

**NATUREZA E IMPLICAÇÕES DA RESISTÊNCIA A DROGAS
EM AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus***

JOSE PINTO DE SIQUEIRA JÚNIOR

Orientador: JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho de 1976

"Quantas vezes ouvi dizer que moro no laboratório. De fato, há 28 anos meu lar tem sido mais aquele em que pulsam os corações de jovens brasileiros. Somente Deus sabe a minha luta em que não conquisei fortuna material, mas ingratidão, tristezas e angústias, injustiças que a minha consciência de professor fundiram no cadinho da boa vontade e do patriotismo, transformando-as em agentes catalíticos de tudo quanto tenho realizado para o bem da juventude, que é a própria Pátria no seu destino histórico".

As palavras acima, proferidas pelo Prof. DEMÓSTHENES SANTOS CORREA, por ocasião dos Debates de Química do I.E. "Sud Mennucci" - Piracicaba, em outubro de 1966, justificam, por si sô, a homenagem que o autor pretende prestar a esse incansável mestre. Esta dissertação é fruto da semente lançada nos saudosos tempos do "Sud Mennucci".

À Lillian
À meus pais

AGRADECIMENTOS

Externamos nossos agradecimentos a todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho, principalmente às seguintes pessoas e entidades:

- *Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo*, pela amizade, estímulo e valiosa orientação.
- Prof. Dr. Ernesto Paterniani, pelas facilidades concedidas como Diretor do Instituto de Genética.
- Prof. Dr. Carlos Solé-Vernin, pelo fornecimento das amostras bacterianas utilizadas neste trabalho e, principalmente, pelo estímulo e disposição de sempre cooperar.
- Lic. Gislene G. Franco do Nascimento, nossa colega, pela produtiva convivência e companheirismo.
- Prof. Edmar Chartone de Souza, pelas valiosas sugestões.
- Srta. Lillian Machado Gomes, pelo estímulo constante e motivação.

- Srs. Antonio J. Rocha Campos, Salvador Peixe, Luiz Próspero e Rodolfo Fulini, pelo auxílio técnico.
- Srtas. Érica Spruck e Gerda Spruck, pela valiosa colaboração na revisão.
- Sr. José Broglio, pelo valioso auxílio na impressão.
- Funcionários do Instituto e Departamento de Genética.
- Acadêmicos Teresa Losada Valle e Mario Caetano da Silva.
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida (04 biol. 74/349).
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro ao Setor de Genética de Microorganismos do I Gen., através do Programa Integrado de Genética, área de Genética de Microorganismos.

I N D I C E

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	01
2. MATERIAIS E MÉTODOS.	11
2.1. Amostras bacterianas	11
2.2. Drogas	13
2.3. Meios de cultura.	13
2.4. Curva de crescimento	13
2.5. Determinação dos níveis de resistência	14
2.6. Tratamento pelo brometo de etídio	15
2.7. Isolamento de mutantes com resistência cromosômica à penicilina	15
2.8. Cálculo da frequência de mutantes resistentes à estreptomicina.	16
3. RESULTADOS	17
3.1. Curva de crescimento	17
3.2. Níveis de resistência das amostras originais.	20
3.3. Tratamento pelo brometo de etídio	29
3.4. Determinação dos níveis de resistência das amostras derivadas	37
3.5. Determinação dos níveis de resistência frente à eritromicina e ao nitrato de cádmio	40
3.6. Isolamento de mutantes com resistência cromosômica à penicilina	42
3.7. Frequência de mutantes resistentes à estreptomicina	42
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	44
4.1. Dos níveis de resistência	44
4.2. Da cura pelo brometo de etídio.	46

	<u>Página</u>
4.3. Dos plasmídios	48
4.4. Da instabilidade de amostras portadoras de plas mídios	52
5. RESUMO	54
6. SUMMARY	57
7. BIBLIOGRAFIA	60

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
01 - Amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> , isoladas na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e utilizadas no presente trabalho. . .	12
02 - Número médio de bactérias viáveis, por ml de meio de cultura, em diversos tempos. <i>Staphylococcus aureus</i> "OXFORD 1203" (ATCC 9144)	18
03 - Níveis de resistência de 35 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> expresso em µg da droga por ml de meio de cultura	21
04 - Modelos de resistência de 26 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> , frente a cinco drogas	28
05 - Amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> submetidas ao brometo de etídio e respectivas condições de tratamento	30
06 - Eliminação de resistência à penicilina e ao bicloreto de mercúrio, em amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> , pelo brometo de etídio	31
07 - Eliminação de resistência à estreptomina, em amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> , pelo brometo de etídio	33
08 - Eliminação de resistência à tetraciclina, em amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> , pelo brometo de etídio	35

Tabela

Página

09	-	Eliminação de resistência ao cloranfenicol, em amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> , pelo brometo de etídio	36
10	-	Níveis de resistência de 21 amostras derivadas de <i>Staphylococcus aureus</i> e originais correspondentes, frente a algumas drogas..	38
11	-	Níveis de resistência de 32 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> , frente à eritromicina e ao nitrato de cádmio	41
12	-	Frequência de mutantes resistentes à estreptomicina em 6 linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i> (média de 2 experimentos)	43
13	-	Classificação de plasmídios em <i>Staphylococcus aureus</i> (RICHMOND, 1968).	49
14	-	Classificação de plasmídios de <i>Staphylococcus aureus</i> , baseada na resistência ou sensibilidade à EM, Hg e Cd	50
15	-	Classificação de plasmídios de 15 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> , baseada na resistência ou sensibilidade à EM, Hg e Cd . .	51

LISTA DE GRÁFICOS

<u>Gráfico</u>	<u>Página</u>
01 - Número médio de bactérias viáveis, por ml de meio de cultivo, em função do tempo. <i>Staphylococcus aureus</i> amostra "OXFORD" 1203(ATCC 9144)	19
02 - Distribuição dos níveis de resistência de 35 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> , frente ao bicloreto de mercúrio	23
03 - Distribuição dos níveis de resistência de 35 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> , frente à penicilina	24
04 - Distribuição dos níveis de resistência de 35 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> , frente à estreptomicina	25
05 - Distribuição dos níveis de resistência de 35 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> , frente à tetraciclina	26
06 - Distribuição dos níveis de resistência de 35 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> , frente ao cloranfenicol	27

1. INTRODUÇÃO

Os estafilococos patogênicos, embora sua comunicabilidade nem sempre coincida com sua maior virulência (SOLÉ-VERNIN e UTHIDA-TANAKA, 1969), ainda são considerados um dos mais perigosos microrganismos em medicina, mercê da prevalência e diversidade de cepas resistentes a agentes antimicrobianos.

O *Staphylococcus aureus* apresenta ainda algumas desvantagens para seu estudo genético, incluindo-se nestas sua dificuldade em crescer num meio simples e o conhecimento, ainda fragmentário, de sua organização genômica.

Embora sua dificuldade em relação a meio de cultura, os estafilococos já foram e estão sendo objetos de vários estudos genéticos relacionados com sua atividade bios-

sintética. *RITZ e BALDWIN (1962)* estudaram dez mutantes auxotróficos para triptofano, sem entretanto caracterizar específicos locos envolvidos, questão que foi elucidada por *PROCTOR e KLOOS (1970)* na linhagem 655 através de transdução, quando reconheceram cinco locos agrupados.

HUMBERT e BALDWIN (1963) isolaram seis mutantes auxotróficos para metionina e, com base em estudos bioquímicos, os classificaram em três grupos. Uma análise dos mutantes por transdução recíproca, indicou que a sequência linear dos locos envolvidos era a mesma das reações envolvidas na síntese daquele aminoácido.

KLOOS e PATTEE (1965) estudaram sessenta e seis mutantes auxotróficos para histidina em experimentos de transdução e reconheceram, no genoma da linhagem 655, a região *his*, a qual comportava seis locos gênicos.

SMITH e PATTEE (1967) estudaram vinte e oito mutantes *ilv⁻* (isoleucina valina dependentes), os quais foram reunidos em quatro grupos e, através de análises de transduções, estabeleceram que a ordem linear dos genes estruturais é idêntica a ordem de participação das enzimas correspondentes na biossíntese da isoleucina e valina, e que esses genes compreendem um único grupo de ligação.

A biossíntese da lisina em *S. aureus* foi estudada por *BARNES, BONDI e MOAT (1969)* através de uma série de mutantes auxotróficos e os dados sugeriram que a região do genoma responsável pela síntese desse aminoácido, era constituída como um operon, hipótese que foi reforçada com o trabalho de *BARNES, BONDI e FUSCALDO (1971)*.

A biossíntese de purinas já foi também estudada em *S. aureus* através do uso de mutantes auxotróficos (*CARRERE e SPADA-SERMONTI, 1964; BAXTER-GABBARD e PATTEE, 1970*).

A despeito desses estudos, o conhecimento da organização genômica do *S. aureus* permanece realmente ainda fragmentário, embora alguma evidência haja de que o genoma principal dessa bactéria possa ser composto de mais de um elemento (ALTENBERN, 1967). Transdução generalizada é de pequeno valor para resolver esse problema, por causa da aparente homogeneidade e do tamanho limitado das partículas transducentes. PATTEE e NEVELN (1975) estudando dez locos distintos (um envolvendo resistência à novobiocina e nove associados a atividades de biossíntese), demonstraram, por transformação, três grupos de ligação, embora a relação entre eles não ficasse esclarecida. O sucesso da transformação em detectar esses grupos de ligação pode ser atribuído, pelo menos parcialmente, à heterogeneidade dos fragmentos transformantes, sendo de se esperar que num futuro próximo, através desse processo parassexual que em *S. aureus* começou a ser usado com sucesso por LINDBERG, SJÖSTRÖM e JOHANSSON (1972), o problema da organização genômica dos estafilococos possa ser resolvido.

As vantagens e importância dos estudos genéticos em estafilococos, residem primariamente em seus aspectos epidemiológicos.

A evidência mais comum no campo da epidemiologia das estafilococcias, tem sido o gradual desenvolvimento de resistência aos sucessivos antibióticos postos em uso na prática clínica (BULLOW, 1971), concorrendo para isso a impressionante variabilidade genética dessa bactéria, sendo que diferentes mecanismos contribuem para tal.

Uma bactéria, originalmente sensível, pode tornar-se resistente a um antibiótico não só depois de um processo de mutação-seleção, mas também através da transferência de informações genéticas por outra já resistente. Nos estafilococos essa transferência ocorre principalmente através da transdução (mediada por bacteriófagos), já que ainda não foi

demonstrado o mecanismo da conjugação e a transformação só deve ocorrer com sucesso "*in vitro*" e em algumas linhagens apropriadas (LINDBERG, SJÖSTRÖM e JOHANSSON, 1972; SJÖSTRÖM, LÖFDAHL e PHILIPSON, 1975), visto que praticamente todas as culturas naturais contêm altos níveis de nucleases (CATLIN e CUNNINGHAM, 1958).

Durante os últimos quinze anos, evidências se acumularam de que resistência a vários antibióticos em *S. aureus*, como em enterobactérias, é plasmidial. NOVICK e BOUANCHAUD (1971) chegam mesmo a sugerir que num futuro próximo, a maioria se não todas resistências em estafilococos de significado clínico, mostrarão herança plasmidial. Recentemente, evidências demonstraram herança plasmidial inclusive para resistência a gentamicina (SOUSSY *et alii*, 1975).

