro (mμ) e micromicro ($\mu\mu$). Comprimentos devem ser expressos em nanômetros (nm; 10^{-9} m) ou em micrômetros (μm; 10^{-6} m), ou ainda, em Angstroms (A; 10^{-10} m). Partes por milhão (ppm), devem ser expressas como microgramos por mililitros (μg/ml), ou microlitros por litro (μ litros/litro). A *Revista* se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

NOMENCLATURA DOS MICRORGANISMOS — A combinação binária, nome do gênero seguido do nome da espécie, é adotada e a nomenclatura apresentada no *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (7.ª ed., 1957) obedecida. Se um Autor divergir dessa nomenclatura, seu próprio julgamento será respeitado, mas a classificação correspondente do Manual de Bergey deve ser mencionada a seguir, entre parênteses, à primeira vez em que o nome figurar no texto e no resumo. Quando um nôvo nome fôr proposto para um microrganismo, será solicitada a opinião de uma autoridade internacional em taxonomia.

FORMA DO MANUSCRITO — Os manuscritos devem ser datilografados em papel branco comum, tipo ofício, em espaço duplo ou triplo, com margens laterais, superior e inferior de, no mínimo, 3 centímetros. Devem, ainda, ser divididos nas seguintes secções: Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos e Referências bibliográficas.

RESUMO — Todo trabalho deve se iniciar com um resumo que não deve exceder a 250 palavras. Além dêstes, os redigidos em inglês devem ser acompanhados de um resumo em português e os redigidos em português e espanhol de um resumo em inglês. Estes resumos devem incluir o título do trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS — No texto, as referências são citadas por número. A secção de Referências Bibliográficas deverá ser apresentada em ordem alfabética, pelo primeiro Autor, e numerada. Os nomes das publicações científicas são abreviados de conformidade com a lista de periódicos resumida pelos *World Medical Periodicals*. Citações de resumos, "dados não publicados", "comunicações pessoais" e "no prelo", não serão aceitas como referências bibliográficas.

TABELAS — Cada tabela deve ser datilografada numa página separada. Os dados devem ser arranjados de maneira a que colunas de material idêntico sejam lidas perpendicular e não transversalmente. Os cabeçalhos devem ser suficientemente claros de maneira a que os dados sejam compreensíveis sem necessidade de consulta ao texto. Notas explanativas de rodapé são permitidas, mas não descrições pormenorizadas dos experimentos. Materiais e métodos utilizados na obtenção dos dados relatados devem ser mencionados exclusivamente na secção correspondente.

ILUSTRAÇÕES — Um conjunto completo de figuras, preferìvelmente como fotografias, deve acompanhar cada uma das duas vias do manuscrito. Os gráficos devem ser desenhos concluídos e que não requeiram qualquer montagem ou re-arranjo. Parte alguma de um gráfico poderá ser datilografada, devendo ser usado um e o mesmo normógrafo (exceto a legenda, que deve constar em página separada). A maioria dos gráficos será reduzida à largura de cêrca de 13 centímetros e *todos* os elementos no desenho devem ser previstos para essa escala de redução. A legenda da figura deve proporcionar informação suficiente para que a figura seja compreensível sem consulta ao texto. Detalhes experimentais não devem ser repetidos nas legendas das figuras.

NOTAS PRÉVIAS — Não devem exceder de 500 palavras e o respectivo resumo, de 25 palavras. Os Autores devem consultar um número da *Revista* para se familiarizarem com a forma e o estilo.

SEPARATAS — Os Autores terão direito a 10 saparatas; devem entrar em entendimento com os Editôres da *Revista* quando desejarem maior número, correndo então as despesas por conta própria.

REVISTA DE MICROBIOLOGIA

AQUISIÇÃO POR NÃO-MEMBROS DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

A Revista de Microbiologia é órgão da Sociedade Brasileira de Microbiologia, sendo publicada trimestralmente. Teve início em julho-setembro de 1970.

PREÇOS

Cada exemplar	Cr$ 10,00
Número atrasado	Cr$ 15,00
Assinatura anual	Cr$ 40,00
Assinatura para o Exterior Marítimo	US$ 10,00
Assinatura para o Exterior Aéreo	US$ 15,00

Ordens de pagamento e requisição de números atrasados deverão ser feitas para:

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
Rua Bennett n.º 1311
Alto de Pinheiros
São Paulo — Brasil
Cód. 05464

REVISTA DE MICROBIOLOGIA

SUBSCRIPTION BY NON-MEMBERS OF THE SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

The Revista de Microbiologia is a quarterly publication, sponsered by the Sociedade Brasileira de Microbiologia. Its first number was published on July-September, 1970.

PRICES

Single copies	US$ 2,00
Back copies	US$ 3,00
Foreign countries subscription (Second class postage)	US$ 10,00
Foreign countries subscription (Air mail)	US$ 15,00

Orders and enquiries about back volumes should be sent to:

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
Rua Bennett n.º 1311
Alto de Pinheiros
São Paulo — Brasil
Cód. 05464

ASPECTOS MÉDICOS

DA

RESISTÊNCIA BACTERIANA A DROGAS

Prof. Dr. Luiz Rachid Trabulsi

* Professor titular de Microbiologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina.

INTRODUÇÃO 1

ORIGEM DA RESISTÊNCIA 3

RESISTÊNCIA EXTRA-CROMOSSÔMICA 6

ENTEROBACTÉRIAS E OUTROS GRAM-NEGATIVOS. FATORES R 6

Mecanismos de Transferência 7

Mecanismos Químicos 11

Importância dos Fatores R em Nosso Meio 14

Fatores R Não Transferíveis 15

Origem dos Fatores R 16

GÊNERO STAPHYLOCOCUS 16

RESISTÊNCIA CROMOSSÔMICA 17

PAPEL DO ANTIBIÓTICO 21

O Antibiótico Como Agente Seletor 21

O Antibiótico Como Agente Indutor 24

O PROBLEMA CLÍNICO 25

Alguns Aspectos da Resistência nas Principais Bactérias Patogênicas 25

Associação de Drogas 25

Manutenção de Concentrações Elevadas 25

Conceito de Germe Resistente 26

COMBATE A RESISTÊNCIA 27

PERSISTÊNCIA 28

RESUMO 29

SUMMARY 29

Rev. Microbiol.
Suplemento especial, Janeiro, 1973

INTRODUÇÃO

Os antibióticos e os quimioterápicos representam uma das principais aquisições da ciência para o bem estar do homem. Entretanto, quem se detém um pouco na história da terapêutica por estas drogas, logo verifica que muitas delas já não curam mais como costumavam curar certas infecções. Os exemplos são múltiplos e bem conhecidos de todos.

A razão fundamental desta modificação ao longo dos anos, foi o aumento progressivo do número de infecções por bactérias resistentes, não só a uma mas também a várias drogas ao mesmo tempo. Embora surpresas formidáveis possam surgir, sente-se atualmente que as perspectivas da antibioticoterapia vão se tornando algo sombrias. Diminuem acentuadamente as possibilidades de descoberta de novos microrganismos produtores de antibióticos que possam ser usados em terapêutica e o número de bactérias resistentes continua aumentando sem cessar. Deste modo, deve ser meta de todas as classes profissionais que operam com antibióticos, em particular a médica, bem como dos poderes públicos, procurar prolongar a vida útil dos antibióticos já em uso.

A presente atualização que se destina principalmente à classe médica em geral, tem por objetivos principais rever os mecanismos genéticos e químicos da resistência adquirida pelas bactérias aos antibióticos e quimioterápicos, apresentar, embora de modo parcial, a importância do problema em nosso meio, discutir as suas implicações clínicas e recomendar algumas medidas que nos parecem úteis à sua profilaxia. Várias razões, como pedidos de colegas, e o interesse despertado em numerosas conferências já realizadas, bem como a certeza das dificuldades que qualquer médico assoberbado com a sua atividade profissional encontraria para se familiarizar com um assunto eminentemente bacteriológico, estimularam-nos a tomar a decisão de prepará-la. Anima-nos também a convicção de que um problema somente pode ser resolvido ou combatido se o compreendermos adequadamente e tivermos consciência de suas implicações indesejáveis.

ORIGEM DA RESISTÊNCIA

Algumas espécies ou grupos de bactérias são naturalmente resistentes a certos antibióticos, como por exemplo os gram-negativos à benzil-penicilina, os gram-positivos às polimixinas, as pseudomonas às cefalosporinas, o bacilo da tuberculose ao cloranfenicol e assim por diante. Em geral, esta forma de resistência não tem sido motivo de preocupação e consequentemente pouco investigada. Ao que parece ela depende, na maioria das vezes, de uma impermeabilidade das superfícies externas da célula bacteriana às drogas em questão. Ao contrário desta forma de resistência que poderia ser chamada natural ou intrínseca, vem sendo motivo de preocupação a resistência adquirida, pois é ela que vem limitando a utilidade dos antibióticos. Conforme se pode depreender, há uma diferença fundamental entre uma e outra. Enquanto na primeira a bactéria é originalmente resistente, na segunda a resistência é uma propriedade adquirida pela bactéria originalmente sensível.

Inicialmente pensava-se que a resistência adquirida era consequência direta do contato da bactéria com o antibiótico, esta ordem de pensamento e alguns trabalhos experimentais levando à chamada teoria da adaptação (fig. 1). Entretanto, logo surgiram nu-

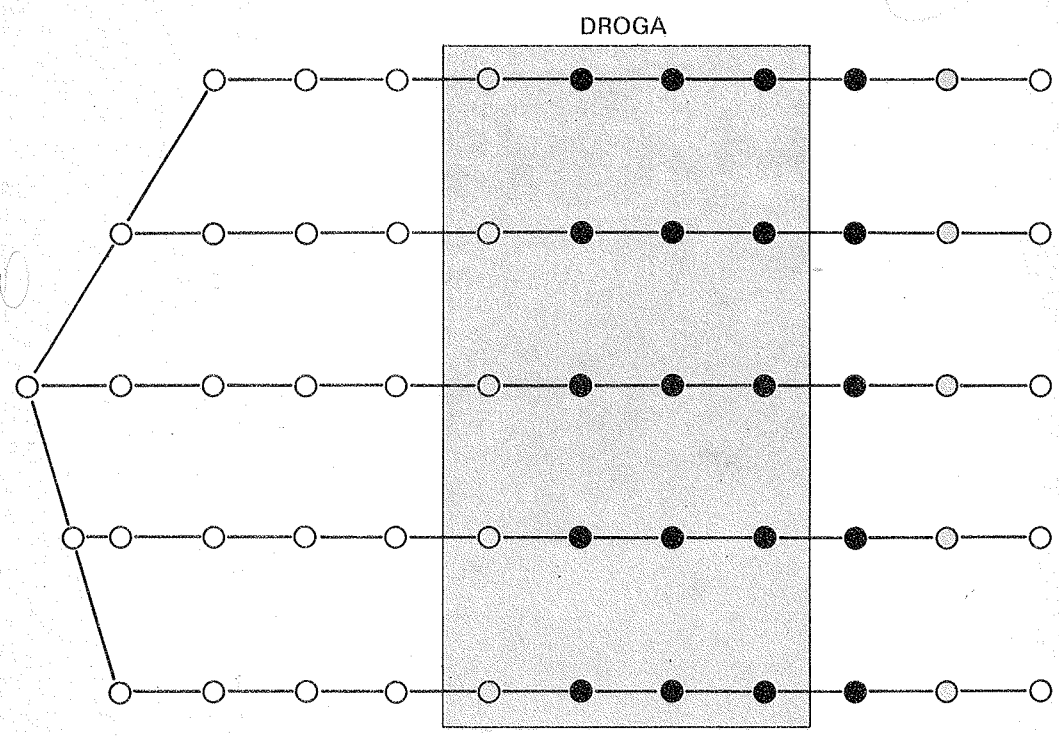


Fig. 1 — Teoria da adaptação: as células bacterianas se tornam resistentes após contato com a droga. Desfeito este, ocorre volta progressiva ao estado de sensibilidade. O = células sensíveis. ●,●, = células com diferentes graus de resistência.