A primeira suspeita de que algo de diferente havia com respeito à hereditariedade da resistência a drogas em *S. aureus*, surgiu com a observação de BARBER (1949) de que esses microrganismos perdiam, irreversivelmente, a resistência à penicilina. Investigações estimuladas por essa observação, mostraram que o mecanismo genético da resistência à penicilina não era o usual (mutação-seleção), e sim devido a aquisição de um plasmídeo (NOVICK, 1963), conclusão esta que foi suportada pelos trabalhos de HARMON e BALDWIN (1964) e HASHIMOTO, KONO e MITSUHASHI (1964). A resistência à penicilina seria devida à produção, pela célula, de enzima penicilinase (KIRBY, 1945).

A observação de que certos pares de plasmídios penicilinase (PCase) poderiam coexistir numa única célula de estafilococo enquanto que, com outros pares recombinação e reversão ao estado haplóide é comum, levou NOVICK e RICHMOND (1965) a postular a idéia de compatibilidade. Dois plasmídios seriam compatíveis se pudessem coexistir na mesma célula, enquanto que incompatíveis seriam se segregassem rapidamente com

ou sem recombinação. Com base nesse comportamento dois grupos de compatibilidade são reconhecidos: *Com I* e *Com II*. O plasmídeo *PCase* seria um replicon autônomo (NOVICK, 1967) contendo um gene regulador *i*, um estrutural *p* e um promotor *pr*, responsáveis pela produção da penicilinase em si, além do locus *mer* (manutenção, compatibilidade e replicação) (NOVICK, 1969), podendo ainda conter genes para resistência à eritromicina (MITSUHASHI *et alii*, 1965) e a vários íons inorgânicos (NOVICK e ROTH, 1968; PEYRU, WEXLER e NOVICK, 1969), como cádmio, arsenato, arsenito, bismuto, chumbo, mercúrio e zinco.

Resistência ao íon mercúrico (Hg^{++}), foi descoberto por MOORE (1960), demonstrando ser plasmidial por RICHMOND e JOHN (1964) e sua importância como dado epidemiológico salientado por vários autores (MOORE, 1960; TURNER e WILLIS, 1962; WILLIS e TURNER, 1963; RICHMOND *et alii*, 1964; WILLIAMS, 1967, 1971), inclusive no Brasil, onde SOLÉ-VERNIN e UTHIDA-TANAKA (1969) verificaram que em ambiente extra hospitalar, aproximadamente 1/4 das amostras de estafilococos são Hg^R e os restantes 3/4 são Hg^S e, de acordo com o maior ou menor relacionamento das amostras com o ambiente intra hospitalar, aquelas proporções vão se alterando até a inversão completa de seus valores nos casos graves de estafilococcias adquiridas no hospital.

A primeira evidência de que resistência à eritromicina poderia ser plasmidial, foi obtida por MITSUHASHI *et alii* (1963), que conseguiram em duas amostras eliminação da referida marca após tratamento por acriflavina. Posteriormente, MITSUHASHI *et alii* (1965) obtiveram co-transdução da resistência à penicilina e eritromicina.

Outras marcas genéticas podem se localizar no plasmídeo *PCase*, como resistência à canamicina (ANNEAR e GRUBB, 1972), ao ácido fusídico (LACEY e GRINSTED, 1972) e ao brometo de etídio (JOHNSTON e DYKE, 1969).

O DNA correspondente a propriedade fenotípica da produção de penicilinase e resistência a íons inorgânicos, foi isolado por *RUSH et alii* (1969), estabelecendo-se assim, indubitavelmente, a natureza plasmidial das referidas marcas. O tamanho dos plasmídios *PCase* varia de 12×10^6 a 21×10^6 daltons e o número de cópias por célula é estimada de 2 a 8, conforme a linhagem (*NOVICK e BOUANCHAUD, 1971; LACEY, 1975*).

Convém aqui salientar que já foram descritas algumas poucas linhagens de *S. aureus*, na qual resistência à penicilina era cromossômica (*ASHESHOV, 1966b; POSTON, 1966*). *SWEENEY e COHEN (1968)* estudaram uma linhagem (55C1) que continha dois grupos de ligação para formação de penicilinase, um ligado a genes para resistência a íons de cádmio e mercúrio, plasmidial portanto, o outro com propriedade de genes cromossômicos. *ASHESHOV (1969)* descreve uma linhagem com resistência cromossômica à penicilina e portadora de plasmídio para resistência a íons arsenato, de cádmio e de mercúrio (plasmídio *pi*); quando esta linhagem é mantida à temperatura ambiente, mudanças ocorrem em sua constituição genética consistente com a hipótese da duplicação do gene para produção de penicilinase, com uma cópia retida no cromossomo na localização original e a outra cópia incorporada ao plasmídio *pi*. *RICHMOND (1972)* compara exopenicilinasas mediada por gene cromossômico e por gene plasmidial, concluindo pela extrema similaridade entre ambas.

Os plasmídios *PCase* foram extensivamente abordados por *RICHMOND (1968)* em uma revisão, onde transdução e recombinação de plasmídios e formação de plasmídios diplóides são também considerados.

Diversas evidências estabeleceram que o determinante genético para resistência à tetraciclina, em algumas linhagens de *S. aureus*, pode estar localizado em plasmídio.

MAY, HOUGHTON e PERRET (1964) observaram que a linhagem E169, quando cresce a 43 - 44°C, perdia irreversivelmente a resistência à tetraciclina e à penicilina, sendo que *ASHESHOV (1966a)* observou o mesmo fato em outras linhagens. Resistência à tetraciclina e à penicilina são eliminadas em diferentes frequências, e isso é consistente com a hipótese de diferentes plasmídios para aqueles determinantes. A cinética da transdução da resistência à tetraciclina por fagos tratados com luz ultravioleta, é aquela esperada para transdução de plasmídios (*ARBBER, 1960; ASHESHOV, 1966b; POSTON, 1966*).

O plasmídio TC^R , mediria $2,66 \times 10^6$ a $2,9 \times 10^6$ daltons e cada célula poderia conter de 30 a 50 cópias (*NOVICK e BOUANCHAUD, 1971; CHOPRA, BENNETT e LACEY, 1973*).

Há entretanto evidências de que a resistência à tetraciclina pode ser cromossômica em algumas linhagens (*KASUGA, HASHIMOTO e MITSUHASHI, 1968; KAYSER, WÜST e CORRODI, 1972*). Experimentos de transdução levados a efeito por *ASHESHOV (1975)*, revelam, de fato, a existência de dois tipos de resistência a altas concentrações de tetraciclina: plasmidial, onde as amostras apresentam resistência à tetraciclina e sensibilidade à minociclina (tetraciclina sintética) e cromossômica, onde as amostras apresentam resistência tanto à tetraciclina quanto à minociclina.

Em experimentos de transdução com fagos induzidos por luz ultravioleta, da linhagem E169, *KASUGA e MITSUHASHI (1968)* demonstram que resistência à tetraciclina e estreptomina são co-transduzidas numa frequência de 85 - 93%, concluindo pela ligação das referidas marcas. Já *GRUBB e O'REILLY (1971)* em experimentos de transdução, na mesma linhagem, com fagos virulentos, concluíram pela não ligação das marcas, ainda que plasmidiais, já que eliminação das mesmas, embora em baixa frequência, foi obtida após tratamento pelo brometo de

etídio (mas não pela acriflavina) e a cinética da transdução por fagos tratados com luz ultravioleta foi típica para plasmídios. GRUBB, O'REILLY e MAY (1972) confirmaram a não ligação sugerindo que, ocasionalmente, as marcas se tornariam associadas podendo então serem co-transduzidas.

Em várias outras linhagens, resistência à estreptomicina parece ser cromossômica (POSTON, 1966; KASUGA, HASHIMOTO e MITSUHASHI, 1968; LACEY e CHOPRA, 1972). Cerca de 70% dos isolados clínicos de *S. aureus* resistentes à estreptomicina, tem alto nível de resistência, o que é característico de resistência do tipo cromossômico/ribossomal (LACEY, 1975). Resistência plasmidial à estreptomicina foi entretanto demonstrada em linhagens que não a E169 (AYLIFFE, 1970; GRINSTED e LACEY, 1973).

CHABBERT, BAUDENS e GERBAUD (1964) observaram eliminação da resistência ao cloranfenicol em duas linhagens, após tratamento com acriflavina. De fato, as evidências sugerem um loco plasmidial em todas as linhagens investigadas resistentes ao cloranfenicol (LACEY, 1975). O plasmídio CL^R , mediria cerca de $3,1 \times 10^6$ daltons e estaria presente na célula em múltiplas cópias (NOVICK e BOUANCHAUD, 1971).

Outras evidências e propriedades de plasmídios em *S. aureus*, bem como aspectos epidemiológicos e ecológicos, são extensivamente tratados na revisão de LACEY (1975).

Plasmídios de *S. aureus* são perdidos espontaneamente e irreversivelmente numa frequência maior que a taxa de mutação e vários agentes químicos, os chamados agentes de cura, são capazes de aumentar essa frequência, sendo este um dos critérios para se determinar a localização plasmidial de marcas genéticas. Os outros critérios são detalhadamente descritos por RICHMOND (1968) e por LACEY (1975). Entre os agentes de cura os mais descritos são os corantes de acridina, o

brometo de etídio, o dodecil sulfato de sódio (SDS) e a rifampicina.

MITSUHASHI et alii (1963) observaram que resistência aos antibióticos macrolídicos (eritromicina, oleandomicina e leucomicina) era eliminada em *S. aureus* após tratamento pela acriflavina, o mesmo acontecendo com resistência à penicilina (*HASHIMOTO, KONO e MITSUHASHI, 1964*), sendo que co-eliminação de ambas as marcas foi reportada por *MITSUHASHI et alii* (1965). *HARMON e BALDWIN* (1964) também verificaram eliminação do plasmídeo *PCase* pela acridina orange. No entanto, esses fatos não foram confirmados por outros autores, o que levou *RICHMOND* (1968) a considerar que os corantes de acridina não curam o plasmídeo *PCase* e que as discrepâncias observadas entre os vários trabalhos resultam, provavelmente, da falta de suficientes dados do controle. Por outro lado, em seis linhagens de *S. aureus* resistentes à canamicina e cloranfenicol, *CHABBERT, BAUDENS e GERBAUD* (1964) observaram eliminação das referidas marcas, tanto espontaneamente como sob ação da acriflavina.

JOHNSTON e RICHMOND (1970) mostraram eliminação de resistência à penicilina pela rifampicina em *S. aureus* linhagem 8325; no entanto, os resultados obtidos com a mesma linhagem, por *ZIMMERMANN, ROSSELET e KNÜSEL* (1971) são conflitantes. *RUBIN e ROSENBLUM* (1971), em outras linhagens, obtiveram eliminação com frequência de 0,45 a 8,6%.

Eliminação de fator *F* em *Escherichia coli* pelo SDS já havia sido descrita por *INUZUKA et alii* (1969), quando *SONSTEIN e BALDWIN* (1972) o testaram em trinta e oito linhagens de *S. aureus* produtoras de penicilinase, sendo que em duas delas houve perda do plasmídeo.

Resultados mais promissores foram realmente obtidos com o brometo de etídio, um tripanossomicida que afe-

ta a síntese de ácidos nucleicos, não só na eliminação de plasmídios para resistência a drogas (BOUANCHAUD, SCAVIZZI e CHABBERT, 1969; GRUBB e O'REILLY, 1971; RUBIN e ROSENBLUM, 1971), como na eliminação de plasmídios para produção de toxina esfoliativa e bacteriocina (WARREN et alii, 1974).

Como se pode verificar, os plasmídios de *S. aureus* têm merecido a atenção de numerosos pesquisadores, oferecendo entretanto perspectivas bastante promissoras nesta área de estudo, principalmente no cotejo entre dados epidemiológicos e dados genéticos.

SOLÉ-VERNIN e UTHIDA-TANAKA (1969) analisando amostras de *S. aureus* isoladas em nosso meio, notaram comportamento diferente entre amostras resistentes ao íon mercúrico (Hg^R) e portanto portadoras de plasmídio, e amostras a ele sensível (Hg^S), e consistente com a hipótese de uma maior taxa de mutação para resistência aos antibióticos, nas Hg^R .

A presente dissertação tem como objetivo verificar a natureza cromossômica ou plasmidial de algumas marcas genéticas para resistência a drogas em *S. aureus* em nosso meio e avaliar o possível significado biológico da resistência ao íon mercúrico na instabilidade mostrada por algumas amostras, com relação a resistência a drogas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras bacterianas

Foram utilizadas 35 amostras de *Staphylococcus aureus*, discriminadas na Tabela 1. Essas amostras foram isoladas, bem como seus fagótipos determinados, na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo Dr. Carlos Solé-Vernin. Outra amostra utilizada foi a "OXFORD 1203" (ATCC 9144), fornecida pela Seção de Coleção de Culturas (coleção 282) do Instituto Adolfo Lutz.

Tabela 1. Amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e utilizadas no presente trabalho.

Amostras ^{a/}	G Fagótipos ^{b/}	Amostras	Fagótipos
3A1	53/83A	3A35	3C
3A11	NT ^{c/}	3A45	52/52A
3A21	29	3A6	NT
3A31	NT	3A7	NT
3A41	NT	3A8	NT
3A2	3C/55/71	3A18	NT
3A12	52/52A/80/81	3A28	NT
3A22	29	3A38	NT
3A32	53/83A/85	3A9	80/81
3A42	79/80	3A19	81
3A52	3C	3A29	52/52A
3A3	NT	3A10	52/52A/80/81
3A13	52/81	3A20	52/52A/80/81
3A23	29/80	3A30	84
3A4	80	3A40	84/85
3A14	NT	3A50	52/52A
3A24	NT	3A60	29
3A5	NT		

^{a/} As amostras estão indicadas pelos números de registro de nosso laboratório.

^{b/} Bacteriófagos utilizados na fagotipagem: 29, 52, 52A, 79, 80, 3A, 3C, 55, 71, 81, 6, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 83A, 84, 85, 42D, 187.

^{c/} Não tipável, ou seja, não reagiu com nenhum dos bacteriófagos utilizados.

2.2. Drogas

Bicloreto de mercúrio (Merck)	Hg
Brometo de etídio (Sigma)	BE
Cloranfenicol (Parke Davis)	CL
Eritromicina (Eli Lilly)	EM
Estreptomicina (Fontoura Wyeth)	SM
Nitrato de cádmio (Merck)	Cd
Penicilina (Fontoura Wyeth)	PC
Tetraciclina (Pfizer)	TC

As soluções estoques dos antibióticos foram preparadas com assepsia nos diluentes recomendados (*FAVA NETO*, 1975) e mantidas a 4°C até o momento do uso, no máximo por 4 dias.

2.3. Meios de cultura

Ágar nutriente (Nutrient Agar OXOID ou eventualmente Nutrient Agar DIFCO).

Caldo nutriente (Nutrient Broth OXOID).

Caldo nutriente-triptona dextrose (caldo nutriente acrescido de triptona 0,8% e dextrose 1,5%).

2.4. Curva de crescimento

O crescimento bacteriano foi medido quantitativamente pelo método da contagem de células (unidades formadoras de colônias) em placas. Foi usada como linhagem padrão, a amostra "OXFORD 1203" (ATCC9144).

Inóculos constituídos de 0,1 ml de uma cultura de 18 - 24 horas, diluída 10^4 vezes, foram incubados, sem agitação, a 37°C em tubos contendo 10 ml de caldo nutriente. Aliquotas foram retiradas nas horas 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50 e 60 e, após diluição conveniente, semeadas em ágar nutriente. Após incubação por 24 horas a 37°C , foi feita a contagem das colônias.

2.5. Determinação dos níveis de resistência

Os níveis de resistência foram determinados pelo método da diluição em placas, usando-se concentrações crescentes das drogas.

As placas foram preparadas no dia do uso, nelas vertendo-se quantidade adequada de meio de cultura (ágar nutriente) mantido a $45 - 50^{\circ}\text{C}$, acrescido de quantidade adequada da solução de cada droga, para se obter as concentrações finais desejadas, em termos de μg da droga, por ml de meio de cultura. Preparadas e solidificadas, eram as placas conservadas entreabertas em estufa asséptica por aproximadamente 1 (uma) hora para se tornarem perfeitamente secas.

As amostras em estudo foram incubadas a 37°C em caldo nutriente por cerca de 12 horas e inoculadas com alça de níquel-cromo nas placas, sendo que em cada uma eram inoculadas até 17 amostras. Foi utilizada como controle de viabilidade das amostras uma placa contendo apenas o meio de cultura. Os resultados foram anotados após 18 - 24 horas de incubação a 37°C .

Foi considerado como nível de resistência, a concentração da droga imediatamente inferior àquela que impedia o crescimento das amostras.

2.6. Tratamento pelo brometo de etídio

Inóculos constituídos de 0,1 ml de uma cultura de 18 - 24 horas, diluída 10^2 vezes (cerca de 10^5 bactérias), foram incubados a 37°C , com agitação, em frascos com 10 ml de caldo nutriente-triptona dextrose, pH 7,4, contendo 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 $\mu\text{g/ml}$ de brometo de etídio. A cultura que apresentasse turvação correspondente a cerca de 10^8 bactérias/ml, no menor tempo e na maior concentração de brometo de etídio, era diluída convenientemente em salina esterilizada e 0,1 ml da diluição semeada em ágar nutriente. Após incubação por 18-24 horas a 37°C , as colônias desenvolvidas eram transferidas por réplica (*LEDERBERG e LEDERBERG, 1952*) para ágar nutriente acrescido de cada droga em estudo (Hg, TC, CL : 10 $\mu\text{g/ml}$; PC, SM: 20 $\mu\text{g/ml}$). Após incubação por 18 - 24 horas os resultados foram anotados, verificando-se assim a porcentagem de colônias que perderam resistência para cada droga. Um controle foi feito a partir de igual inóculo, incubado no mesmo meio de cultura, porém sem brometo de etídio.

2.7. Isolamento de mutantes com resistência cromossômica à penicilina

O isolamento de mutantes foi feito pela técnica da placa gradiente de *SZYBALSKY e BRYSON (1952)*. Foram feitas cinco transferências para gradientes crescentes.

Colônias que apareceram no último gradiente, foram selecionadas e a seguir determinados os seus níveis de resistência.

2.8. Cálculo da frequência de mutantes resistentes à estreptomicina

Oitenta ml de uma cultura incubada por 18 horas a 37°C, com agitação, foi centrifugada a 7000 rpm (Sorvall Superspeed RC2-B) por 20 minutos, e ressuspensa em 10 ml de salina esterilizada.

Cinco ml da ressuspensão foram semeados (0,2 ml por placa) em ágar nutriente acrescido de estreptomicina (30 µg/ml). O número de colônias desenvolvidas após incubação a 37°C por 48 horas, corresponde ao de bactérias mutantes. O título da ressuspensão foi calculado semeando-se 0,1 ml de uma diluição conveniente em ágar nutriente sem estreptomicina, e contando-se o número de colônias desenvolvidas após incubação por 24 horas a 37°C.

3. RESULTADOS

3.1. Curva de crescimento

O resultado do experimento descrito em 2.4., está na Tabela 2. O Gráfico 1, representa o número de bactérias viáveis, em função do tempo.

A linhagem estudada, nas condições descritas em 2.4., apresenta uma lag-fase de aproximadamente 2,5 horas. Segue-se a fase logarítmica de crescimento que persiste até cerca de 25 horas, seguindo-se a fase estacionária. O tempo de geração é de aproximadamente 69 minutos e foi calculado entre 5 e 20 horas, pela fórmula $N_f = N_i \times 2^n$ (LARPENT e LARPENT-GOURGAUD, 1975, p.72), onde N_f é o número de bactérias na hora 20, N_i o número de bactérias na hora 5, e n o número de gerações (em 15 horas).

Tabela 2. Número médio de bactérias viáveis, por ml de meio de cultura, em diversos tempos. *Staphylococcus aureus* "OXFORD 1203" (ATCC 9144).

Horas	Diluição ^{a/}	Número médio de bactérias por placa ^{b/}	Título (bact./ml)	Redução a uma bactéria
0	S/D	48	$4,8 \times 10^2$	1
2,5	S/D	110,5	$1,1 \times 10^3$	2,3
5,0	10^{-1}	190	$1,9 \times 10^4$	$4,0 \times 10^1$
7,5	10^{-2}	101,5	$1,0 \times 10^5$	$2,1 \times 10^2$
10	10^{-2}	108,5	$1,1 \times 10^5$	$2,3 \times 10^4$
15	10^{-5}	38	$3,8 \times 10^7$	$7,9 \times 10^5$
20	10^{-5}	155,5	$1,6 \times 10^8$	$3,0 \times 10^5$
25	10^{-5}	190,5	$1,9 \times 10^8$	$4,0 \times 10^5$
30	10^{-5}	218,5	$2,2 \times 10^8$	$4,6 \times 10^5$
35	10^{-5}	200,5	$2,0 \times 10^8$	$4,2 \times 10^5$
40	10^{-5}	204	$2,0 \times 10^8$	$4,2 \times 10^5$
50	10^{-5}	205	$2,0 \times 10^8$	$4,2 \times 10^5$
60	10^{-5}	245	$2,4 \times 10^8$	$5,0 \times 10^5$

^{a/} 0,1 ml semeados.

^{b/} Média de três placas.