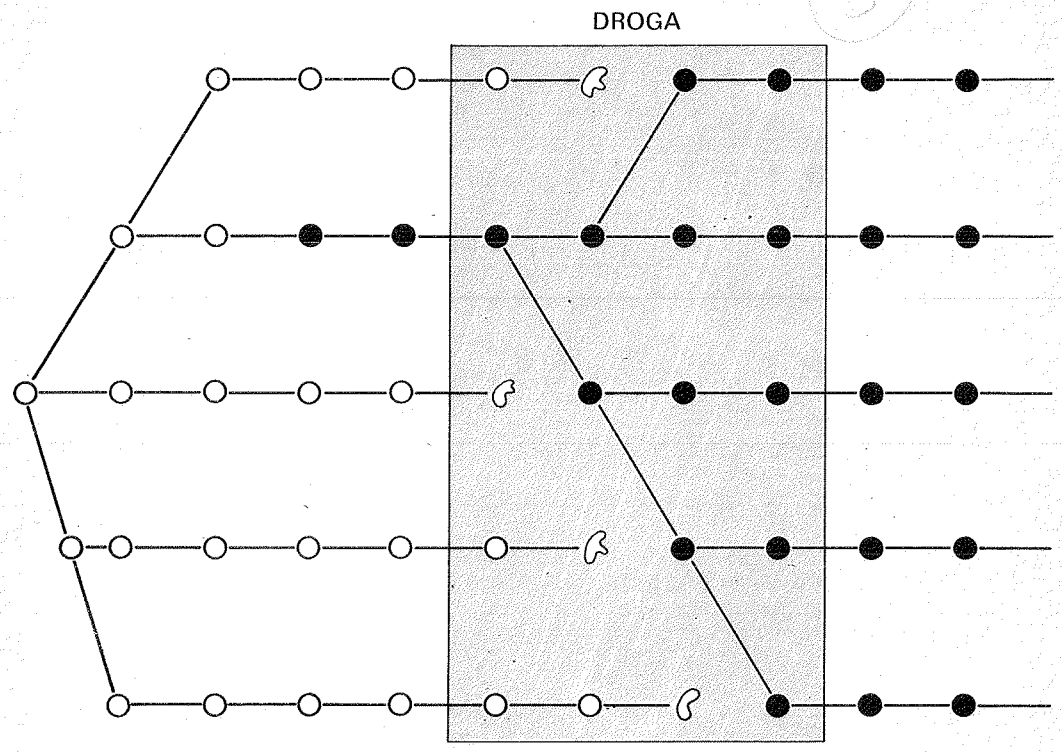


Fig. 2 — Teoria da mutação-seleção: a célula bacteriana adquire resistência por mutação. A droga interrompe a proliferação das sensíveis, selecionando as resistentes. Estas ocupam o lugar deixado pelas primeiras. O = célula sensível. ● = células mutantes resistentes.

merosas evidências que apoiavam uma outra teoria, a teoria da mutação-seleção, segundo a qual a aquisição de resistência era decorrência de mutações cromossômicas que ocorriam espontaneamente, independente da presença do antibiótico. A presença deste tinha o único papel de selecionar as mutantes que adquiriram resistência (fig. 2). Aproximadamente 10 anos depois da comprovação definitiva desta teoria, investigadores japoneses fizeram a notável descoberta de que a resistência a drogas podia decorrer da presença dentro da célula de um elemento extra-cromossômico, transportanto gens de resistência e com a faculdade de se transmitir de uma bactéria para outra (fig. 3). Atualmente, a situação geral da origem da resistência pode ser resumida da seguinte maneira: a resistência bacteriana adquirida à droga é decorrência primária de uma alteração do genoma da célula, de natureza cromossômica ou extra-cromossômica. Estas alterações conferem à célula propriedades bioquímicas que a tornam capaz de destruir ou de tolerar a droga. Quanto ao papel dos antibióticos no fenômeno geral da resistência adquirida, sabemos ser duplo: o mais importante é o de destruir as bactérias sensíveis, selecionando as resistentes que ocupam o vazio deixado pelas primeiras. O outro, refere-se ao seu contato com as bactérias já resistentes. Em alguns casos a sua presença estimula o aumento da resistência, o que provavelmente conduziu alguns bacteriologistas a criarem a teoria da adaptação.

Para completar esta parte, chamamos a atenção do leitor para a sinonimia atualmente empregada. A resistência por mutação é também chamada resistência cromossômica; a resistência descoberta pelos autores japo-

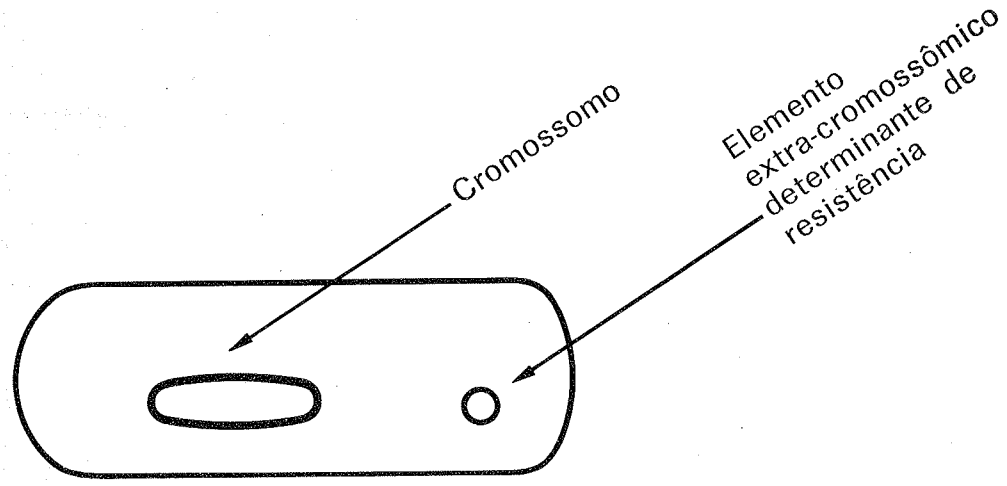


Fig. 3 — Representação esquemática de uma célula bacteriana, mostrando o cromossomo e ao lado deste, o elemento responsável por resistência.

neses tem sido denominada resistência infecciosa a drogas, resistência transferível e resistência por fatores R, nas enterobactérias. Tanto nas enterobactérias como nos estafilococos é denominada resistência extra-cromossômica. Finalmente, em vez de adaptação, usa-se preferivelmente o termo indução. Na *Tabela I*, representamos sumariamente os mecanismos da resistência adquirida a drogas e o papel desempenhado por estas.

Sendo a resistência extra-cromossômica mais importante que a cromossômica, não só pela frequência como também devido a outras implicações, e também mais investigada, trataremos dela primeiramente e depois da cromossômica.

TABELA I

Mecanismos da resistência adquirida e o papel desempenhado pelas drogas

Tipos de resistência	Natureza genética	Papel das drogas
Cromossômica	Mutações	Seleção
Extra-cromossômica	Fatores de resistência	Seleção Indução

RESISTÊNCIA EXTRA-CROMOSSÔMICA

Embora a abordagem se torne artificial em vários aspectos, para fins de clareza, estudaremos a resistência extra-cromossômica nas enterobactérias e outros gram-negativos separadamente da mesma forma de resistência no gênero *Staphylococcus*.

ENTEROBACTÉRIAS E OUTROS GRAM-NEGATIVOS. FATORES R

A resistência extra-cromossômica em enterobactérias e outros gram-negativos deve-se à presença dentro da célula ou células de um elemento genético semelhante ao cromossomo da célula e correspondendo, mais ou menos a 1% do tamanho do cromossomo. Como este, é também circular e formado de DNA bicatenário. Estes elementos são frequentemente chamados de fatores R, o R simbolizando resistência. Sob o ponto de vista físico-funcional, podemos aceitar um fator R como uma associação de um fator sexual com gens ou determinantes de resistência (*fig. 4*). Graças a esta associação, o gram-negativo que alberga um fator R não só é resistente a uma ou várias drogas, mas também capaz de doá-lo por conjugação para uma outra bactéria, sem entretanto perdê-lo, o que implica em um processo especial de divisão. Uma outra característica muito importante dos fatores R é a sua autonomia, isto é, eles possuem equipamento que garante a sua estabilidade e replicação autônoma dentro da célula. Graças a isto, todas as células provenientes de uma portadora de um fator R, recebem e mantem uma cópia deste elemento genético. Assim podemos dizer que os fatores R se propagam bi-direcionalmente, isto é, da célula mãe para as células filhas e de uma bactéria para outra.

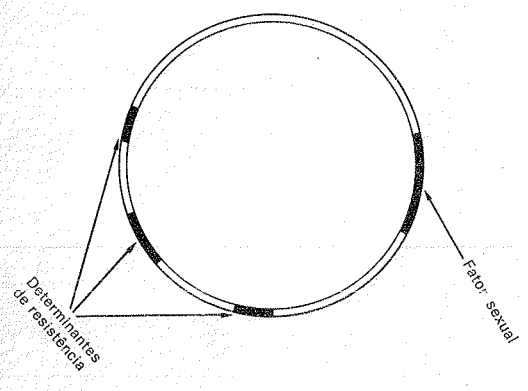


Fig. 4 O fator R é composto de um fator sexual ou fator de transferência e determinantes ou gens de resistência. Não se conhece ainda a função de todos os gens dos fatores R.

Analisemos as características mais importantes de cada parte dos fatores R.

Fator sexual — esta parte do fator R é responsável pela sua transferência e a transferência dos gens de resistência a ela associados, de uma bactéria para outra, por conjugação. Provavelmente é responsável também pela replicação e manutenção dos fatores R. Sabemos atualmente que os fatores R podem transportar diferentes tipos de fatores sexuais, mas qualquer que seja o tipo, todos codificam a síntese de uma estrutura protéica, denominada fímbria sexual, que se destaca da superfície da célula e cujas funções ainda não foram bem estabelecidas. Presume-se porém, que as fímbrias sexuais sejam os órgãos de contato entre duas células, passando através delas os fatores R. As fímbrias sexuais não devem ser confundidas com outras modalidades de fímbrias ou com os flagelos, presentes em muitas bactérias (*fig. 5*).

Determinantes de resistência — os determinantes de resistência constituem a outra parte dos fatores R, sendo os elementos responsáveis pela resistência que a bactéria apresenta. Têm sido encontrados nos fatores R, determinantes de resistência para os sulfamídicos (Su), estreptomicina (E), tetraciclina (T), cloranfenicol (C), kanamicina (K), gentamicina, ampicilina, cefalosporinas, trimetoprim, sais de mercúrio, níquel e cobalto, certos fagos e radiação ultravioleta. Até o momento não se encontraram ou não foram descritos determinantes de resistência para eritromicinas, ácido nalidíxico, polimixinas e nitrofurantoinas. Um determinado fator R pode transportar um ou mais determinantes de resistência, mas não foi encontrado até ago-

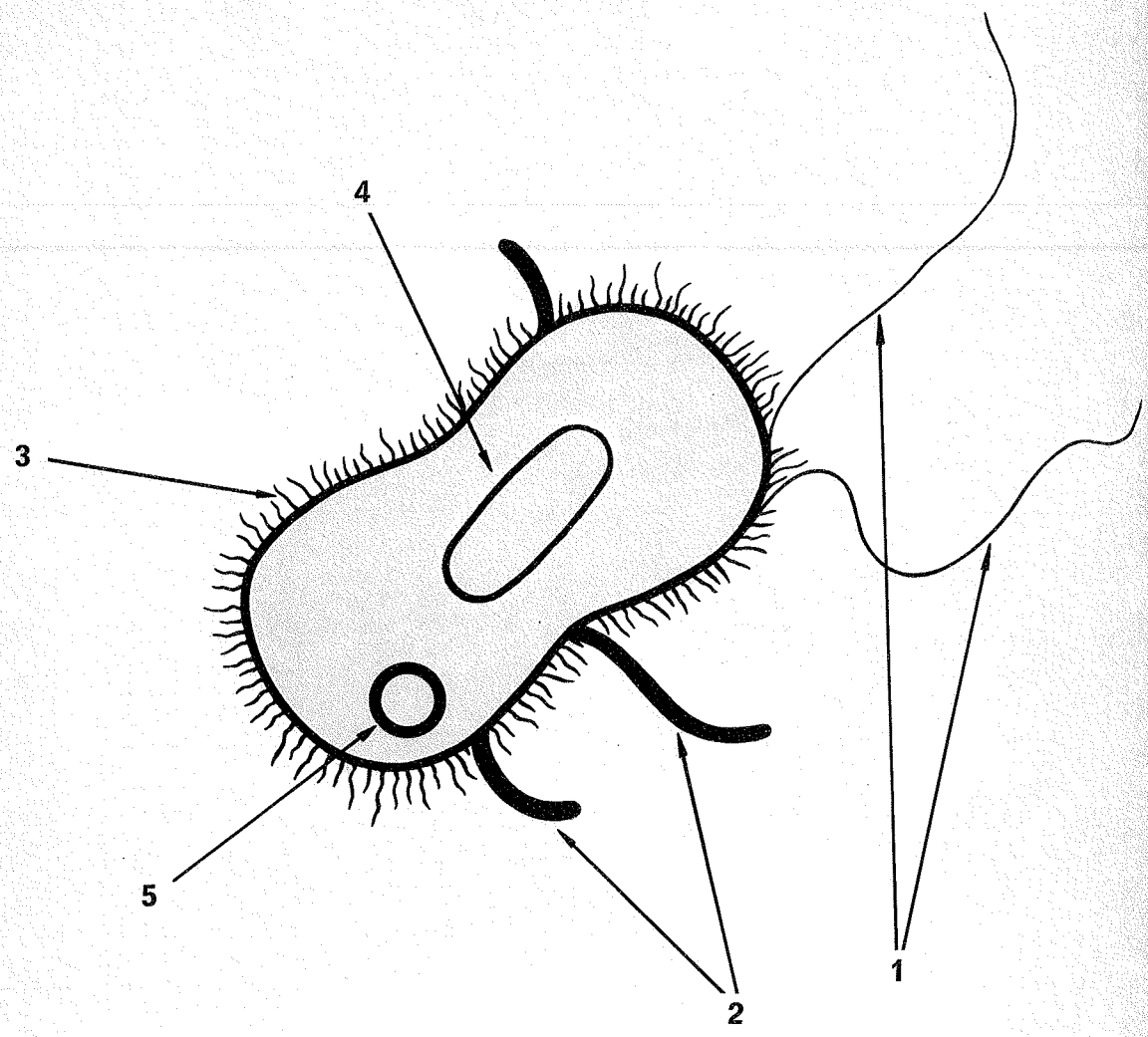


Fig. 5 — Fímbrias e flagelos das bactérias: 1 — flagelos; 2 — fímbrias sexuais; 3 — fímbrias comuns; 4 — cromossomo; 5 — fator sexual.

ra um fator R que transportasse ao mesmo tempo todos os determinantes conhecidos. Em nosso meio, o fator R que temos isolado mais frequentemente, confere resistência à sulfadiazina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol e à kana-neomicina.