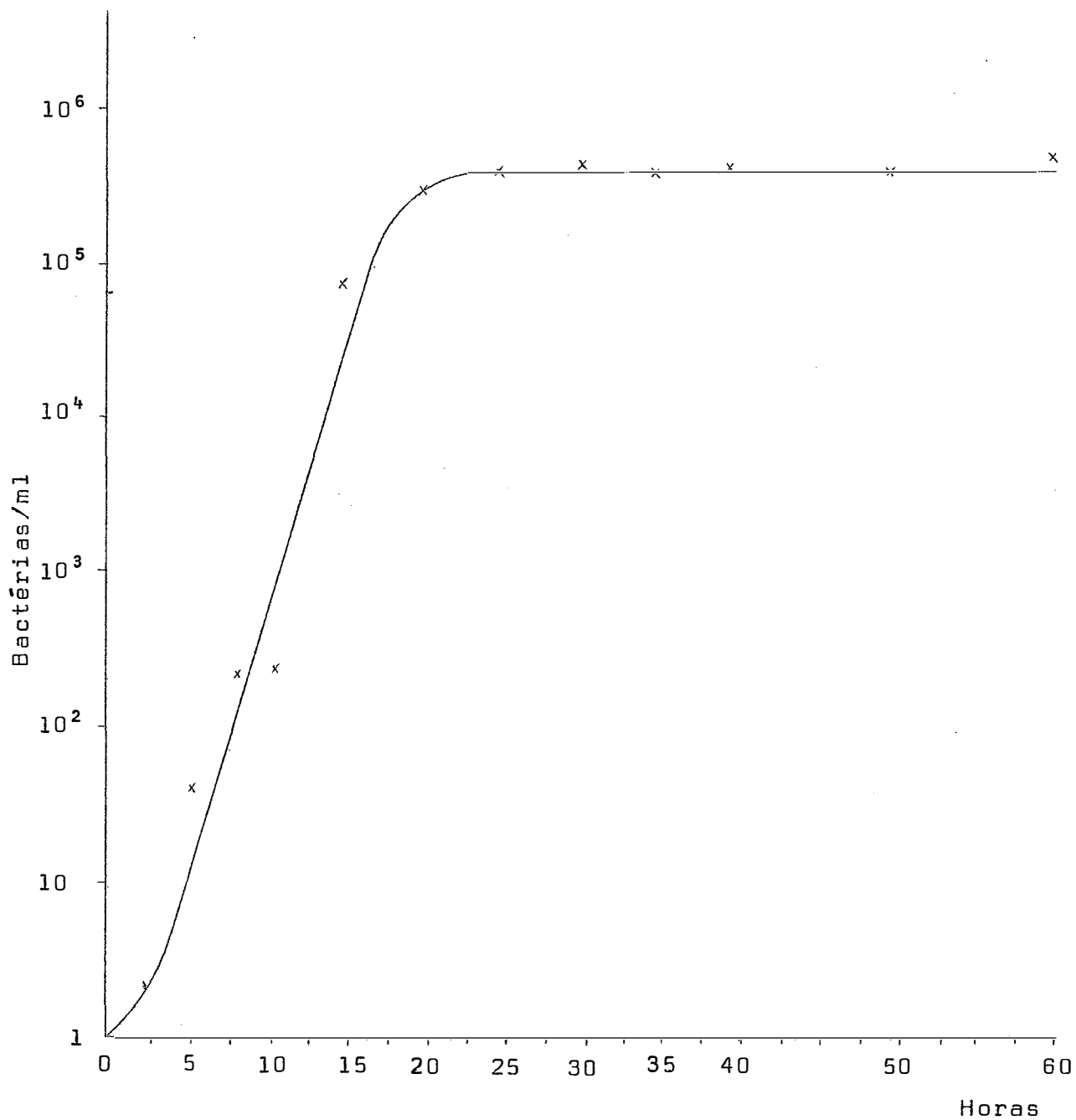


Gráfico 1. Número médio de bactérias viáveis, por ml de meio de cultivo em função do tempo. *Staphylococcus aureus* amostra "OXFORD" 1203 (ATCC 9144).

3.2. Níveis de resistência das amostras originais

As 35 amostras originais, isto é, as provenientes de Ribeirão Preto, foram ensaiadas frente ao bicloreto de mercúrio, penicilina, estreptomicina, tetraciclina e cloranfenicol. O método usado foi o da diluição em placas (conforme 2.5.), usando-se as concentrações 1; 2; 5; 10; 20; 50; 100; 200; 500 e 1000 µg da droga, por ml de meio de cultivo.

Os resultados estão na Tabela 3, e foram lançados em gráficos, um para cada droga (Gráficos 2 - 6), os quais puderam ser divididos em duas regiões: A e B, sendo que em B estariam enquadradas as amostras resistentes, usando-se o critério de *TRABULSI, ZULIANI e TOLEDO (1970)* e de *CHARTONE de SOUZA (1975)*. Na Tabela 4 estão as 26 amostras classificadas como resistentes em função dos Gráficos 2 - 6.

Tabela 3. Níveis de resistência de 35 amostras de *Staphylococcus aureus* expresso em µg da droga, por ml de meio de cultura.

Amostras	D r o g a s				
	Hg	PC	SM	TC	CL
3A1	<1	<1	<1	<1	1
3A11	1	2	2	<1	2
3A21	1	<1	2	<1	5
3A31	1	<1	2	<1	5
3A41	1	<1	1	<1	2
3A2	<1	<1	1	<1	1
3A12	10	100	20	50	2
3A22	1	50	2	<1	2
3A32	1	20	2	<1	2
3A42	2	100	2	<1	2
3A52	1	<1	2	<1	2
3A3	<1	100	1	<1	1
3A13	1	200	50	<1	2
3A23	<1	20	2	<1	2
3A4	<1	<1	2	20	1
3A14	<1	200	100	<1	2
3A24	2	<1	2	20	2
3A5	<1	5	50	<1	20
3A35	1	1	2	<1	5
3A45	1	100	50	100	20

Continua

Tabela 3. Continuação.

Amostras	D r o g a s				
	Hg	PC	SM	TC	CL
3A6	10	100	<1	<1	2
3A7	10	100	20	<1	2
3A8	10	100	20	<1	2
3A18	20	100	50	<1	2
3A28	10	100	50	<1	2
3A38	10	200	100	<1	2
3A9	10	100	20	20	20
3A19	<1	<1	2	<1	2
3A29	10	20	50	20	20
3A10	10	100	1000	20	20
3A20	20	100	50	1	5
3A30	20	100	1000	100	50
3A40	20	100	1000	100	50
3A50	20	100	50	100	20
3A60	1	50	50	100	20

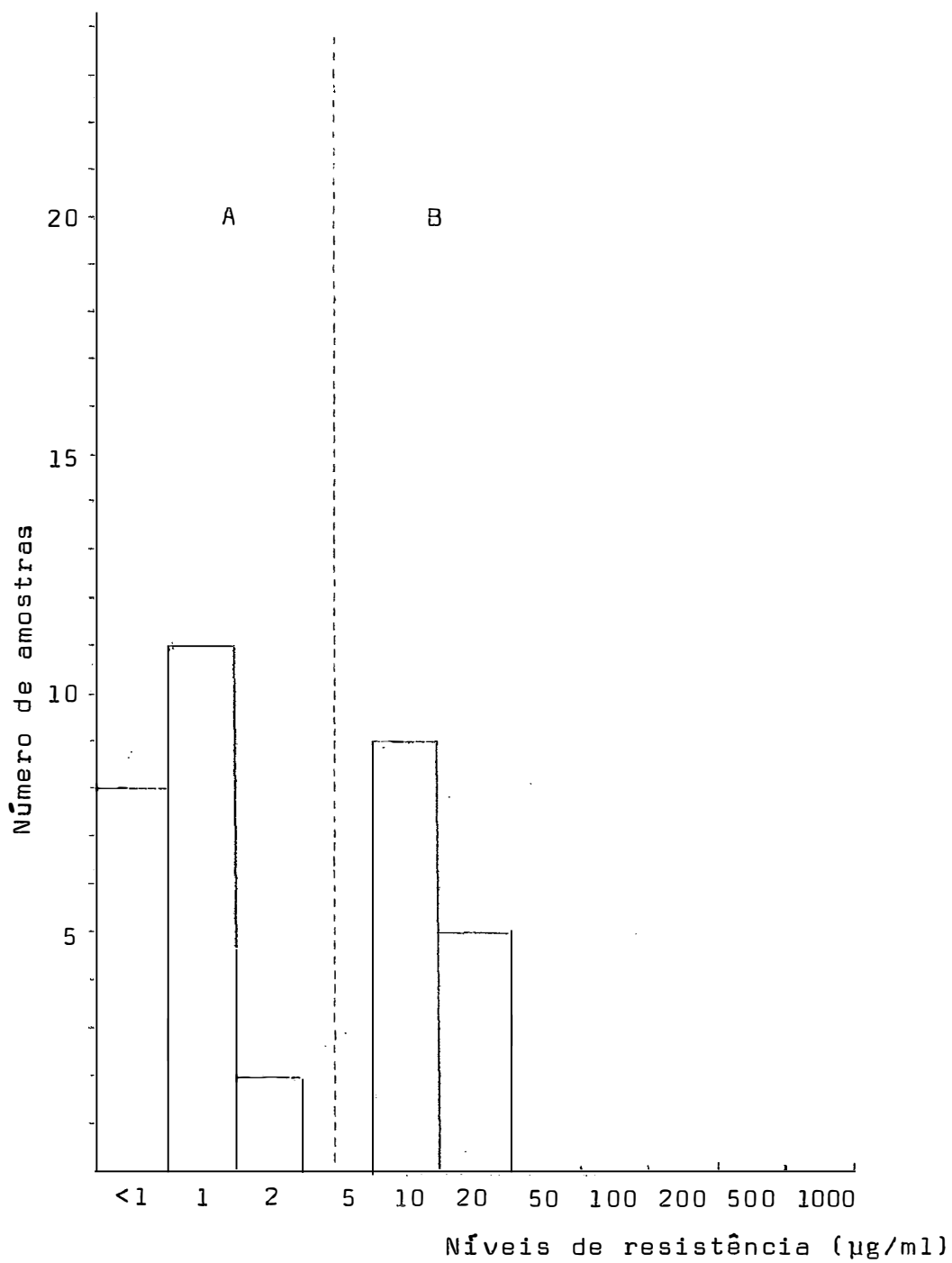


Gráfico 2. Distribuição dos níveis de resistência de 35 amostras de *Staphylococcus aureus*, frente ao bicloreto de mercúrio.