Mecanismo da transferência — os fatores R podem ser transferidos tanto no laboratório como no organismo animal. No laboratório, é necessário apenas que se misture uma cultura da bactéria portadora do fator R com uma bactéria receptora e depois de algum tempo se semeie a mistura em placas contendo meios de cultura adequados. Facilita-se a seleção das células que receberam o fator R, colocando-se nos meios de cultura a droga ou drogas contra as quais a bactéria doadora é resistente (estas drogas impedem o crescimento das células da cultura receptora que não receberam o fator R) e usando-se meios onde a cultura doadora não prolifere (*fig. 6*). No animal o processo é semelhante, as culturas doadoras e receptoras são administradas ao animal por via oral, e as receptoras são selecionadas como descrito. A transferência dos fatores R "in vivo" já foi demonstrada em várias espécies de animais, inclusive no homem. A transferência ocorre mesmo entre bactérias pertencentes a diferentes espécies ou gêneros.

Não se conhecem com precisão os detalhes do processo de transferência. Vários trabalhos experimentais sugerem, entretanto, que se estabeleça contato entre a cultura doadora e a receptora através da fímbria sexual, a molécula bicatenária do fator R se divide,

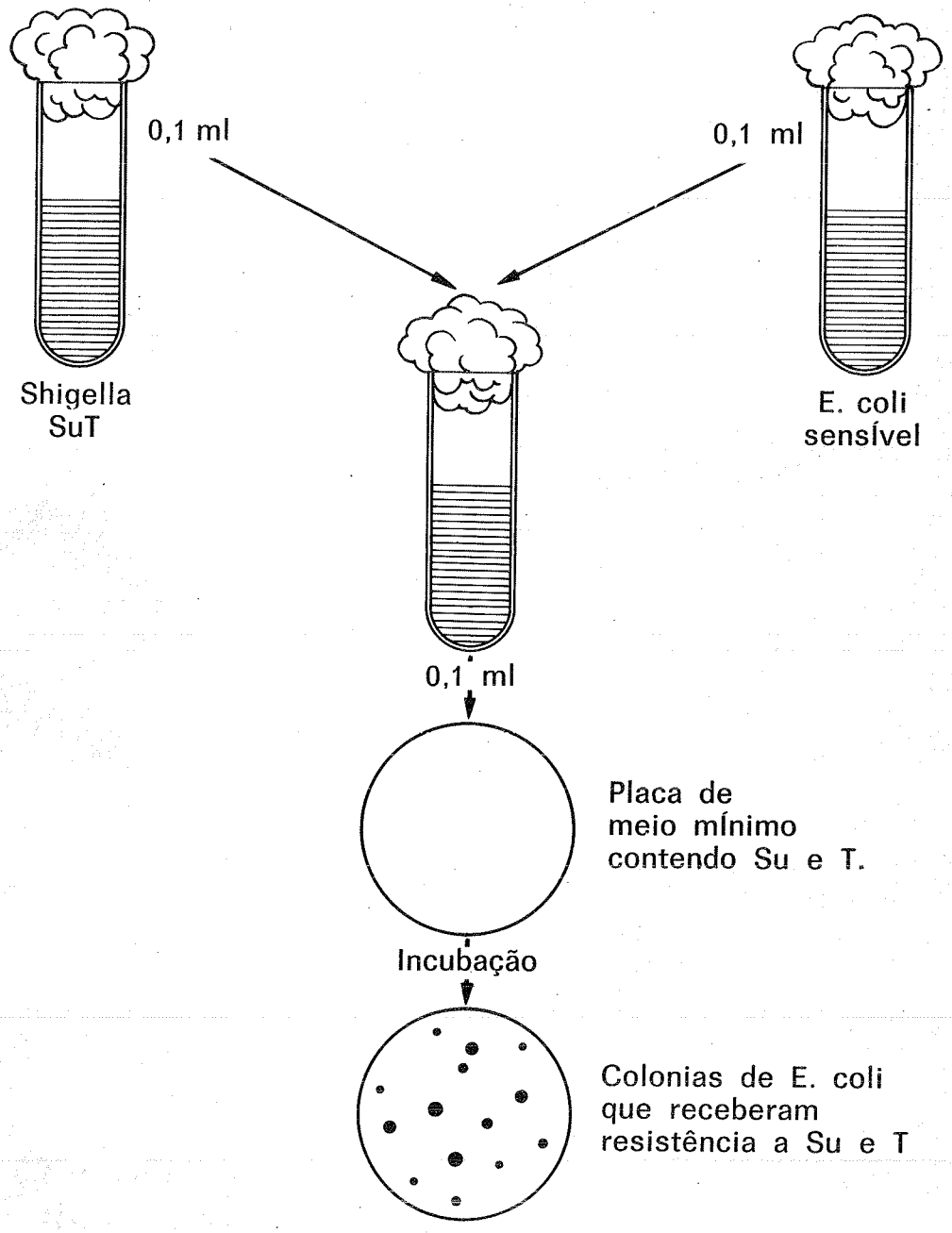


Fig. 6 — Transferência de fatores R no laboratório: a cultura doadora (*Shigella* SuT) e a receptora sensível (*E. coli*) foram cultivadas separadamente e misturadas em um novo caldo. Depois de algum tempo a mistura foi semeada em meio mínimo contendo Su e T e este incubado. Como a *Shigella* não cresce no meio mínimo e as drogas impedem o crescimento das células da *E. coli* que não receberam resistência, a presença de colonias na placa de meio mínimo indica que houve transferência de resistência.
Su = sulfadiazina; T = tetraciclina

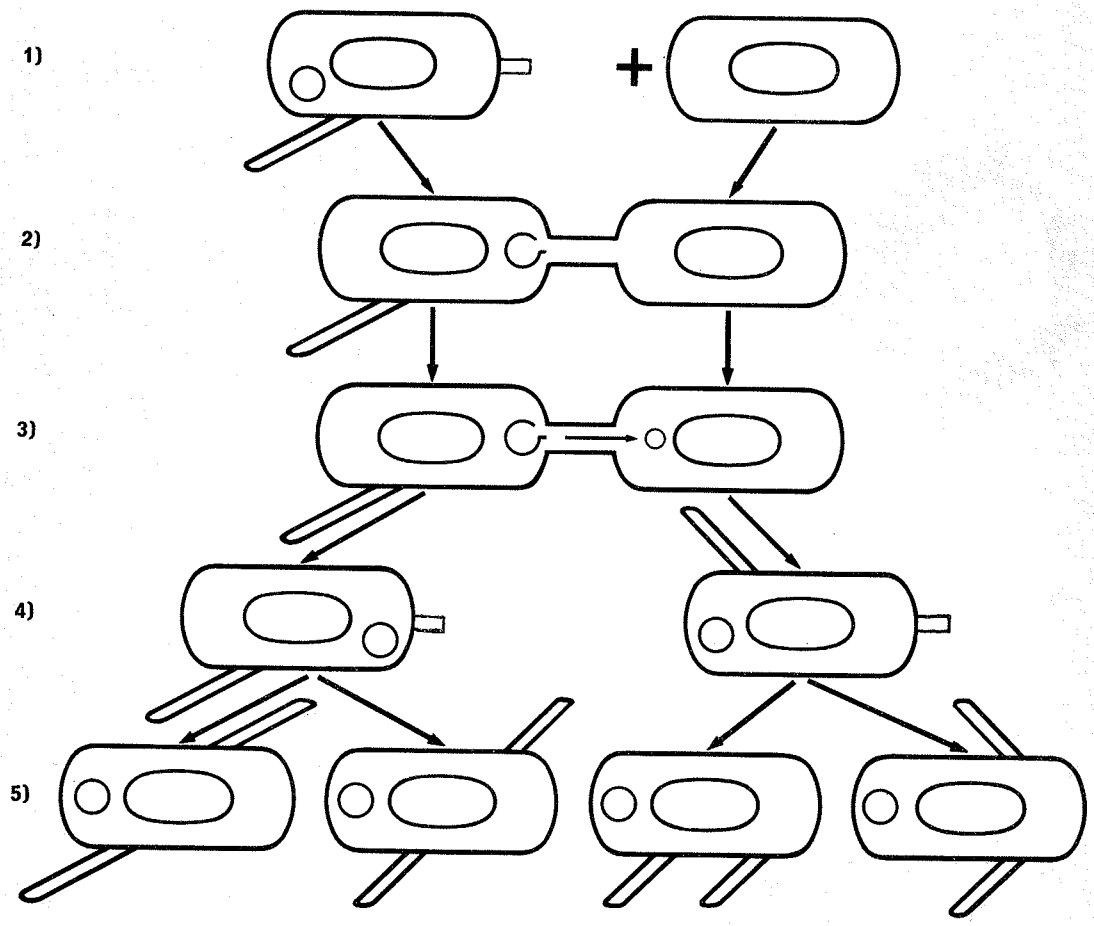


Fig. 7 — Transferência do fator R por conjugação: a bactéria R positiva em presença da sensível (1) une-se a ela por meio da fimbria sexual, o fator R se abre (2), e uma de suas moléculas passa para a célula sensível através da fimbria (3). Posteriormente forma-se em cada célula, doadora e receptora, uma nova molécula idêntica, tornando-se completo o fator R (4). Completado o processo, as amostras R positivas continuam sua divisão normalmente, cada célula que se forma contendo um fator R.

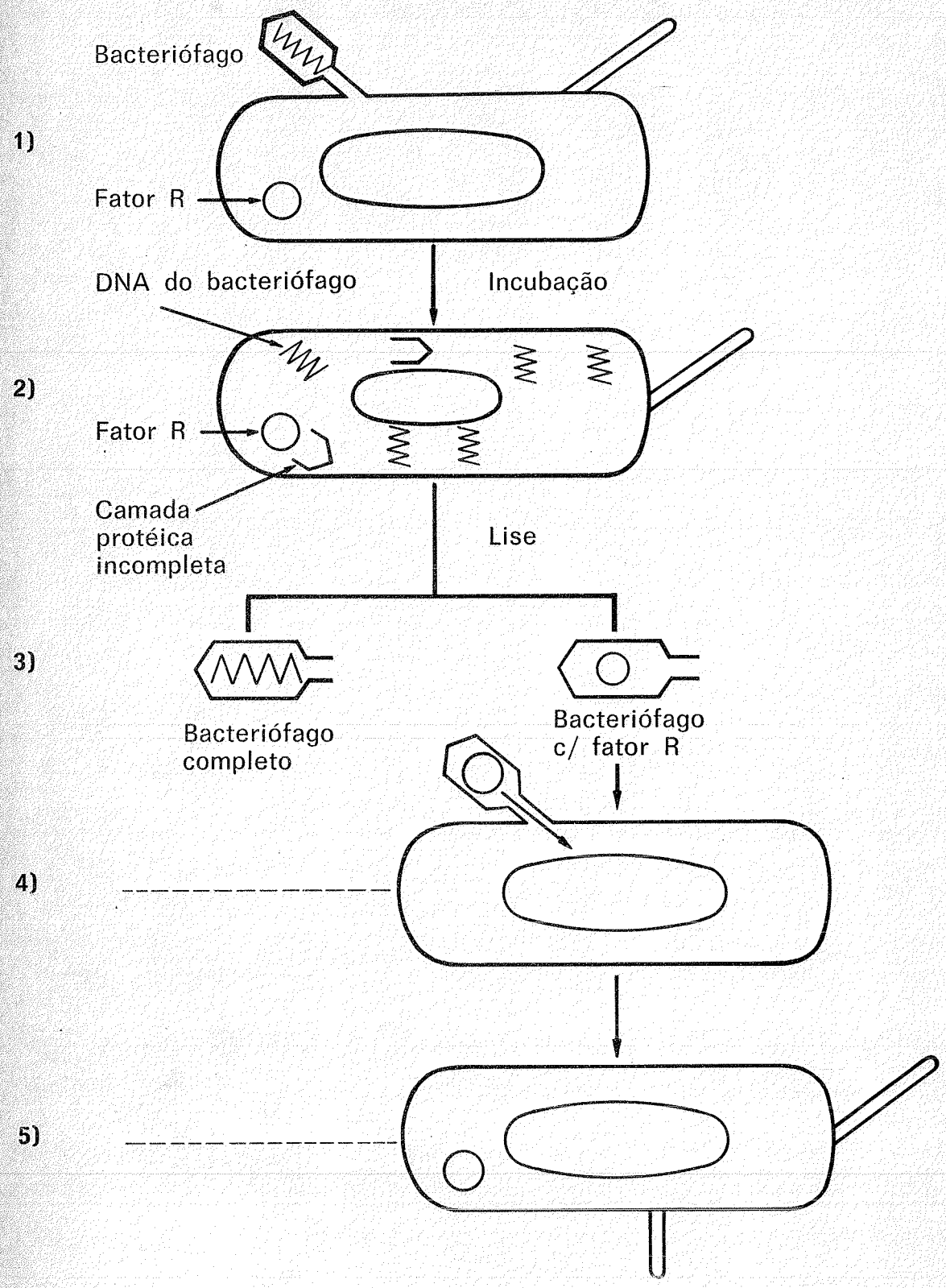


Fig. 8 — Transferência de fator R por transdução: o bacteriófago adsorve-se na bactéria e injeta o seu ácido nucleico (1). O ácido nucleico injetado sofre vários ciclos de replicação e se formam as camadas de proteínas. Muitas incorporam o ácido nucleico do fago e uma ou outra o fator R (2). A bactéria sofre lise, liberando fagos completos e transportando o fator R (3). O fago que transporta o fator R, injeta-o numa bactéria sensível (4), tornando-a resistente (5) e capaz de doá-lo a outra bactéria. A representação é puramente esquemática e nem sempre o fago transporta um fator R completo.

passando uma cadeia para a célula receptora e a outra permanecendo na célula doadora. Em seguida, cada cadeia é complementada por uma outra idêntica, tanto na célula doadora como na receptora e, deste modo, no final do processo, tanto a doadora como a receptora terão em seu citoplasma um fator R completo, isto é, uma molécula bicatenária. Conforme já mencionamos, presume-se que a transferência se faz através da fímbria sexual. Entretanto, há a possibilidade de que a transferência ocorra por meio de pertuitos na parede das duas células, a fímbria funcionando apenas como um órgão de conexão e aproximação. Podemos afirmar, porém, que bactérias portadoras de fatores R, cujas fímbrias são eliminadas mecanicamente, não são capazes de transferir estes elementos genéticos. A *fig. 7* é uma esquematização do processo de transferência, admitindo-se que o fator R passe através da fímbria sexual. Conforme já mencionado, os fatores R não só se transmitem de uma bactéria resistente para uma sensível, mas também se propagam nas progenies que se originam da célula portadora.

Além da transmissão por conjugação, os fatores R podem ser também transmitidos entre diferentes espécies de bactérias, por meio de bacteriófagos, por um processo chamado de transdução (*fig. 8*). Os bacteriófagos são virus capazes de infectar e destruir bactérias. Todos apresentam um cerne constituído de ácido nucleico, envolto por uma camada de proteína. A capacidade do bacteriófago em se fixar na superfície da bactéria é dada pela sua camada de proteína. Uma vez fixado na superfície da bactéria, o bacteriófago injeta o seu ácido nucleico no citoplasma da célula, tendo início então a síntese das partes que formarão o novo virus, isto é, ácido nucleico e camada proteica.

Durante o processo de incorporação do ácido nucleico, pela camada proteica, pode ocorrer um erro de reconhecimento, uma das camadas proteicas incorporando o fator R em vez do seu próprio ácido nucleico. Este virus defeituoso é depois liberado da célula, estando então em condições de se fixar numa outra bactéria, introduzindo nesta, o fator R. A bactéria que recebe o fator R passa portanto a ser resistente. A transdução dos fatores R tem sido demonstrada só experimentalmente, mas não há razões para se supor que não ocorra em condições naturais. A sua importância porém, na disseminação dos fatores R ainda não pode ser avaliada. Acredita-se que a conjugação seja o mecanismo mais operante em condições naturais. Entretanto, veremos em seguida que a transdução é um importante mecanismo de transmissão de elementos semelhantes aos fatores R em bactérias que não possuem sexo.

Mecanismos químicos da resistência determinada pelos fatores R — Vimos anteriormente as drogas contra as quais os fatores R determinam resistência. Obviamente, a resistência a estas drogas é consequência da aquisição pela célula de novas propriedades codificadas pelos determinantes de resistência dos fatores R. Do mesmo modo que os fatores sexuais determinam características sexuais, os determinantes de resistência determinam resistência a drogas e a outras substâncias.

Resistência à sulfadiazina — Embora a resistência mediada pelos fatores R à sulfadiazina tenha sido uma das primeiras descritas, é a que tem mecanismo bioquímico menos compreendido, talvez por falta de investigação. Os poucos trabalhos realizados sugerem que os determinantes de resistência tornem a célula impermeável. Deve ser salientado, porém, que as observações que levaram a esta conclusão, são limitadas a um único fator R e ainda não foram confirmadas. Por outro lado, certas possibilidades, como inativação ou alterações das enzimas responsáveis pela síntese de folato, não foram rigorosamente excluídas. Aparentemente a resistência à sulfadiazina é comum aos demais sulfamídicos.

Resistência à estreptomicina, kanamicina, neomicina e gentamicinas — A resistência determinada pelos fatores R aos aminoglucosídeos decorre da produção de en-

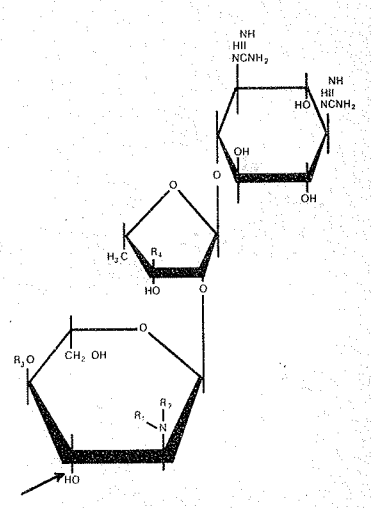


Fig. 9 — Estrutura da estreptomicina. A hidroxila 3 da l-glucosamina (seta) é modificada por adenilação ou fosforilação enzimática.

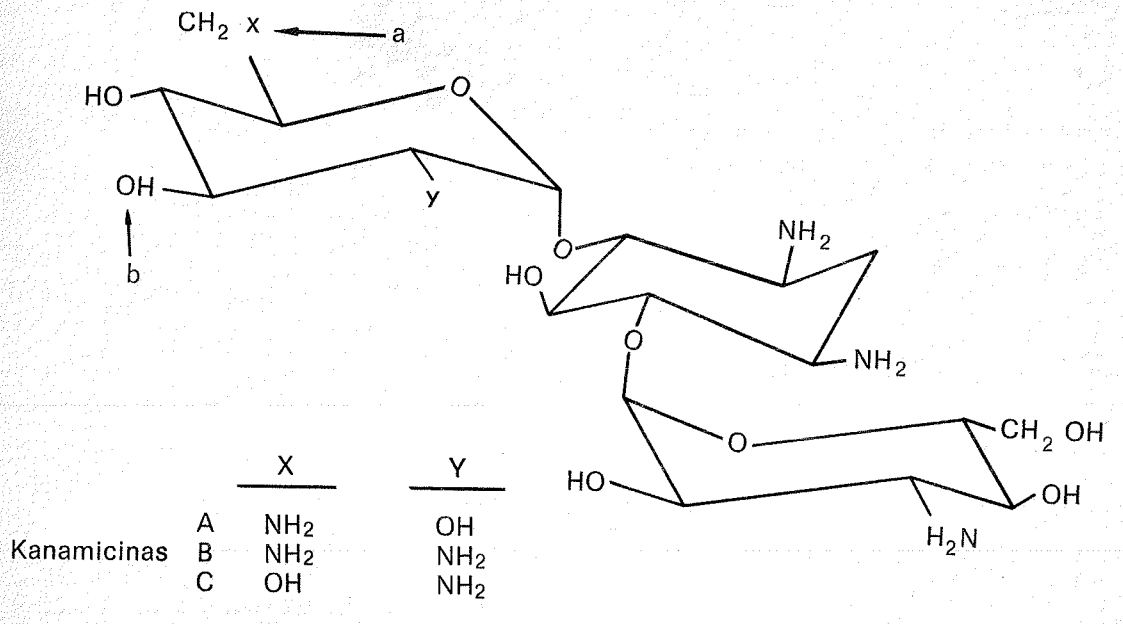
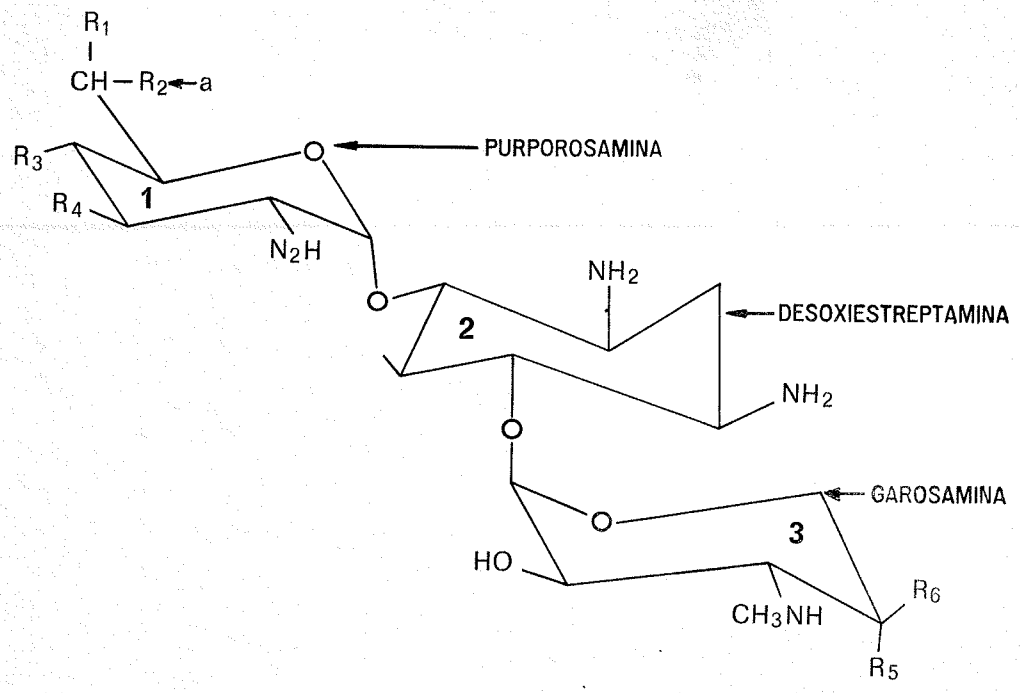


Fig. 10 — Estrutura das kanamicinas. A seta *a* indica o grupo aminico das kanamicinas A e B que são acetilados e a seta *b* o grupo hidroxila que é fosforilado.

zimas que os modificam, tornando-os inativos, na maioria das vezes. A estreptomicina pode ser inativada por duas enzimas, que transferem respectivamente o fosfato terminal ou o resíduo de monofosfato da adenosina do ATP para a hidroxila 3 da l-glucosamina da estreptomicina (*fig. 9*). Os compostos de fosfato que se formam são completamente inativos e aparentemente não se fixam no sítio de ação da droga ao nível do ribossomo celular. A resistência à estreptomicina é comum a di-hidroestreptomicina e todos os fatores R examinados até agora, codificam uma ou outra enzima. Do mesmo modo que a resistência à estreptomicina, a resistência à kanamicina é também determinada por 2 enzimas, uma que acetila o grupo amínico 6 da D-glucosamina e outra que fosforila a hidroxila 3 do mesmo anel (*fig. 10*). Os fatores R codificam uma ou outra enzima, sendo mais comum os que governam a formação da fosfotransferase, que também inativa a neomicina. Por esta razão, quase sempre uma bactéria resistente à kanamicina o é também à neomicina. A resistência por fatores R à gentamicina é uma descoberta recente, decorrendo também de sua inativação. Os fatores R até agora descritos nas enterobactérias governam a formação de uma enzima que adenila não só a gentamicina, mas também a tobramicina e a kanamicina (*fig. 11*). Em *Pseudomonas aeruginosa*, a enzima formada pelo fator R, inativa a gentamicina por acetilação. Esta enzima apresenta pouca afinidade para os demais aminoglucosídeos.

Resistência à tetraciclina — A resistência a este antibiótico parece ser devida a uma alteração da permeabilidade da célula. Estudos realizados com tetraciclina radioativa demonstram que a bactéria sensível (sem fator R) acumula ativamente a droga, não acontecendo o mesmo com as portadoras de fatores R. Recentemente foi descoberto que a resistência à tetraciclina nestas bactérias é induzivel (ver mais adiante), este fato sugerindo que o fator R governa a síntese de um inibidor induzivel da entrada da droga na célula. A resistência à tetraciclina é comum dos antibióticos da mesma família.

Resistência ao cloranfenicol — O mecanismo da resistência a este antibiótico foi elucidado pela demonstração de que um extrato de uma bactéria portadora de um fator R era capaz de transformá-lo em um produto inativo, em presença da acetil-coenzima A. Posteriormente, demonstrou-se que a enzima responsável era uma acetil-transferase que acetilando o cloranfenicol (*fig. 12*) transforma-o em uma mistura de 3 acetoxicloranfenicol e 1,3 diacetoxicloranfenicol, produtos completamente inativos como antibióticos. Muitos análogos do cloranfenicol têm sido investigados, mas somente alguns são



		R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
Gentamicinas	A	H	OH	OH	OH	H	OH
	C_{1a}	H	NH_2	H	H	OH	CH_3
	C_2	CH_3	NH_2	H	H	OH	CH_3
	C_1	CH_3	$NHCH_3$	H	H	OH	CH_3

Fig. 11 — Estrutura das gentamicinas. Embora o sítio de inativação das gentamicinas C por adenilação ainda não seja conhecido, a ausência de hidroxilas na purpórosamina sugere que a adenilação ocorra na desoxiestreptamina ou garosamina. A seta A indica o grupo amínico das gentamicinas C_{1a} e C_2 que é acetilado enzimaticamente.

inativados pela acetil-transferase. Portanto entre estes, há resistência cruzada.

Resistência às penicilinas e cefalosporinas — Embora as relações entre beta-lactamases (penicilinases e cefalosporinases) e resistência a estas drogas nas enterobactérias portadoras de fatores R ainda não estejam bem esclarecidas, parece não haver dúvidas quanto ao importante papel destas enzimas. Todas atuam abrindo o anel-betalactamico das penicilinas e cefalosporinas (*fig. 13*) e transformando-as em produtos inati-

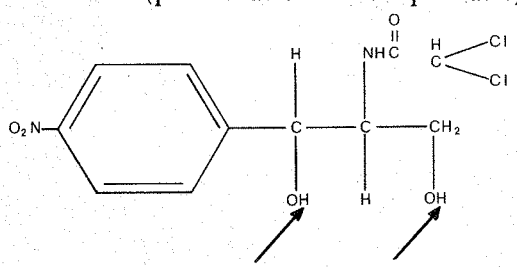


Fig. 12 — Estrutura do cloranfenicol. As setas indicam as hidroxilas que são acetiladas pela acetil-transferase.