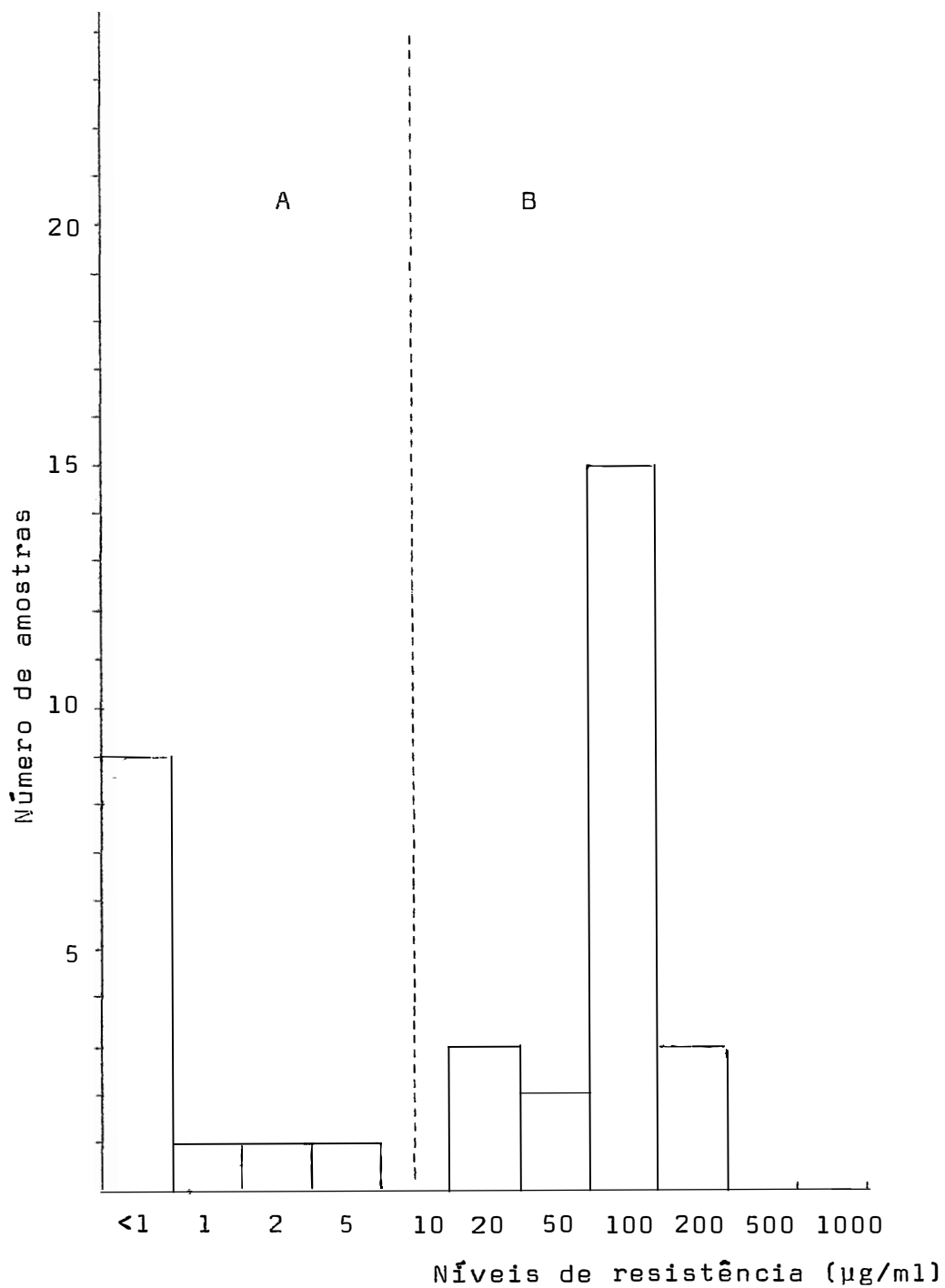


Gráfico 3. Distribuição dos níveis de resistência de 35 amostras de *Staphylococcus aureus*, frente a penicilina.

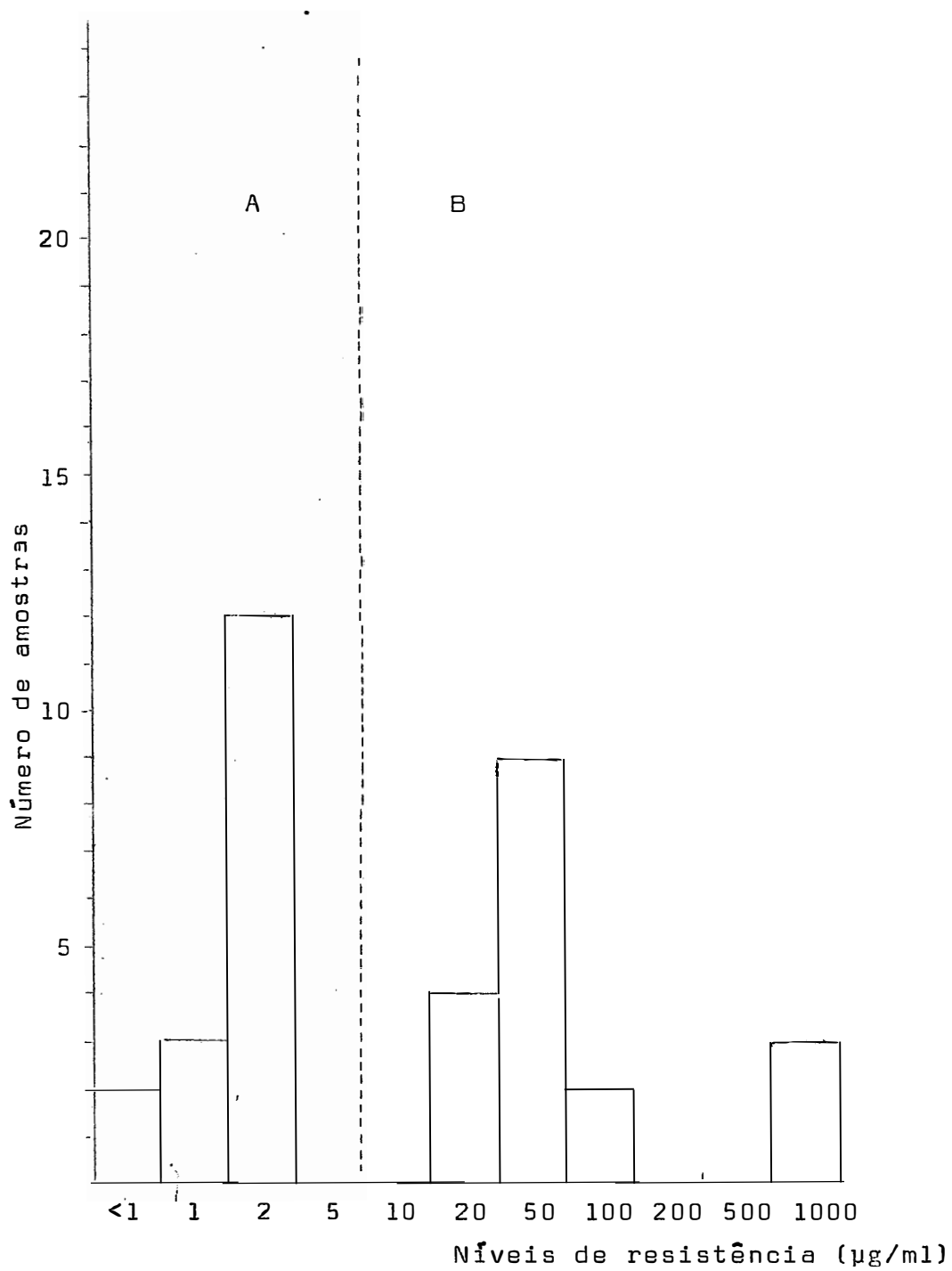


Gráfico 4. Distribuição dos níveis de resistência de 35 amostras de *Staphylococcus aureus*, frente a estreptomicina.

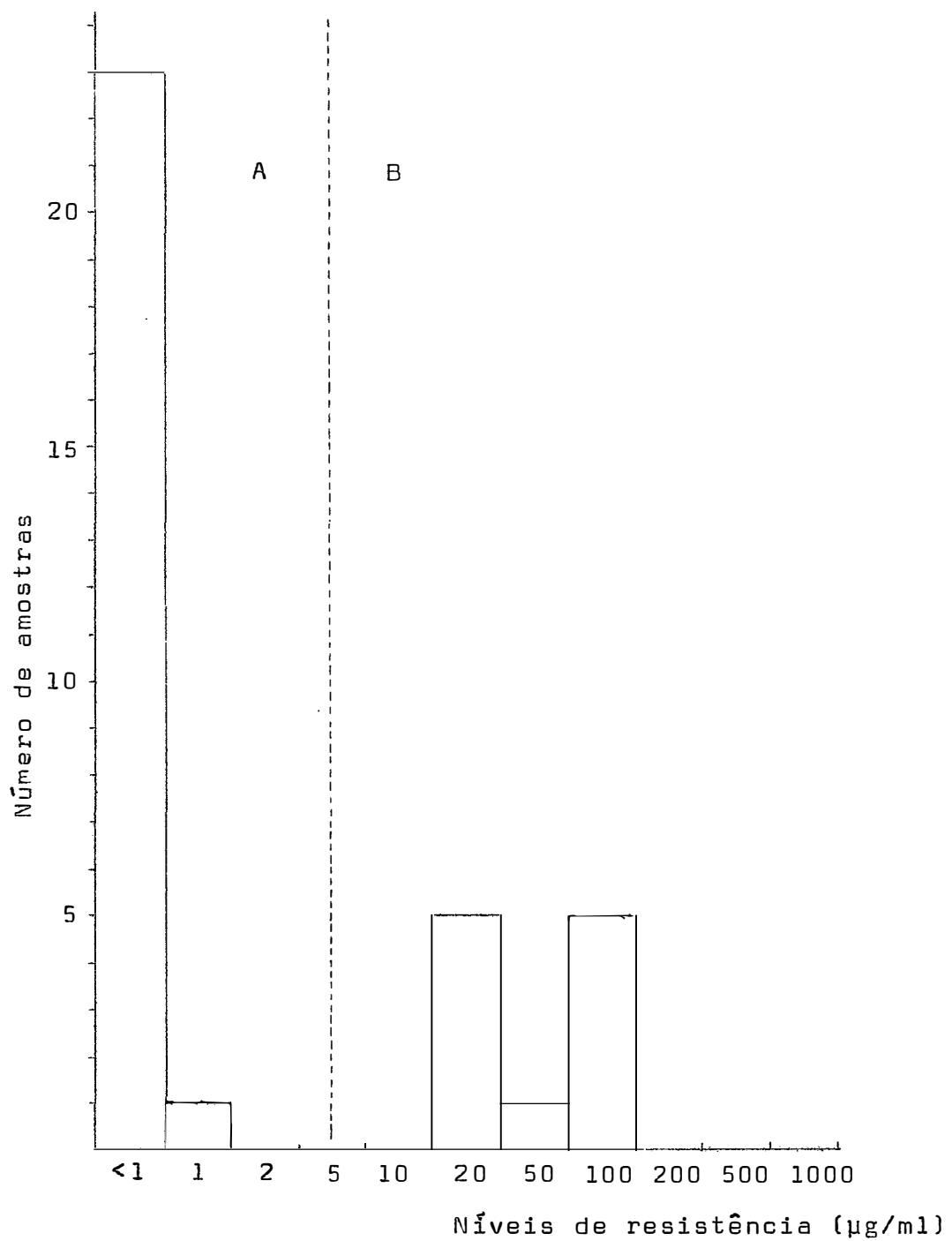


Gráfico 5. Distribuição dos níveis de resistência de 35 amostras de *Staphylococcus aureus*, frente a tetraciclina.