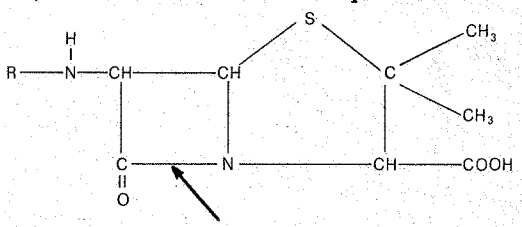


Fig. 13 — Estrutura da penicilina. A seta indica o local de hidrolise do anel beta-lactâmico pelas beta-lactamases.

TABELA II

Frequência da resistência transferível em amostras de *Shigella* isoladas em São Paulo entre 1963 e 1968.

Modelo de resistência	N.° amostras	Presença de resistência transferível	
		N.°	%
Su E T C K	37	37	100.0
Su E T C	19	17	88.5
Su E T K	6	6	100.0
Su T C K	1	1	100.0
Su E T	15	13	84.0
Su E	62	13	20.9
Su T	9	8	88.8
Su K	1	0	0.0
Su	58	7	12.0
E	1	0	0.0
Total	209	102	48.8

Su = sulfadiazina; E = estreptomicina; T = tetraciclina; C = cloranfenicol; K = kanamicina.

vos. São conhecidos vários tipos de betalactamases quanto a uma série de propriedades, inclusive espectro de ação. Aparentemente a mais comum das betalactamases é capaz de hidrolisar tanto as penicilinas como as cefalosporinas. Outras menos frequentes, são mais ativas contra as penicilinas ou as cefalosporinas. Embora seja comum a resistência cruzada, entre as cefalosporinas, devemos notar que algumas delas são mais resistentes que outras à ação das cefalosporinases.

O mecanismo da resistência conferida pelos fatores R a outras substâncias, vírus e radiações não é bem conhecido.

Importância dos fatores R na resistência à drogas em nosso meio — A importância dos fatores R na resistência à drogas de *Shigella* verificada inicialmente no Japão, foi em seguida confirmada para outros gram-negativos, principalmente *Salmonella* e *E. coli*, na Inglaterra, Alemanha, vários países da Europa Oriental, Estados Unidos e outros. Atualmente, a vasta literatura existente indica que estes elementos genéticos tem importância universal. No Brasil, algumas observações preliminares em 1964 sobre a presença de fatores R em culturas de *Shigella*, *Salmonella* e *E. coli* enteropatogênica, realizadas por Maria Regina Fernandes de Toledo e nós, deixaram-nos com a impressão de que os fatores R eram causa frequente de resistência à sulfadiazina e a vários antibióticos. Por esta razão, resolvemos ampliar os nossos estudos. Juntamente com Maria Regina Fernandes de Toledo e Maria Elisa Zuliani, pesquisamos fatores R inicialmente em 209 amostras de Shigella, isoladas entre 1962 e 1968.

Estas amostras eram resistentes a uma ou mais das seguintes drogas: sulfadiazina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol e kanamicina. Foram encontrados fatores R em 102 amostras (48,8%) das 209 examinadas. Entretanto, estes resultados adquirem outro significado se considerarmos a frequência de fatores em cada tipo de amostra investigada (*Tabela II*). Com exceção das amostras resistentes somente a sulfadiazina ou a sulfadiazina e estreptomicina e umas poucas outras, foram encontrados fatores R em 84 a 100% das demais. Considerando que as observações existentes na literatura sobre a frequência de fatores R nas enterobactérias eram fragmentadas, pois incluiam apenas alguns gêneros da família, notadamente os enteropatogênicos, resolvemos mais recentemente, juntamente com Diógenes Santiago Santos, pesquisar fatores R em amostras de todos os grupos ou gêneros, pois várias razões sugeriam que os resultados conhecidos não poderiam ser extendidos a todas as enterobactérias, sem uma comprovação prévia. Por outro lado, era necessário se conhecer a participação dos fatores R na resistência destes germes aos diferentes tipos de agentes terapêuticos. Com a finalidade de alcançar estes objetivos, incluimos no estudo 314 amostras de todos os gêneros da família *Enterobacteriaceae*, selecionadas de aproximadamente 1.500 amostras, cujos níveis de resistência

TABELA III

Frequência de resistência transferível a várias drogas em 243 amostras de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, excluindo-se os grupos *Proteus e Providencia*.

DROGAS	N.º DE AMOSTRAS	TRANSFERÊNCIA POSITIVA	%
SULFADIAZINA	210	142	66.7
ESTREPTOMICINA	128	85	66.4
TETRACICLINA	130	87	66.9
CLORANFENICOL	130	78	60.0
KANAMICINA	125	80	64.0
HETACILINA	87	54	62.0
CEFALOTINA	56	39	69.6
GENTAMICINA	1	—	—
POLIMIXINA B	14	—	—
AC. NALIDÍXICO	2	—	—

haviam sido determinados previamente à sulfadiazina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, kanamicina, ampicilina, cefalotina, gentamicina, ácido nalidíxico e polimixina. As 314 amostras incluiam representantes de todos os tipos de amostras resistentes encontradas. A análise dos resultados mostrou de início uma acentuada diferença de comportamento entre *Proteus* e *Providencia* de um lado e os demais grupos do outro. Enquanto somente 7% das amostras dos dois primeiros grupos eram portadoras de fatores R, estes elementos foram encontrados em 73,6% das amostras dos demais gêneros, considerados em conjunto. Com relação a estes, praticamente não houve diferença quanto a frequência de fatores R nos enteropatogênicos e não-enteropatogênicos. Apresentamos na *Tabela III* a frequência de fatores R de acordo com a droga, em todos os gêneros, com exceção de *Proteus e Providencia*. Tomando-se em conjunto os resultados de nossa experiência, conclui-se que os fatores R são extremamente importantes como causa de resistência para a sulfadiazina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, kanamicina, ampicilina e cefalotina, em particular quando a resistência é múltipla, conforme vimos em *Shigella*. O comportamento especial e diferente das amostras de *Proteus e Providencia* (71 ao todo) encontra-se em investigação. Conforme veremos em seguida, estes resultados podem não refletir a situação real da participação dos fatores R na resistência à drogas dos germes investigados, devido a possibilidade da existência de fatores R não transmissíveis por conjugação, os quais não foram excluídos no trabalho relatado. Não temos experiência com outras bactérias gram-negativas e desconhecemos trabalhos procurando avaliar o papel dos fatores R na sua resistência. A frequência de fatores R não é um problema estático, pois depende em larga escala do uso dos antibióticos. Vimos que não encontramos fatores R para a gentamicina, embora já tenham sido descritos em outros países. É possível que já existam entre nós, em amostras mais recentes. Também não incluímos em nosso trabalho a pesquisa de fatores R para as furoxonas e trimetoprim. Embora não se tenha descrito fatores R para as primeiras drogas, foi verificado recentemente que estes elementos sãos frequentemente responsáveis por resistência a segunda. Quanto ao ácido nalidíxico e polimixina, os dados obtidos por nós confirmam os da literatura.

Fatores R não transmissíveis por conjugação — Vários trabalhos sobre a natureza molecular e replicação dos fatores R, que não poderiam ser revistos neste artigo, comprovam que o fator sexual dos fatores R pode se dissociar dos determinantes de resistência, as duas partes, isto é, fator sexual e determinantes de resistência, passando a funcionar como elementos autônomos. O fator sexual, mantém suas propriedades de replicação e transmissão, como qualquer outro fator

sexual mas, os determinantes de resistência, embora mantendo a capacidade de replicação e de propagação para as células da progenie, perdem a habilidade de se transmitir para outra bactéria. Outras alterações dos fatores R também podem torná-los intransmissíveis. Qualquer que seja o mecanismo, tem havido referências na literatura sobre o encontro de fatores R não transmissíveis, mas a importância destes elementos na resistência a drogas de bactérias isoladas de rotina, não foi ainda avaliada. Estudos iniciais em nossos laboratórios, em realização por Maria de Lourdes Monteiro da Silva, sugerem que os fatores R não transmissíveis são importantes como causa de resistência a drogas. O mesmo fato é sugerido pelos resultados do trabalho realizado com Diógenes Santiago Santos pois, conforme veremos em seguida, as mutações dificilmente poderiam explicar a frequente resistência simultânea para várias drogas em muitas das bactérias investigadas. O estudo dos fatores R não transmissíveis por conjugação representa importância prática não só porque são causa de resistência mas também porque podem readquirir a capacidade de transmissibilidade. Para isto, basta entrarem em contato com fatores sexuais apropriados, os quais são bastante frequentes nas enterobactérias. Uma recombinação entre o fator sexual e os determinantes de resistência levaria à formação de um fator R completo. Além disto, poderiam ser transmitidos por transdução.

Origem dos fatores R — Esta é uma questão importante e interessante, para a qual não se tem ainda uma resposta. A hipótese mais provável é a de que os fatores R se formaram pela incorporação de gens cromossômicos de resistência por determinados tipos de fatores sexuais. Esta hipótese vem recebendo suporte ultimamente. Já foi verificado que a introdução de um fator sexual em uma bactéria portadora de resistência cromossômica, resultou na formação de um fator R. Por outro lado, vem aumentando o número de observações sobre a presença de gens cromossômicos capazes de governar a formação de enzimas semelhantes às codificadas por certos fatores R.

GÊNERO STAPHYLOCOCCUS

A verificação de que a produção de penicilinase e a resistência à penicilina eram perdidas simultaneamente e a não obtenção de mutantes produtoras de penicilinase em amostras de *Staphylococcus aureus*, permitiram a hipótese logo confirmada de que os gens determinantes de penicilinase eram localizados em elementos extra-cromossômicos, denominados plasmídeos.

Foi demonstrado em seguida que os plasmídeos do *Staphylococcus aureus* bem como do *Staphylococcus epidermidis* podiam conferir resistência não só à penicilina, mas também a outros antibióticos.

Os plasmídeos dos estafilococos são semelhantes aos fatores R não transmissíveis por conjugação. São elementos genéticos dotados de equipamento para replicação autônoma, mas somente se transmitem por transdução. Vários trabalhos demonstram que a transdução é um mecanismo de transferência efetivo tanto no laboratório como em condições naturais. Assim, é através da transdução que a resistência extra-cromossômica se dissemina entre as amostras de estafilococos.

Os mecanismos químicos da resistência determinada por plasmídeos são semelhantes aos descritos para os fatores R, mas algumas diferenças são dignas de nota.

Resistência às penicilinas — A resistência à penicilina de amostras de *Staphylococcus aureus* encontradas em condições naturais é sempre devida a produção de penicilinase, a qual, como já vimos, é governada por um plasmídeo.

Embora as penicilinases dos estafilococos sejam extremamente ativas contra a benzilpenicilina, fenoximetilpenicilina, fenoxietilpenicilina e ampicilina, hidrolisam muito pouco ou não hidrolisam as cefalosporinas, meticilina e penicilinas semi-sintéticas relacionadas. A resistência do *S. aureus* à meticilina, importante sob o ponto de vista prático, é extremamente confusa quanto aos seus aspectos genéticos e bioquímicos.

Resistência à tetraciclina — Os trabalhos realizados sugerem uma incapacidade da célula resistente em concentrar esta substância, embora a possibilidade de enzimas inativantes não tenha sido definitivamente excluída.

Resistência ao cloranfenicol — Como nas enterobactérias portadoras de fatores R, deve-se também a produção de uma acetiltransferase que inativa o cloranfenicol por acetilação.

Resistência à eritromicina — Os mecanismos químicos de resistência à eritromicina e antibióticos do mesmo grupo ainda são desconhecidos. Alguns trabalhos sugerem redução da permeabilidade da célula e outros menor capacidade de fixação nos ribossomos das células resistentes.

RESISTÊNCIA CROMOSSÔMICA

Conforme já vimos, esta modalidade de resistência é consequência de mutações cromossômicas que ocorrem espontâneamente em qualquer bactéria, durante o processo de divisão celular. A rigor, todas as bactérias, patogênicas ou não, podem tornar-se resistentes por mutação a qualquer um dos antimicrobianos. Entretanto, a experiência mostra que algumas mutantes resistentes para certas drogas são obtidas com mais facilidade do que outras, e os níveis de resistência adquiridos por estas mutantes dependem em grande parte da droga. Aceita-se, classicamente, que uma única mutação pode conferir baixos ou elevados níveis de resistência a uma célula. Embora seja da opinião que este conceito não possa ser generalizado para todas as bactérias e drogas, tem-se admitido e realmente a comprovação é fácil, que uma única mutação determina elevados níveis de resistência para a estreptomicina, ácido nalidíxico, novobiocina e outros antimicrobianos. Em se tratando das penicilinas, tetraciclinas, cloranfenicol e eventualmente de outros antibióticos, os níveis de resistência são geralmente baixos. Enquanto para as primeiras drogas estes níveis são da ordem de 100 a 1.000 μg/ml, para as segundas não costumam ultrapassar 3 a 5 μg/ml (*Fig. 14*). Disto se conclui que para as bactérias se tornarem altamente resistentes aos últimos antibióticos são necessárias várias mutações consecutivas na mesma célula. A frequência com que uma determinada bactéria adquire resistência a um antimicrobiano específico, pode ser calculada pela sua taxa de mutação. De-

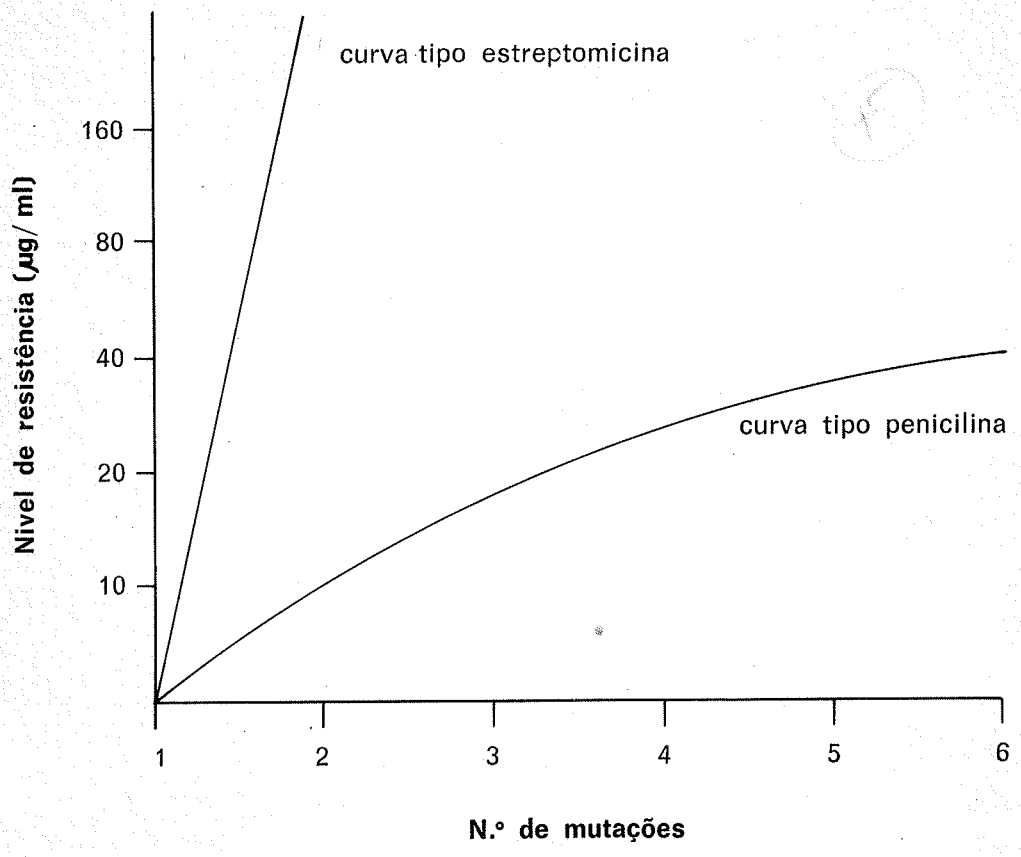


Fig. 14 — Relação entre o no. de mutações e níveis de resistência.

fine-se taxa de mutação como a probabilidade de uma mutação por bactéria em determinado tempo, geralmente o tempo de geração. A taxa de mutação pode ser facilmente calculada no laboratório e tem sido calculada em várias espécies bacterianas para determinadas drogas. De modo geral, estas taxas oscilam entre 1×10^{-6} a 1×10^{-10}, não diferindo acentuadamente das taxas de mutação para outras propriedades. É importante compreender-se que se a taxa de mutação para uma droga é de 1×10^{-6}, a taxa para duas drogas não relacionadas, seria de $1 \times 10^{-6} \times 1 \times 10^{-6}$, ou 1×10^{-12}, pois a resistência simultânea para duas drogas em uma só célula, exige a ocorrência de duas mutações em pontos separados do cromossomo. Em termos mais simples, tal cálculo significa que existe a probabilidade de ocorrerem mutantes resistentes para uma droga em populações de 10^{6} células e para duas drogas em populações de 10^{12} células. O mesmo raciocínio é válido para as mutações conferindo baixos níveis de resistência à drogas como a penicilina e outras. Enquanto a taxa indica a probabilidade de ocorrência, a frequência de mutantes é simplesmente a proporção de mutantes com relação ao número total de células de uma população, isto é, $\frac{\text{n.º de mutantes}}{\text{n.º total de células}}$ Veremos em seguida que tais conceitos são importantes em terapêutica e também na profilaxia da resistência à drogas.

A resistência cromossômica é também transferível de uma bactéria para outra. Este fato tem sido demonstrado no laboratório e há razões para se supor que ocorra em condições naturais, embora não se tenha a menor idéia sobre a magnitude do problema. Fragmentos do cromossomo de uma bactéria podem ser incorporados pelo cromossomo de outra, conferindo a esta novas propriedades, inclusive resistência à drogas. Tais fragmentos podem chegar à célula hospedeira por meio de transformação, transdução e conjugação. Já vimos o que é transdução. No caso do fator R ou

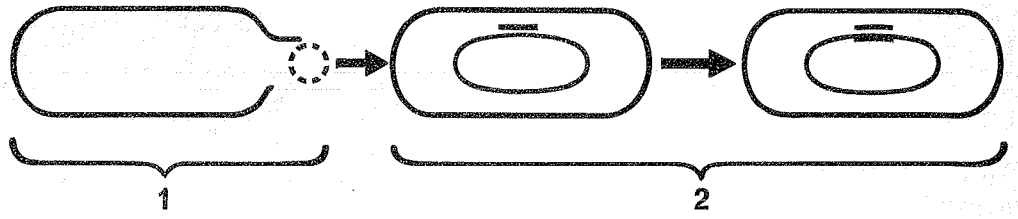


Fig. 15 — Representação esquemática da transformação bacteriana: uma célula bacteriana sofre lise experimental ou natural, liberando fragmentos do seu cromossomo (1). Um destes fragmentos pode ser incorporado por uma outra célula e se recombinar com o seu cromossomo (2). Esta adquire então, características da primeira.

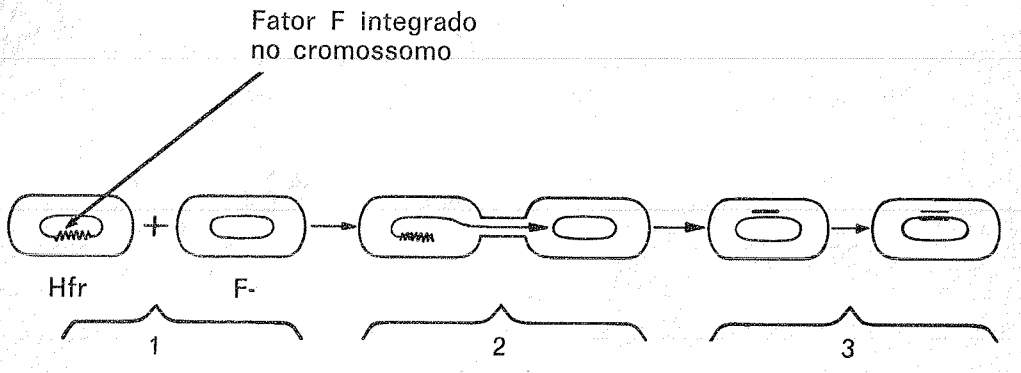


Fig. 16 — Representação esquemática da transferência de fragmentos de cromossomo por conjugação: uma célula Hfr (célula com o fator F integrado no cromossomo) encontra uma F— (1), as duas entrando em conjugação. Durante a conjugação, o cromossomo da célula Hfr abre-se e começa a passar para a célula F- (2). O fragmento recebido pela célula F- recombina-se com o seu cromossomo (3), esta adquirindo propriedades da primeira.

TABELA IV

Diferenças entre resistência extra-cromossômica e cromossômica

Características	Resistência	
	Extra-cromossômica	Cromossômica
Natureza genética	fatores R, plasmídeos	mutações
Transferência "in vivo"	frequente	não avaliada, provavelmente rara
N.° de drogas afetadas simultaneamente	geralmente várias	geralmente uma
Distribuição	gram-negativos especialmente enterobactérias e *Staphylococcus aureus*	gram-negativos, gram-positivos e micobactérias.
Determinação de características indesejáveis para a bactéria	discutível	frequente
Níveis	Geralmente altos	Altos para algumas drogas. Baixos para outras.

plasmídeo, a camada proteica do bacteriófago incorpora estes elementos. Na transdução do cromossomo, ela incorpora fragmentos deste. A transformação consiste simplesmente na incorporação pela célula de fragmentos do cromossomo que chegam ao seu habitat (*fig. 15*). Quanto a conjugação, o processo é semelhante ao descrito para os fatores R, pois depende da presença na célula de um fator sexual, chamado F. O fator F, pode existir em 2 estados, autônomo e integrado ao cromossomo. Tanto em um caso como no outro ele promove conjugação. Entretanto, quanto incorporado no cromossomo (célula Hfr), ele promove a sua transferência, a extensão do fragmento transferido dependendo do tempo de contato entre as duas células (*fig. 16*). Conforme já mencionamos, não conhecemos a importância destes mecanismos na disseminação da resistência cromossomica em condições naturais. Por outro lado, estes processos são limitados a determinadas espécies de bactérias, não podendo portanto, serem aceitos como mecanismos gerais de transmissão de resistência em todas as bactérias.

Os mecanismos químicos da resistência por mutação são pobremente conhecidos e só agora começam a ser elucidados. Para a estreptomicina e provavelmente outros aminoglicosídeos, a resistência é consequência de alterações em uma proteína ribossômica com a qual estes antibióticos se combinam, levando a bactéria à morte. Quando a célula sofre mutação, esta proteína altera a sua configuração, não mais se combinando com a estreptomicina, deixando-a portanto sem um sítio de ação. É interessante notar que esta proteína pode se alterar de tal modo em consequência de mutações que somente pode desempenhar suas funções quando combinada com a estreptomicina. Isto explica a dependência que certas mutantes apresentam à estreptomicina. Outros mecanismos, inclusive alteração da permeabilidade celular e mesmo a produção de enzimas inativantes têm sido descritos. Sendo o assunto extensamente desconhecido e em muitas áreas controvertido, não se presta para uma apresentação didática.

Embora as mutações sejam um recurso para as bactérias se defenderem dos efeitos

tóxicos dos antibióticos, não raramente elas imprimem propriedades desvantajosas à célula. Existem vários trabalhos demonstrando redução da capacidade de crescimento e da virulência de mutantes resistentes para várias drogas. Em nosso laboratório, juntamente com Darcy Aoki, investigamos o crescimento de mutantes de *E. coli* resistentes a sulfadiazina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, kanamicina e ácido nalidíxico, obtidas "in vitro", a partir de uma amostra de *E. coli* 0111: B4; H2.

Com exceção das mutantes resistentes ao ácido nalidíxico, sulfadiazina e a algumas outras drogas, todas apresentaram redução da capacidade de crescimento. Mais recentemente, investigamos a virulência para o olho de cobaio de mutantes de *Shigella* resistentes a vários tipos de drogas, observando diminuição ou perda da virulência na maioria. Estas alterações que a bactéria sofre em consequência de mutações para resistência, podem explicar a raridade do encontro na natureza de mutantes resistentes a certas drogas. Já é clássico o exemplo das mutantes de *S. aureus* resistentes à penicilina. Embora possam ser selecionados "in vitro", nunca são isolados de casos de infecção. Todo estafilococo resistente à penicilina encontrado na a natureza, deve sua resistência a produção de penicilinase, uma enzima cuja produção é governada por um plasmídeo, conforme já foi visto.

Apresentamos na *Tabela IV* algumas diferenças entre a resistência extra-cromossômica e cromossômica.

PAPEL DO ANTIBIÓTICO

Vimos no início deste capítulo que a resistência adquirida decorre de uma alteração do genoma da bactéria e que o antibiótico nada tem a haver com esta alteração. Ele simplesmente seleciona as células que se alteram geneticamente. Vimos também que em alguns casos, o antibiótico atua como indutor de enzimas de bactérias geneticamente resistentes. Enquanto o primeiro papel apresenta repercussões profundas e amplas no fenômeno geral da resistência à drogas, o segundo é de características limitadas.