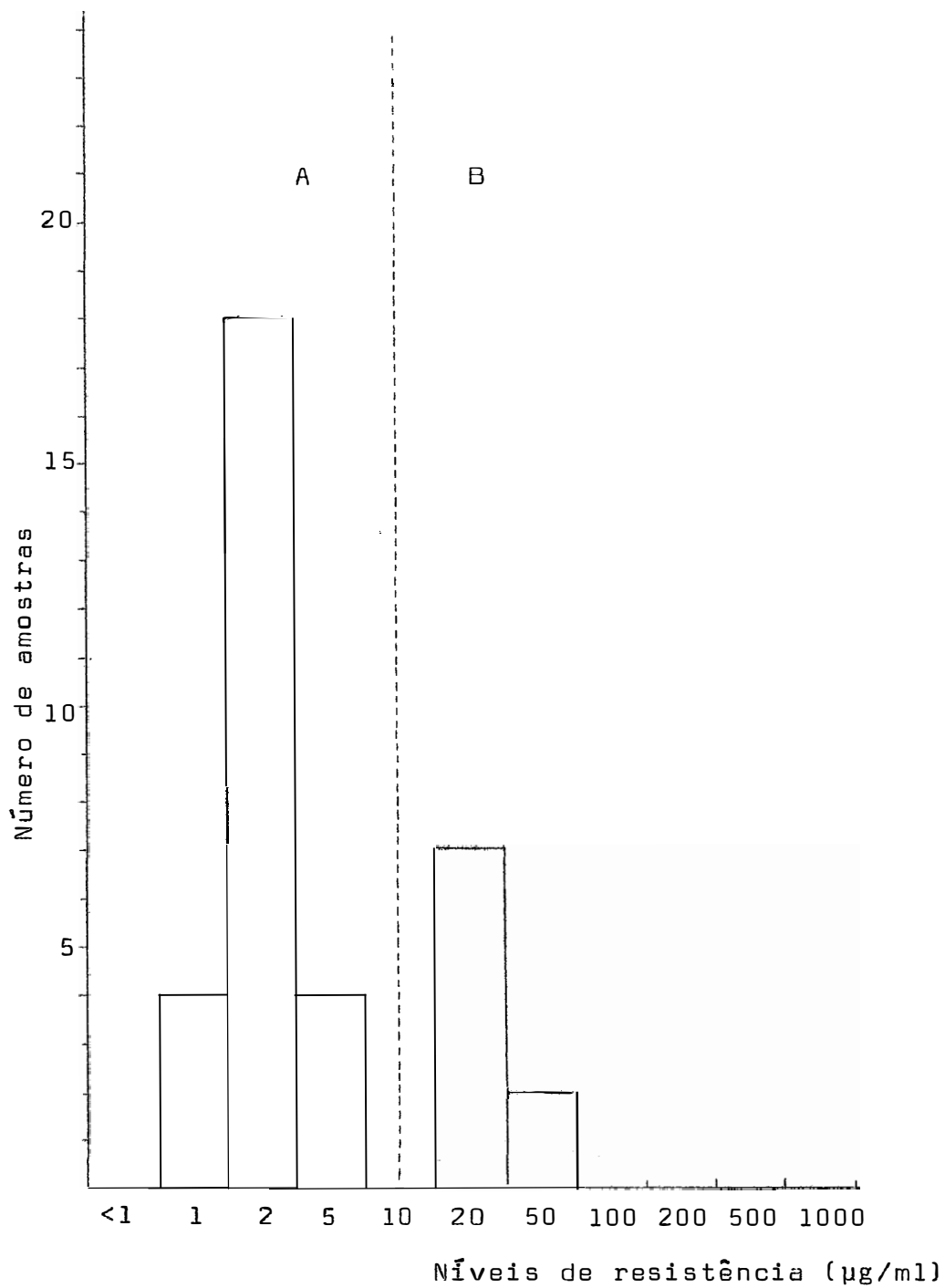


Gráfico 6. Distribuição dos níveis de resistência de 35 amostras de *Staphylococcus aureus*, frente ao cloranfenicol.

Tabela 4. Modelos de resistência de 26 amostras de *Staphylococcus aureus*, frente a cinco drogas.

Amostras	Modelos de resistência
3A12	Hg PC SM TC
3A22	PC
3A32	PC
3A42	PC
3A3	PC
3A13	PC SM
3A23	PC
3A4	TC
3A14	PC SM
3A24	TC
3A5	SM CL
3A45	PC SM TC CL
3A6	Hg PC
3A7	Hg PC SM
3A8	Hg PC SM
3A18	Hg PC SM
3A28	Hg PC SM
3A38	Hg PC SM
3A9	Hg PC SM TC CL
3A29	Hg PC SM TC CL
3A10	Hg PC SM TC CL
3A20	Hg PC SM
3A30	Hg PC SM TC CL
3A40	Hg PC SM TC CL
3A50	Hg PC SM TC CL
3A60	PC SM TC CL

3.3. Tratamento pelo brometo de etídio

As amostras submetidas ao brometo de etídio e respectivas condições de tratamento são apresentadas na Tabela 5.

Nas Tabelas 6 - 9 estão as frequências de eliminação de cada marca estudada.

Tabela 5. Amostras de *Staphylococcus aureus* submetidas ao brometo de etídio e respectivas condições de tratamento.

Amostras	T r a t a m e n t o	
	Brometo de etídio ($\mu\text{g/ml}$)	Incubação (horas)
3A22	3,0	16
3A32	2,5	18
3A42	2,5	20
3A3	3,0	15
3A23	2,5	20
3A13	4,0	24
3A4	4,0	23
3A14	3,0	12
3A24	4,0	19
3A5	4,0	21
3A45	3,0	24
3A60	3,0	24
3A12	3,5	22
3A6	3,0	18
3A7	3,0	15
3A8	4,0	18
3A18	4,0	18
3A28	4,0	18
3A38	4,0	18
3A9	3,0	18
3A29	2,5	24
3A10	2,5	24
3A20	3,0	15
3A30	2,5	24
3A40	3,0	18
3A50	2,5	18

Tabela 6. Eliminação de resistência a penicilina e ao bicloreto de mercúrio, em amostras de *Staphylococcus aureus*, pelo brometo de etídio.

Amostras	Número de colônias ensaiadas	% de eliminação	
		Hg	PC
3A22	338 ^a / 157		1,48 ^a / 0,00
3A32	100 200		1,00 0,00
3A42	200 180		2,00 1,10
3A3	125 350		1,60 0,00
3A13	203 153		93,60 0,00
3A23	150 240		4,60 0,00
3A14	369 293		0,54 0,34
3A45	242 252		77,30 0,00
3A60	360 54		0,00 0,00
3A12	202 225	38,10 0,00	38,10 0,00
3A6	115 87	22,60 0,00	22,60 0,00

continua

Tabela 6. Continuação.

Amostras	Número de colônias ensaiadas	% de eliminação	
		Hg	PC
3A7	334	0,30	0,60
	240	0,00	0,00
3A8	172	2,32	2,32
	330	0,00	0,00
3A18	230	0,00	0,00
	155	0,00	0,00
3A28	141	0,00	0,00
	391	0,00	0,00
3A38	300	0,33	0,33
	211	0,00	0,00
3A9	132	0,76	0,76
	158	0,00	0,00
3A29	219	4,56	4,56
	240	0,00	0,00
3A10	782	55,70	56,80
	429	0,00	0,00
3A20	177	48,00	48,00
	246	0,00	0,00
3A30	75	20,00	14,66
	287	0,00	0,00
3A40	138	2,90	2,90
	147	0,00	0,00
3A50	74	13,50	13,50
	182	0,00	0,00

a/ O número superior refere-se ao tratamento pelo brometo de etídio; o inferior ao controle.

Tabela 7. Eliminação de resistência a estreptomicina, em amostras de *Staphylococcus aureus*, pelo brometo de etídio.

Amostras	Número de colônias ensaiadas	% de eliminação
3A13	203 ^{a/} 153	0,00 ^{a/} 0,00
3A14	369 293	4,00 1,70
3A5	400 810	6,25 2,70
3A45	242 252	0,41 0,00
3A60	360 54	0,00 0,00
3A12	202 225	0,00 0,00
3A7	334 240	0,00 0,00
3A8	172 330	0,00 0,00
3A18	230 155	0,00 0,00
3A28	141 391	0,00 0,00
3A38	300 211	0,00 0,00

Continua

Tabela 7. Continuação.

Amostras	Número de colônias ensaiadas	% de eliminação
3A9	132	0,00
	158	0,00
3A29	219	0,45
	240	0,00
3A10	782	0,00
	429	0,00
3A20	177	0,00
	246	0,00
3A30	75	4,00
	287	0,00
3A40	138	0,00
	147	0,00
3A50	74	0,00
	182	0,00

a/ O número superior refere-se ao tratamento pelo brometo de etídio; o inferior ao controle.

Tabela 8. Eliminação de resistência a tetraciclina, em amostras de *Staphylococcus aureus*, pelo brometo de etídio.

Amostras	Número de colônias ensaiadas	% de eliminação
3A4	490 ^{a/}	0,00 ^{a/}
	710	0,00
3A24	630	3,17
	620	3,39
3A45	242	0,41
	252	0,00
3A60	360	0,00
	54	0,00
3A12	202	0,00
	225	0,00
3A9	132	0,00
	158	0,00
3A29	219	0,45
	240	0,00
3A10	782	0,00
	429	0,00
3A30	75	1,33
	287	0,00
3A40	138	0,00
	147	0,00
3A50	74	0,00
	182	0,00

^{a/} O número superior refere-se ao tratamento pelo brometo de etídio; o inferior ao controle.

Tabela 9. Eliminação de resistência ao cloranfenicol, em amostras de *Staphylococcus aureus*, pelo brometo de etídio.

Amostras	Número de colônias ensaiadas	% de eliminação
3A5	400 ^{a/} 810	0,00 ^{a/} 0,00
3A45	242 252	1,23 0,00
3A60	360 54	0,00 0,00
3A9	132 158	0,00 0,00
3A29	219 240	0,90 0,00
3A10	782 429	0,00 0,00
3A30	75 287	0,00 0,00
3A40	138 147	0,00 0,00
3A50	74 182	0,00 0,00

^{a/} O número superior refere-se ao tratamento pelo brometo de etídio; o inferior ao controle.

3.4. Determinação dos níveis de resistência das amostras derivadas

Amostras derivadas são aquelas selecionadas das originais após tratamento pelo brometo de etídio, e que tiveram eliminada alguma marca para resistência. Tais amostras são indicadas por BE; assim, a amostra 3A6BE1, foi selecionada a partir da 3A6.

Determinaram-se os níveis de resistência de 21 amostras derivadas, frente à penicilina e frente a estreptomicina, tetraciclina e cloranfenicol, quando foi o caso.

O método usado foi o da diluição em placas (conorme 2.5.), usando-se as concentrações 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10 e 20 μ g da droga, por ml de cultivo.

Os resultados estão na Tabela 10, na qual são também apresentados, quando necessários, os níveis de resistência das amostras originais correspondentes e já anteriormente determinados (conforme 3.2.).

Tabela 10. Níveis de resistência de 21 amostras derivadas de *Staphylococcus aureus* e originais correspondentes, frente a algumas drogas.

A m o s t r a s	D r o g a s			
	PC	SM	TC	CL
3A12	100			
3A12BE2 (Hg PC) ^{a/}	0,02			
3A22	50			
3A22BE1 (PC)	10			
3A42	100			
3A42BE1 (PC)	0,02			
3A13	200			
3A13BE1 (PC)	0,02			
3A23	20			
3A23BE1 (PC)	0,1			
3A14		100		
3A14BE1 (SM)		2		
3A45	100		100	20
3A45BE7 (PC TC)	-		0,2	
3A45BE9 (CL)				2
3A45BE10 (PC)	0,02			
3A6	100			
3A6BE1 (Hg PC)	0,02			
3A8	100			
3A8BE1 (Hg PC)	0,02			
3A38	200			
3A38BE1 (Hg PC)	0,02			
3A9	100			
3A9BE1 (Hg PC)	10			
3A29	20			20
3A29BE1 (Hg PC)	0,02			
3A29BE4 (CL)				2

Continua

Tabela 10. Continuação.

A m o s t r a s	D r o g a s			
	PC	SM	TC	CL
3A10	100			
3A10BE2 (Hg PC)	10			
3A20	100			
3A20BE1 (Hg PC)	0,02			
3A30	100	1000	100	
3A30BE1 (Hg PC)	0,02			
3A30BE3 (Hg PC SM TC)	-	2	0,2	
3A40	100			
3A40BE1 (Hg PC)	0,02			
3A50	100			
3A50BE1 (Hg PC)	0,02			

^{a/} Entre parênteses, estão indicadas as marcas eliminadas.

3.5. Determinação dos níveis de resistência frente à eritromicina e ao nitrato de cádmio

Determinaram-se os níveis de resistência em 16 amostras derivadas que perderam resistência à penicilina e nas originais correspondentes, tendo-se como objetivo uma tentativa de classificação dos plasmídios *PCase*, já que eles podem ainda conter genes para resistência às drogas mencionadas no título.