O antibiótico como agente seletor — Pode-se provar de várias maneiras que o antibiótico não imprime à célula as alterações genéticas que levam à resistência. No caso da resistência por fatores R e plasmídeos, a prova é extremamente simples pois podemos transmitir a resistência de uma bactéria para outra, na ausência de qualquer antibiótico. Poder-se-ia argumentar que os primeiros fatores R tenham sido consequência direta da ação dos antibióticos. Esta hipótese foi anulada quando se demonstrou que bactérias isoladas antes do advento destas drogas já eram portadores de fatores R. Quanto à resistência por mutação, as demonstrações iniciais da não interferência dos antibióticos foram obtidas experimentalmente. De todos os métodos, o mais elegante e direto é o das placas replicadas (*fig. 17*). Consiste no seguinte: estira-se um pedaço de veludo com as felpas para cima em um bloco cilíndrico de madeira ou metal, de diâmetro discretamente inferior ao de uma placa de Petri. Uma placa de Petri, densamente semeada com a bactéria que se deseja estudar é então invertida e sua superfície levemente pressionada contra o veludo. Ao se fazer isto se deixa nas milhares de felpas do veludo bactérias de toda a superfície da placa. Removida a placa, faz-se então a replica em outra placa, esta contendo antibiótico. A replica é feita invertendo-se a placa com antibiótico e pressionando sua superfície contra o veludo contendo as bactérias deixadas pela primeira placa. A placa original é guardada e a replica incubada. Depois da incubação, verifica-se se houve desenvolvimento de alguma colônia na placa com o antibiótico. O investigador marca então a sua posição e com uma agulha de platina retira um pouco do crescimento da mesma posição na placa original, e semeia um tubo de caldo. A partir deste semeia nova placa sem antibiótico, prepara nova replica, marca a posição da colônia na placa com antibiótico, semeia novo caldo a partir da placa original, repetindo o processo quantas vezes forem necessárias. Ao fim de algumas repetições, ele obterá uma grande quantidade de colônias resistentes ao antibiótico. A mais importante característica do experimento é a seguinte: as células foram semeadas em placas e caldos sem o antibiótico, várias vezes em sucessão. Fazendo repique das áreas destas placas onde a replica indicava a presença de mutantes resistentes, foi possível aumentar-se progressivamente o número destas mutantes, até a obtenção de uma cultura pura. Durante todo o processo estas mutantes não foram expostas ao antibiótico, provando que a mutação original que tornou a bactéria resistente ocorreu na ausência do agente seletor. Experimentos desta natureza bem como os outros mencionados e várias observações epidemiológicas levaram à conclusão definitiva de que o antibiótico simplesmente seleciona as bactérias que se tornaram resistentes, a intensidade de seleção dependendo da intensidade de uso do antibiótico. É importante notar que o antibiótico não seleciona somente germes resistentes a ele. Muitas vezes um antibiótico pode selecionar bactérias simultaneamente resistentes a várias drogas. Admitamos a presença de uma *E. coli* resistente à sulfadiazina, estreptomicina, tetraciclina e cloranfenicol nos intestinos de um indivíduo, cuja flora restante seja sensível, por exemplo, ao cloranfenicol. A administração desta droga destruirá toda a flora sensível, selecionando a *E. coli* tetra resistente que num ambiente agora favorável, proliferará abundantemente e ocupará o vazio deixado pela flora sensível. Cada vez que se administra ou se usa um antibiótico, há possibilidade de selecionar-se bactérias resistentes a ele ou outros antibióticos e, sendo tão frequente o uso destas drogas, pode-se imaginar as consequências em um hospital, por exemplo. Dentro de pouco

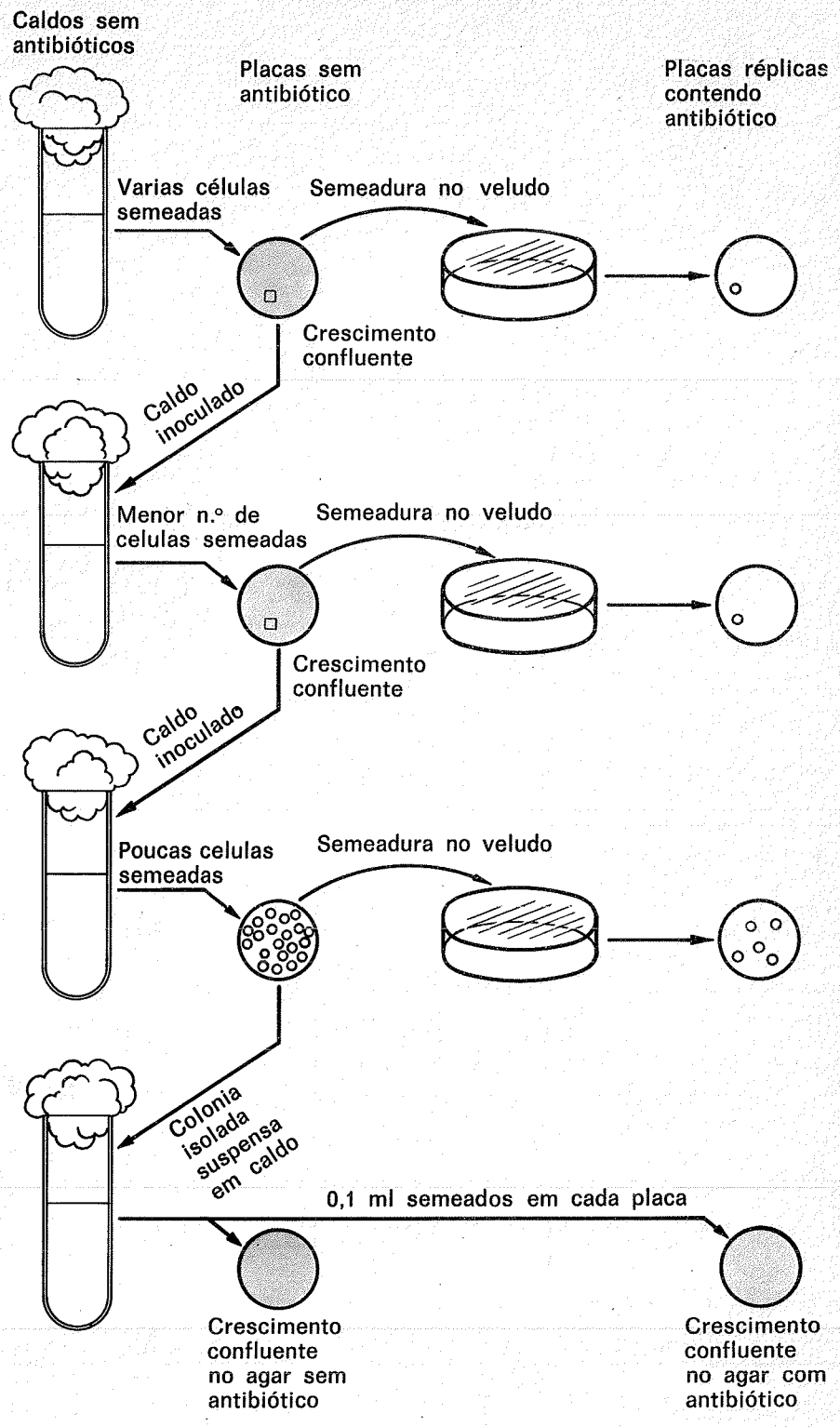


Fig. 17 — Emprego do método das placas replicadas para provar que a mutação ocorreu independentemente da presença do antibiótico. As culturas são sucessivamente transferidas de tubos de caldos para placas de Petri com agar nutriente, tanto o caldo como o agar sem conter antibiótico (lado esquerdo do diagrama). Em cada estágio, a placa sem antibiótico é replicada em uma placa contendo agar e antibiótico (lado direito do diagrama). A cultura final da bactéria é completamente resistente ao antibiótico, conforme pode ser visto nas duas placas na parte mais inferior do diagrama.

TABELA V

Entre 1963 e 1968 ocorreu acentuado aumento do número de amostras de *E. coli.* 0111:B4:H2 simultaneamente resistentes a Su, E, T, C e K

Ano / Modêlo	1963		1964		1965		1966		1967		1968	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Su E T C K	7	17,07	8	26,66	14	42,42	33	75,00	44	83,01	36	81,81
Total	41		30		33		44		53		44	

Su = sulfadiazina; E = estreptomicina; T = tetraciclina; C = cloranfenicol; K = kanamicina.

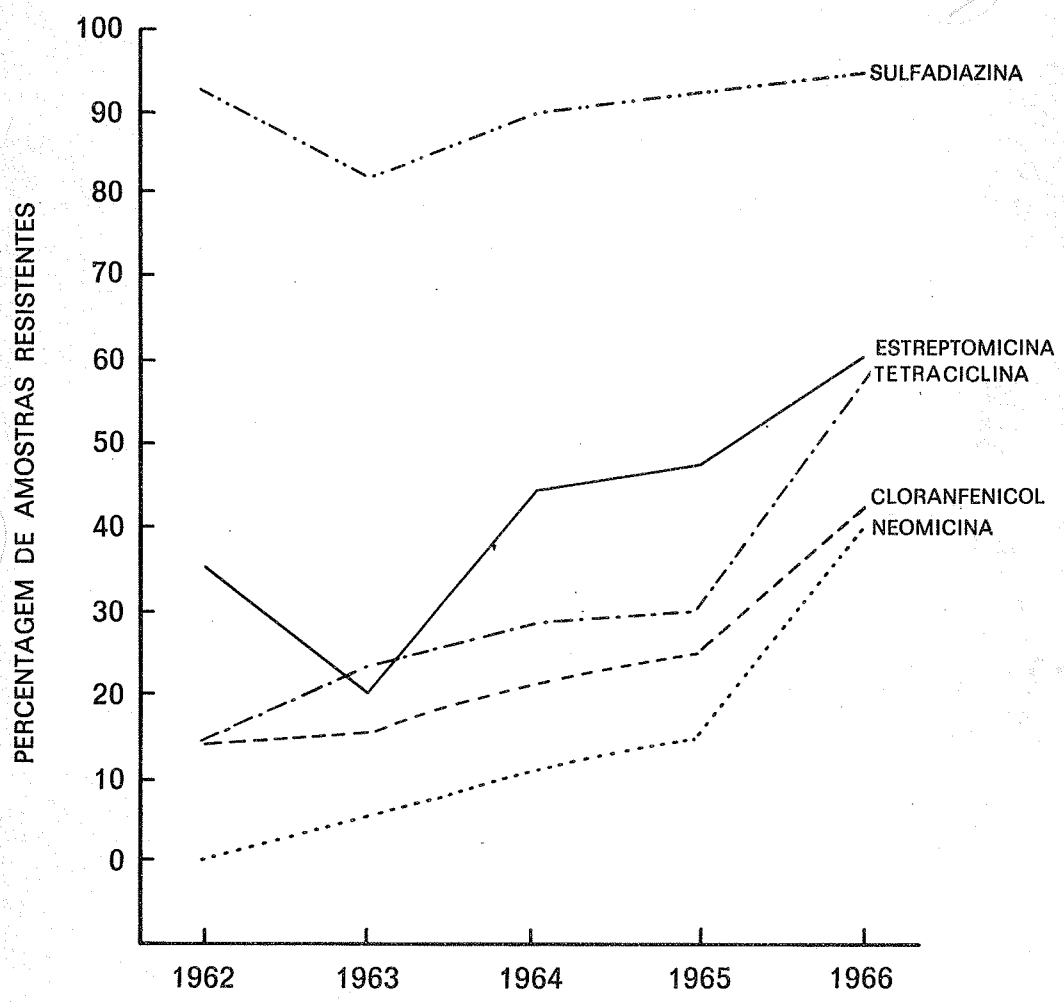


Fig. 18 — Entre 1962 e 1966, ocorreu acentuado aumento de n.º de amostras de *Shigella* resistentes a estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol e neomicina.

tempo, haverá um aumento do número de amostras resistentes que substituirão as sensíveis nos processos infecciosos. Um outro aspecto do problema é a seleção de bactérias resistentes na vigência de um tratamento, determinando recrudescimento da infecção.

São múltiplos os exemplos de seleção de germes resistentes. Já é clássico o caso da penicilina com relação ao *S. aureus* e muitos outros são encontrados na literatura. De modo geral todo novo antibiótico passa para segundo plano depois de alguns anos de uso. Apenas para efeito de ilustração gostaríamos de apresentar o que se passou em poucos anos com alguns agentes de enterite em nosso meio. Dentre as amostras resistentes de *E. coli* 0111:B4, 20% apenas eram resistentes à sulfadiazina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol e kanamicina em 1963. Em 1968, esta amostra passou a representar 80% das amostras resistentes (*Tabela V*). Na *figura 18*, observa-se o que aconteceu com shigelas em espaço de tempo semelhante, isto é, um acentuado aumento do número de amostras resistentes ao cloranfenicol, tetraciclina, kanamicina e estreptomicina.

O antibiótico como indutor — A resistência por fatores R à tetraciclina em gram-negativos é induzível. No *Staphylococcus aureus*, com exceção de algumas formas de resistência extracromossômica é sempre induzível. A indução enzimática é um fenômeno bem conhecido e tem sido intensamente investigado em vários sistemas, como por exemplo, na utilização de lactose pela *E. coli*. Resumidamente, a lactose somente pode ser utilizada quando uma enzima, a beta-galactosidase a desdobra em galactose e glucose. Entretanto, a produção desta enzima depende da presença da lactose dentro da célula. Na sua ausência, os gens responsáveis pela sua produção estão bloqueados pela ação de um repressor. A lactose ao penetrar na célula, combina-se com o repressor, deixando os gens responsáveis pela síntese da enzima funcionarem livremente (*fig. 19*). Os mecanismos de indução das enzimas responsáveis por resistência a drogas ainda não foram totalmente esclarecidos, mas vários trabalhos sugerem que em linhas gerais são semelhantes ao descrito para a indução de beta-galactosidase, embora eventualmente mais complexos. Em outras palavras, a presença do antibiótico dentro da célula seria necessária para a inativação do repressor que normalmente bloqueia os gens responsáveis pela síntese das enzimas que em última análise tornam a bactéria resistente.