O método usado foi o da diluição em placas (conforme 2.5.), usando-se as concentrações 1; 2; 5; 10; 20; 50; 100; 200; 500 e 1000 µg da droga, por ml de meio de cultivo. Os resultados estão na Tabela 11.

Tabela 11. Níveis de resistência de 32 amostras de *Staphylococcus aureus* frente à eritromicina e ao nitrato de cádmio.

Amostras	D r o g a s	
	EM	Cd
3A12	1	100
3A12BE2	1	<1
3A22	1	10
3A22BE1	1	10
3A42	1	100
3A42BE1	1	10
3A13	1	100
3A13BE1	1	10
3A23	1	10
3A23BE1	1	10
3A45	1	100
3A45BE10	1	<1
3A6	1	100
3A6BE1	1	<1
3A8	50	100
3A8BE1	50	<1
3A38	50	100
3A38BE1	50	<1
3A9	1	100
3A9BE1	1	20
3A29	1	100
3A29BE1	1	20
3A10	1	100
3A10BE2	1	20
3A20	1	100
3A20BE1	1	<1
3A30	1	100
3A30BE1	1	<1
3A40	1	100
3A40BE1	1	<1
3A50	1	100
3A50BE1	1	<1

3.6. Isolamento de mutantes com resistência cromossômica à penicilina

Tal isolamento foi realizado com a finalidade de se obterem linhagens controles para o experimento descrito em 2.8., ou seja, linhagens não portadoras de plasmídeo *PCase*, mas resistentes a penicilina.

Para a linhagem 3A6BE1, foram utilizados os seguintes gradientes:

0 - 0,1 µg de PC/ml de meio de cultivo	
0 - 0,2	"
0 - 0,5	"
0 - 1,0	"
0 - 10,0	"

Para a linhagem 3A42BE1, foram utilizados os seguintes gradientes:

0 - 0,1 µg de PC/ml de meio de cultivo	
0 - 0,2	"
0 - 1,0	"
0 - 5,0	"
0 - 10,0	"

Da linhagem 3A6BE1, foi selecionada a 3A6BE1PC5, resistente a 5 µg/ml de penicilina, e da 3A42BE1, a 3A42BE1PC2, resistente a 2 µg/ml de penicilina.

3.7. Frequência de mutantes resistentes à estreptomicina

A frequência de mutantes resistentes à estreptomicina (mutação espontânea) foi calculada nas amostras 3A6,

3A6BE1, 3A6BE1PC5, 3A42, 3A42BE1 e 3A42BE1PC2 (conforme 2.8.).

Os resultados encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12. Frequência de mutantes resistentes à estreptomicina em 6 linhagens de *Staphylococcus aureus* (média de 2 experimentos).

A m o s t r a s	Mutantes/10 ¹⁰ bactérias
3A6	8,8
3A6BE1	5,4
3A6BE1PC5	5,3
3A42	10,3
3A42BE1	6,0
3A42BE1PC2	5,0

As linhagens portadoras de plasmídeo apresentaram, em média, uma frequência de mutantes 1,8 vezes maior do que as linhagens não portadoras.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

4.1. Dos níveis de resistência

Pelos dados da Tabela 10 tem-se que, com relação a penicilina, das 16 amostras derivadas ensaiadas, 12 apresentaram como nível de resistência 0,02 µg/ml. Nas demais os níveis foram 0,1 ou 10 µg/ml. Pode-se então admitir que nas amostras 3A12, 3A13, 3A42, 3A45, 3A6, 3A8, 3A38, 3A29, 3A20, 3A30, 3A40 e 3A50, a resistência à penicilina deve ser apenas plasmidial, e que as amostras 3A22, 3A23, 3A9 e 3A10, além de serem portadoras de plasmídio para resistência à penicilina, devem também serem portadoras de gene(s) cromossômico(s) para o mesmo caráter.

Com relação aos demais antibióticos, as amostras derivadas ensaiadas apresentaram como níveis de resistên

cia 2 µg/ml (SM); 0,2 µg/ml (TC) e 2 µg/ml (CL).

Com base nesses resultados, poder-se-ia sugerir que amostras de *S. aureus* consideradas sensíveis à penicilina, estreptomicina, tetraciclina e cloranfenicol, teriam uma resistência natural da ordem de 0,02; 2; 0,2; e 2 µg/ml, respectivamente. De fato, OTAYA (1974) determinou as concentrações mínimas inibitórias (CMI) para penicilina, estreptomicina, tetraciclina e cloranfenicol na linhagem 209P (ATCC6538), considerada sensível àquelas drogas, encontrando os valores 0,05; 3,13; 0,2 e 3,13 µg/ml respectivamente, sendo que pequenas variações foram observadas e atribuídas a diferenças nas condições experimentais; quando da análise da distribuição gráfica das CMIs médias (medianas) de amostras consideradas sensíveis, os valores encontrados foram 0,05; 3,13; 0,39 e 6,25 µg/ml, respectivamente. IORDĂNESCU (1975), analisando a estera 8325, considerada sensível à estreptomicina e ao cloranfenicol, determinou que era 2,5 µg/ml a CMI para ambos antibióticos.

TRABULSI, ZULIANI e TOLEDO (1970) quando da análise de 330 amostras de *Shigella* e CHARTONE DE SOUZA (1975) com 100 amostras de *Escherichia coli*, verificaram que os níveis de resistência para algumas drogas, quando representadas graficamente, apresentavam uma distribuição de frequência aproximadamente bimodal, sendo que à direita da anti-moda localizavam-se as amostras resistentes e à esquerda as amostras sensíveis. Convém salientar que, nos dois trabalhos, o método usado para a determinação dos níveis de resistência foi também o da diluição em placas, e as concentrações usadas foram aquelas aqui também adotadas.

Para as amostras aqui utilizadas, as representações gráficas dos níveis de resistência, pelo menos para a estreptomicina, tetraciclina e cloranfenicol (Gráfico 4-6), evidenciaram realmente duas populações: uma resistente e ou-

tra sensível, embora isso não reflita uma situação natural, já que tais amostras são tendenciosas, ou seja, utilizaram-se amostras adrede escolhidas para este trabalho. No caso particular da penicilina, à esquerda da antimoda estariam localizadas não só as amostras sensíveis como também as amostras com resistência cromossômica em vários níveis, já que amostras com níveis de resistência de 0,1 a 10 µg/ml estão também incluídas a esquerda da antimoda (Gráfico 3).

4.2. Da cura pelo brometo de etídio

Resistência à penicilina foi eliminada numa frequência que variou de 0,33 a 93,6%, sendo que em amostras Hg^R , tal resistência foi co-eliminada.

Tais resultados se diferenciam dos obtidos por *BOUANCHAUD, SCAVIZZI e CHABBERT (1969)*, pelo fato de que os referidos autores não obtiveram eliminação de resistência à penicilina em amostras Hg^S , sendo que nas 5 amostras Hg^{RPC^R} por eles estudadas, essas resistências foram sempre co-eliminadas numa frequência que variou de 8 a 100%. Em duas das amostras Hg^{RPC^R} aqui estudadas não se obteve nenhuma eliminação e, já que resistência ao mercúrio é sempre referida como plasmidial (*RICHMOND e JOHN, 1964; NOVICK e ROTH, 1968*), tais resultados indicam apenas a ineficiência do brometo de etídio nessas amostras. *RUBIN e ROSEMBLUM (1971)* obtiveram eliminação de resistência à penicilina pelo brometo de etídio, numa frequência que variou de 0,21 a 58%, salientando ainda que essas variações devem ser dependentes das linhagens estudadas, razão pela qual irrelevantes seriam o cotejo dos dados aqui apresentados e os obtidos por outros autores, no que se refere a frequência de eliminação. De fato, pelo menos com referência aos fagótipos, as linhagens estudadas diferem entre si (Tabela 1). Neste particular, interessantes seriam estudos

tentando correlacionar fagótipo e ação do brometo de etídio, bem como outros agentes de cura.

De qualquer forma, admite-se as amostras 3A22, 3A32, 3A42, 3A3, 3A13, 3A23, 3A14 e 3A45 como portadoras de genes plasmidiais para resistência a penicilina; e as demais resistentes a PC, com exceção das 3A18 e 3A28, como portadoras de genes para resistência a penicilina e bicloreto de mercúrio localizadas num mesmo plasmídio.

Resistência à estreptomicina foi eliminada nas amostras 3A14, 3A5, 3A45, 3A29 e 3A30; à tetraciclina nas amostras 3A24, 3A45, 3A29 e 3A30 e ao cloranfenicol nas 3A45 e 3A29. Apesar das eliminações terem ocorrido em frequência relativamente baixa, pode-se admitir como plasmidiais as marcas genéticas envolvidas, embora em distintos plasmídios, não tanto pela ausência de co-eliminação mas, principalmente, pelos dados da literatura. Nas amostras onde as referidas resistências não foram eliminadas, a considerá-las cromossômicas, preferimos apenas concluir que o brometo de etídio não agiu sobre aqueles determinantes genéticos.

De qualquer forma, foi evidenciado pelo brometo de etídio, plasmídios para resistência à estreptomicina e tetraciclina, o que já havia sido feito anteriormente apenas por *GRUBB e O'REILLY (1971)*, em somente uma amostra, com frequência variando de 2,7 a 4,8%. Na amostra 3A24, embora plasmídio para resistência à tetraciclina fique evidenciado, o papel do brometo de etídio não deve ser conclusivo, já que eliminação espontânea ocorreu praticamente com a mesma frequência. Foi evidenciado também, da mesma forma, plasmídio para resistência ao cloranfenicol e disto não se tem conhecimento de nenhuma referência.

4.3. Dos plasmídios

É sabido que o plasmídio responsável pela resistência à PC, pode ainda conter genes para resistência ao Cd e à EM, além de outros determinantes genéticos (ver adiante) (RICHMOND, 1968).

Das amostras originais ensaiadas, apenas duas são resistentes à EM, resistência essa que parece ser cromossômica, já que as amostras derivadas correspondentes apresentam o mesmo nível de resistência.

Nas amostras 3A12, 3A42, 3A13, 3A45, 3A6, 3A8, 3A38, 3A9, 3A29, 3A10, 3A20, 3A30, 3A40 e 3A50, o determinante genético para resistência ao Cd deve estar localizado no mesmo plasmídio que confere resistência à PC, já que nas amostras derivadas correspondentes o nível de resistência é bem inferior. Baseando-se ainda nas diferenças de níveis de resistência, pode ser admitido que nas amostras 3A42, 3A13, 3A9, 3A29 e 3A10, a resistência é plasmidial e cromossômica. Nas amostras 3A22 e 3A23 a resistência seria apenas cromossômica. Resistência ao Cd pode realmente ser cromossômica (K.G.H. DYKE, não publ., apud RICHMOND, 1968).

Os plasmídios responsáveis pela resistência à PC em *S. aureus*, podem ser classificados em 11 tipos (RICHMOND, 1968), baseando-se nas seguintes características: tipo imunológico de penicilinase produzida -A, B ou C- (RICHMOND, 1965); quantidade de penicilinase extracelular, sob condições padrão de cultura; e resistência ou sensibilidade à eritromicina, ao mercúrio (Hg^{++}), ao cádmio (Cd^{++}) e ao arseniato ($HAsO_4^{--}$) (Tabela 13).