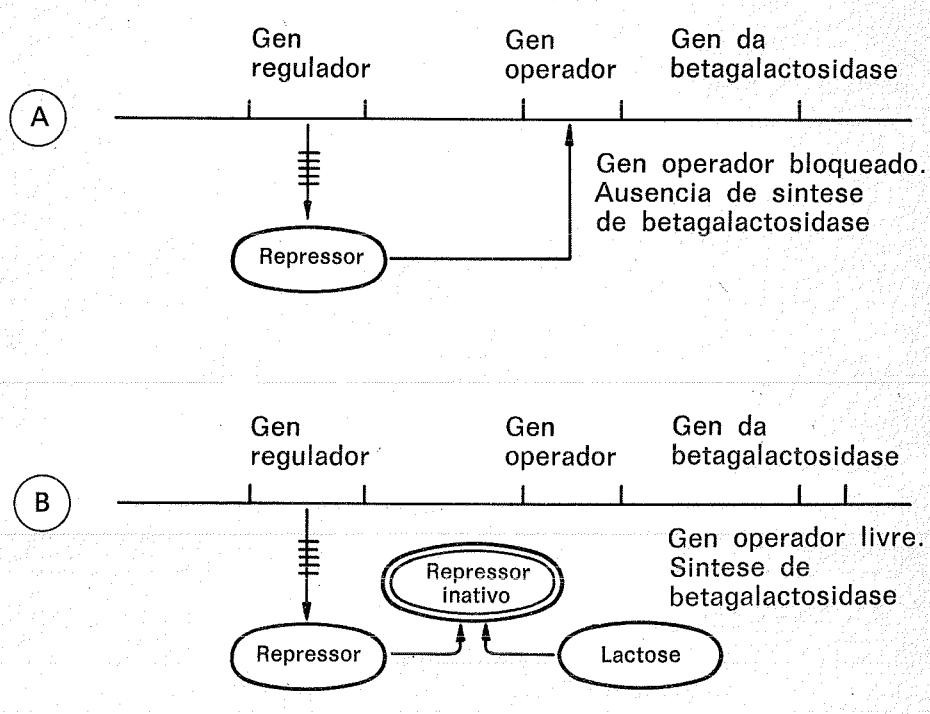


Fig. 19 — Regulação do operon da lactose (indução enzimática). Em A o repressor está bloqueando o operador, não havendo síntese da betagalactosidase e outras enzimas necessárias ao metabolismo da lactose. Em B o repressor foi inativado pela lactose (indutor), permanecendo livre o gen operador, havendo assim síntese das enzimas que metabolisam a lactose.

O PROBLEMA CLÍNICO

Alguns aspectos de resistência nas principais bactérias patogênicas

Gênero Staphylococcus — Tanto o *S. aureus* como o *S. epidermidis* desenvolvem resistência com facilidade, a resistência podendo ser simples, isto é, a uma só droga, ou múltipla. A maioria dos estudos foi realizada com o *S. aureus,* indicando que os principais antibióticos podem ser comprometidos. Atualmente já são encontradas amostras resistentes para as cefalosporinas e penicilinas resistentes à penicilinase. A resistência múltipla é mais comum nos grupos fágicos I e II.

Gênero Estreptococcus — Tanto o estreptococo do grupo A de Lancefield bem como o pneumococo continuam sensíveis à penicilina. As duas bactérias pareciam incapazes de desenvolver resistência à esta droga. Entretanto, recentemente foram descritas algumas amostras de pneumococo, cujo crescimento somente era inibido por concentrações moderadamente elevadas. Amostras resistentes à tetraciclina tem sido descritas. Quanto aos demais estreptococos, em particular o enterococo, amostras resistentes à maioria dos antibióticos não são raras.

Gênero Neisseria — Amostras de gonococo e meningococo resistentes à sulfadiazina são relativamente frequentes atualmente. Já foram também selecionadas amostras de gonococo resistentes à penicilina, embora os níveis de resistência não sejam elevados. Entretanto, em alguns casos o são suficientemente para interferir com a penicilinoterapia. Aparentemente, o meningococo continua sensível à penicilina mas é possível que amostras resistentes sejam selecionadas no futuro. Amostras com elevados níveis de resistência já foram selecionadas tanto "in vitro" como em camundongos infectados experimentalmente.

Enterobactérias — A recente descoberta no México de uma amostra epidêmica de *Salmonella typhi,* simultaneamente resistente à sulfadiazina, estreptomicina, tetraciclina e cloranfenicol, faz com que esta espécie deixe de ser exceção, à grande capacidade das enterobactérias, em adquirirem resistência. Em nossa experiência estes germes podem adquirir resistência a qualquer antibiótico indicado no tratamento de suas infecções. Na maioria das amostras a resistência é múltipla, sendo mais comum em muitas delas a resistência simultânea à sulfadiazina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol e kanamicina.

A *Pseudomonas aeruginosa* e outros gram-negativos comportam-se de modo semelhante às enterobactérias.

Mycobacterium tuberculosis — Extensos levantamentos internacionais demonstram que a resistência primária (amostras isoladas de pacientes não tratados) é relativamente baixa. Entretanto é extremamente elevada em pacientes em tratamento, não sendo raras amostras simultaneamente resistentes a duas e a três drogas.

Outras bactérias — A resistência adquirida em outros germes patogênicos não tem sido motivo de investigação, provavelmente por não ter se constituído ainda em problema.

Associação de drogas

Duas ou mais drogas podem ser associadas por várias razões, uma delas tendo por base o fenômeno da resistência. Imaginemos um paciente com uma infecção por um germe sensível. Depois que a população de células no local da infecção atingir determinado tamanho, dígamos 10^6 células, é provável a existência de mutantes para determinadas drogas individualmente, isto é, mutantes simples. Expondo-se esta população a duas drogas, por exemplo, as mutantes resistentes a uma delas serão destruídas pela outra. Este princípio tem sido aplicado com sucesso no tratamento da tuberculose pulmonar. Já vimos que mutantes simultaneamente resistentes a duas drogas só ocorrem em populações bacterianas extremamente elevadas.

Manutenção de concentrações elevadas

Esta é uma outra maneira de se evitar a seleção de mutantes com recrudescimento da infecção, sendo válida para aquelas drogas contra as quais somente várias mutações consecutivas determinam elevados níveis de resistência. A presença do antibiótico no local

da infecção destruirá às mutantes que tenham sofrido apenas uma mutação pois uma unica mutação dificilmente determinaria níveis de resistência superiores à concentração da droga. Entretanto, se a droga chega no local da infecção em concentração inferior ao nível de resistência da mutante, embora as células sensíveis sejam destruídas, a mutante poderá proliferar levando ao reaparecimento da infecção. Conforme se depreende facilmente, a manutenção de concentrações elevadas não resolveria o problema, se uma única mutação determinasse altos níveis de resistência, conforme acontece com a estreptomicina e outras drogas.

Conceito de germe resistente

Apresenta importância em terapêutica uma compreensão adequada do conceito de germe resistente. Sob o ponto de vista clínico, o termo resistente aplicado a um germe com relação a uma determinada droga, significa que esta droga não deve ser usada. Entretanto, a classificação de um germe em resistente, sensível ou uma das categorias intermediárias, tem por base a concentração que a droga atinge no sangue e a sua concentração inibitória "in vitro". Deste modo, é possível que uma infecção causada por um germe resistente seja facilmente curada, desde que presente em um local onde a droga atinja concentrações superiores a do sangue. Não obstante, quando possível, é preferível o emprego de um antibiótico para o qual o germe é sensível, porque não raramente, os níveis de resistência de certas bactérias são tão elevados que ela não será destruída, mesmo que a droga atinja concentrações elevadas no local da infecção. O inverso também pode ser verdadeiro. Classifica-se uma bactéria como sensível e falha o tratamento de sua infecção. Isto geralmente ocorre quando a droga atinge concentrações inferiores a do sangue no local da infecção ou quando um outro germe associado ao patogênico inativa o antibiótico.

COMBATE A RESISTÊNCIA

Os conhecimentos de que dispomos atualmente abrem perspectivas para o combate à resistência: intervenção nos seus mecanismos genéticos, por exemplo procurando eliminar os fatores R e plasmídeos, intervenção nos mecanismos químicos da resistência pelo emprego simultâneo de substâncias que modifiquem a permeabilidade da célula resistente ou possuam maior afinidade pelas enzimas inativantes, modificação da estrutura química dos antibióticos já em uso, conforme foi feito com a penicilina e se tenta atualmente com outros antibióticos, etc. Todas estas medidas dependem de investigação e de muito trabalho experimental, além de contornar apenas um aspecto do problema. Existem outras, porém, que não exigem qualquer investigação, tendo ainda a grande vantagem de serem globais, oferecendo portanto, maiores perspectivas. Referimo-nos às medidas que evitam seleção de bactérias resistentes, cuja adoção depende dos profissionais e dos poderes públicos. As seguintes recomendações podem ser feitas.

1. A aquisição de antibiótico só deve ser permitida mediante receita médica, medida adotada por vários países. Os reflexos de uma tal medida são vários, pois além de evitarmos consideravelmente a seleção de bactérias resistentes, estaríamos também fazendo a profilaxia de vários efeitos colaterais da antibioticoterapia como choques anafiláticos, super-infecções e outros.

2. O médico deve receitar o antibiótico ou quimioterápico quando estritamente indicado. Ao fazê-lo deve ter em mente:

   a) a natureza do germe infectante e o espectro de ação do antibiótico.

      Se a infecção é causada por uma bactéria sensível, digamos à penicilina G ou à eritromicina e outras circunstâncias permitirem, não usar um antibiótico de largo espectro. A elevada frequência de bactérias com fatores R é, sem dúvida, consequência do intensivo uso destes antibióticos.

   b) a importância da associação de 2 ou mais drogas, como no caso da tuberculose.

   c) a necessidade de manutenção de níveis elevados da droga no foco de infecção.

3. Redução ou descontinuação do emprego dos antibióticos em rações animais ou como preservativos de alimentos perecíveis.

4. Em hospitais, pode ser adotado o sistema do emprego rotativo dos antibióticos.

Conforme se depreende, algumas destas medidas previnem a emergência de bactérias resistentes e a maioria leva a uma redução da pressão seletora dos antibióticos. A redução da pressão é extremamente importante porque, diminuindo-se a intensidade de uso de um antibiótico observa-se, geralmente, diminuição da proporção de amostras resistentes. As razões não são bem conhecidas mas, sem dúvida, uma delas é a melhor adaptação das células sensíveis às condições naturais de vida.

PERSISTÊNCIA

O fenômeno da persistência foi definido como "a capacidade de um micróbio sobreviver à exposição de uma droga nos tecidos apesar de ser sensível à droga "in vitro". Ocorre persistência, porque o microrganismo deixa de sofrer a ação do antibiótico por estar protegido pelo meio-ambiente ou por se encontrar numa fase do seu ciclo de vida, na qual é refratário à ação da droga. Tem a proteção do meio-ambiente quando se localiza numa área, por exemplo, dentro de uma célula, na qual o antibiótico não penetra.

A refratariedade ao antibiótico ocorre quando o microrganismo se transforma em forma L, deixando de sofrer a ação de um antibiótico que atue na parede ou quando ele se encontra inativo e o antibiótico somente age em fase de atividade.

O fenômeno da persistência tem acentuada importância em terapêutica, porque pode ser causa de recidiva de infecções. É desnecessário lembrar que a persistência não tem qualquer relação com o fenômeno da resistência adquirida. A resistência é de natureza genética, enquanto a persistência é simples problema de fuga de algumas células à agressão do antibiótico.

RESUMO

Foi feita uma revisão dos aspectos médicos da resistência bacteriana à drogas. Depois de se fazer um resumo dos mecanismos genéticos e químicos da resistência à drogas bem como do papel dos antimicrobianos, cada um destes ítens foi revisto em maior profundidade, dando-se ênfase aos aspectos de maior importância para o médico. Em seguida, foi feita uma revisão das aplicações práticas da resistência em terapêutica das infecções bacterianas e algumas normas foram recomendadas no sentido de se combater a resistência. Finalmente discutiu-se o fenômeno da persistência bacteriana.

SUMMARY

A review was made on the medical aspects of bacterial drug resistance. After summarizing the genetic and chemical mechanisms of drug resistance as well as the antimicrobial drugs role, each of these items was reviewed in depth emphasizing the most important aspects for the general practitioner. Afterwards, a revision was made on practical aplications of resistance on the treatment of bacterial infections and some rules were recommended therein to combat this resistance. Finally, the meaning of bacterial persistance was discussed.

BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA

DAVIES, J. E. & ROWND, R. — Transmissible multiple drug resistance in Enterobacteriaceae — Science, 176:758-768, 1972.

DAVID, H. L. — Fundamentals of drug susceptibility testing in Tuberculosis. US Department of Health Education and Welfare. Public Health Service. Atlanta, Georgia.

DULANEY, E. L. & LASKIN, A. I. — The problems of drug-resistant pathogenic bacteria. Ann. N.Y. Ac. Sc. 182:1-415, 1971.

KREMERY, V.; ROSIVAL, L. & WATANABE — Bacterial plasmids and Antibiotic resistance — First International Symposium on Infectious Antibiotic Resistance. Castle of Smolenice, Czechoslovakia, 1971.

SANTOS, D. S. — Resistência transferível a drogas na família Enterobacteriaceae. Tese de Mestrado em Microbiologia na Escola Paulista de Medicina, 1972.

SHAW, W. V. — Biochemical mechanisms of transferable drug resistance Ad. Pharmacology and Chemotherapy, 9:131-172, 1971.

STANIER, R. Y.; DOUDOROFF, M. & ADELBERG, A. A. — The microbial world, 3rd. — Prentice Hall, N.Y. — U.S.A., 1970.

TOLEDO, M. R. F.; ZULIANI, M. E. & TRABULSI, L. R. — Single and multiple transferable drug resistance among clinically isolated *Shigella* strains. Rev. Microb. 1:1-11, 1970.

WOLSTENHOLME, G. E. W. & O'CONNOR, M. — Bacterial episomes and plasmids. A Ciba Foundation Symposium, Churchill, London, 1969.

ZÄHNER, H. & MASS, W. K. — Biology of antibiotics, Springer-Verlag — N.Y. Heidelberg, Berlim, 1972.

Êste trabalho foi composto e impresso
nas oficinas gráficas da

TIPOGRAFIA EDANEE S.A.

à Rua do Bosque n.º 1.426 - São Paulo