Tabela 13. Classificação de plasmídios em *Staphylococcus aureus* (RICHMOND, 1968).

Plasmídio	Penicilinase			Penicilinase extracelular (%)	Reação a			
	A	B	C		EM	Hg ⁺⁺	Cd ⁺⁺	HAsO ₄ ⁻⁻⁻
<i>alfa</i>	+	-	-	>10	S	R	R	R
<i>beta</i>	-	-	+	<10	S	R	R	R
<i>gama</i>	+	-	-	>10	R	R	R	R
<i>delta</i>	-	+	-	>10	S	S	R	R
<i>episilon</i>	+	-	-	>10	S	S	S	S
<i>zeta</i>	-	-	+	>10	S	S	S	S
<i>eta</i>	-	-	+	>10	S	R	S	S
<i>teta</i>	+	-	-	<10	S	R	R	R
<i>iota</i>	+	-	-	<10	S	S	S	S
<i>lambda</i>	+	-	-	>10	S	R	S	S
<i>mu</i>	+	-	-	>10	S	S	R	R

Baseando-se apenas na resistência ou sensibilidade à EM, Hg e Cd, os 11 plasmídios podem ser classificados em 5 grupos conforme Tabela 14.

Os plasmídios detectados pertencem aos grupos 2,4 ou 5 conforme mostra a Tabela 15, na qual é também apresentada a resposta frente ao brometo de etídio em termos de frequência de eliminação (conf. Tabela 6).

Tabela 14. Classificação de plasmídio de *Staphylococcus aureus*, baseada na resistência ou sensibilidade à EM, Hg e Cd.

Grupo	Reação a			P l a s m í d i o
	EM	Hg	Cd	
1	R	R	R	<i>gama</i>
2	S	R	R	<i>alfa</i> ou <i>beta</i> ou <i>teta</i>
3	S	R	S	<i>eta</i> ou <i>lambda</i>
4	S	S	R	<i>delta</i> ou <i>mu</i>
5	S	S	S	<i>episilon</i> ou <i>zeta</i> ou <i>iota</i>

Tabela 15. Classificação de plasmídios de 15 amostras de *Staphylococcus aureus*, baseada na resistência ou sensibilidade à EM, Hg e Cd.

Amos- tra	Reação a			OBS.	Plasmídio (grupo)	% eliminação pelo brometo de etídio
	EM	Hg	Cd			
3A22	S	S	R	Cd ^R cromos.	5	1,48
3A13	S	S	R	-	4	93,60
3A23	S	S	R	Cd ^R cromos.	5	4,60
3A14	S	S	R	-	4	0,54
3A45	S	S	R	-	4	77,30
3A12	S	R	R	-	2	38,10
3A6	S	R	R	-	2	22,60
3A8	R	R	R	EM ^R cromos.	2	2,32
3A38	R	R	R	EM ^R cromos.	2	0,33
3A9	S	R	R	-	2	0,76
3A29	S	R	R	-	2	4,56
3A10	S	R	R	-	2	56,80
3A20	S	R	R	-	2	48,00
3A30	S	R	R	-	2	14,66
3A40	S	R	R	-	2	2,90
3A50	S	R	R	-	2	13,50

O plasmídeo do grupo 5 deve ser o *zeta*, que é sempre acompanhado de Cd^R . Pelos dados obtidos, o plasmídeo *zeta* apresentou baixa frequência de eliminação pelo brometo de etídeo, o mesmo não acontecendo com os plasmídeos do grupo 4, exceção feita a amostra 3A14, onde aliás a ação do brometo de etídeo não ficou clara, já que houve 0,34% de eliminação espontânea. Dos onze plasmídeos do grupo 2, seis apresentaram alta frequência de eliminação e as diferenças a esse respeito dentro deste grupo, talvez sejam devido ao tipo de plasmídeo em si, que pode ser *alfa*, *beta* ou *teta*. Curiosamente, à exceção do plasmídeo da amostra 3A40, os plasmídeos do grupo 2 que apresentam baixa frequência de eliminação pelo brometo de etídeo são acompanhados de resistência cromossômica à EM ou ao Cd.

4.4. Da instabilidade de amostras portadoras de plasmídeos

Em enterobactérias, é sabido que linhagens portadoras de certos plasmídeos, quando comparadas com não portadoras, além de apresentarem menor susceptibilidade aos efeitos letais da luz ultravioleta, apresentam uma maior susceptibilidade aos seus efeitos mutagênicos.

A primeira referência neste sentido, é de HOWARTH (1966) que mostrou através da frequência de reversão para prototrofia de mutantes auxotróficos, que em linhagens de *Salmonella typhimurium*, portadoras do plasmídeo Col^I (fator colicinogênico, produtor de colicina I), o efeito mutagênico da luz ultravioleta é aumentado em relação a linhagem Col^- (não portadora do plasmídeo).

O mesmo foi observado por MAC PHEE (1973) em *Salmonella typhimurium* portadora de um plasmídeo R (fator R Utrecht) responsável pela resistência à penicilina, tetraci-

clina e sulfonamidas.

MORTELMANS e STOCKER (1974), verificaram que uma linhagem de *Escherichia coli*, auxotrófica para histidina, portadora de um plasmídeo R, quando comparada com a linhagem não portadora, apresentava uma maior frequência de mutações reversas para prototrofia, não só induzidas por ultravioleta, como também espontâneas.

É sugerido que esses plasmídios especifiquem uma DNA polimerase mais propensa a causar erros por troca de bases, do que a enzima normal. Essa enzima seria usada particularmente no reparo de danos causados pela ultravioleta, razão pela qual linhagens portadoras desses plasmídios são mais resistentes aos efeitos letais dessa radiação.

Em amostras de *S. aureus* isoladas em nosso meio, SOLÉ-VERNIN e UTHIDA-TANAKA (1969) notaram comportamento diferente entre amostras resistentes ao íon mercúrico, e portanto portadoras de plasmídeo, e amostras a ele sensíveis, ou seja, "indicação de acentuada instabilidade fisiológica genotípica das amostras Hg^R em relação as Hg^S , por apresentarem comportamento consistente com a hipótese de uma maior taxa de mutação para resistência aos antibióticos". Cotejando tais resultados com os aqui obtidos, pode-se sugerir que o gene para resistência ao íon mercúrico, tenha seu significado biológico na instabilidade de amostras de *S. aureus*, não "per se", mas pelo plasmídeo que o contenha.

Considerar tais resultados definitivos, seria temerário, razão pela qual necessário se faz estudar outras amostras, portadoras de outros plasmídios, em relação a mutação para outras marcas, não só mutação espontânea como também induzida.

5. RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo verificar a natureza cromossômica ou plasmidial de algumas marcas genéticas para resistência a drogas em *Staphylococcus aureus* em nosso meio e avaliar o possível significado biológico da resistência ao íon mercúrico na instabilidade mostrada por algumas amostras, com relação a resistência a drogas.

Trinta e cinco amostras de *S. aureus* foram utilizadas. Seus níveis de resistência foram determinados pelo método da diluição em placas, frente ao bicloreto de mercúrio, à penicilina, à estreptomina, à tetraciclina e ao cloranfenicol. As amostras resistentes foram tratadas pelo brometo de etídio para se verificar a natureza genética da resistência. Também foi feita uma análise da frequência de mutantes em amostras com e sem plasmídeo, um dos quais continha gene para

resistência ao íon mercúrico.

Os resultados obtidos indicaram que:

- a) Os níveis de resistência foram concordantes com os obtidos por outros autores, com os quais foram comparados, e possibilitaram a discriminação das amostras em resistentes ou sensíveis, a cada droga estudada.
- b) O brometo de etídio pode realmente ser usado sistematicamente como um indicador da localização plasmidial de determinadas marcas genéticas; das amostras a ele submetidas, resistência à penicilina foi eliminada em dezoito, sendo que nas Hg^R , tal resistência foi co-eliminada. Resistência à estreptomicina foi eliminada em cinco amostras, à tetraciclina em três e ao cloranfenicol em duas, e tais resultados são importantes pela escassez de dados a respeito na literatura consultada.
- c) Os plasmídios *PCase* detectados, puderam ser classificados em três grupos, baseando-se na resistência ou sensibilidade da amostra portadora, à eritromicina, bicloreto de mercurio e nitrato de cádmio.
- d) As amostras portadoras de plasmídio apresentaram uma freqüência de mutantes resistentes à estreptomicina 1,8 vezes maior do que amostras não portadoras, independente da reação frente ao íon mercúrico, sendo sugerido que o gene para Hg^R talvez tenha seu signi-

ficado biológico na instabilidade de amostras de *S. aureus*, não "*per se*" mas, pelo plasmídeo que o contenha.

6. SUMMARY

The present work was aimed to study the chromosomic or plasmidial nature of some genetic markers for resistance to drugs in *Staphylococcus aureus*, isolated in Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brazil. It was evaluated also the possible biological significance of the resistance to mercury, regarding the instability shown by some samples, in relation to drug resistance.

Thirty five samples of *S. aureus* were used. Their resistance levels were determined through the method of plating dilution against mercuric bichlorid, penicillin, streptomycin, tetracycline and chloramphenicol. Resistant samples were treated with ethidium bromide in order to assess the genetic nature of the resistance. Also an analysis of the frequency of mutants in samples with and

without plasmids was carried out.

The obtained results have shown that:

- a) The levels of resistance have agreed with the obtained by other authors, and permitted the classification of the samples in resistance or susceptible to each studied drug.
- b) Ethidium bromide can be used systematically as an indicator of the plasmidial localization of some genetic markers. Treatment with ethidium bromide eliminated penicillin resistance in 18 samples and in samples Hg^R such resistance was co-eliminated. Resistance to streptomycin was eliminated in 5 samples, to tetracycline in 3 samples and to chloramphenicol in 2 samples. These results are important due to the lack of data related to such elimination in the literature.
- c) Plasmids *PCase* studied could be classified in three groups, with basis in the resistance or sensibility to erythromycin, mercuric bichlorid and cadmiun nitrate.
- d) Samples with plasmid presented a frequency of resistant mutants to streptomycin 1,8 times superior when compared to samples with no plasmid, independently of the mercury marker. It is suggested that the gene for resistance to mercury has its biological significance in the instability

of *S. aureus* samples not "*per se*" but due to the plasmid itself.

7. BIBLIOGRAFIA

ALTENBERN, R.A. 1967. Evidence that two major replicons comprise the genome of *Staphylococcus aureus*. Biochemical and Biophysical Research Communications 29:799-807.

ANNEAR, D.I. e W.B. GRUBB. 1972. Linked and unstable resistance to kanamycin and penicillin, and diffusible pigment production in an isolate of *Staphylococcus aureus*. Journal of Medical Microbiology 5:109-111 (Apud LACEY, 1975).

ARBER, W. 1960. Transduction of chromosomal genes and episomes in *Escherichia coli*. Virology 11:273-288.

- ASHESHOV, E.H. 1966a. Loss of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* resulting from growth at high temperature. *Journal of General Microbiology* 42:403-410.
- ASHESHOV, E.H. 1966b. Chromosomal location of the genetic elements controlling penicillinase production in a strain of *Staphylococcus aureus*. *Nature* 210:804-806.
- ASHESHOV, E.H. 1969. The genetics of penicillinase production in *Staphylococcus aureus* strain PS80. *Journal of General Microbiology* 59:289-301.
- ASHESHOV, E.H. 1975. The genetics of tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Microbiology* 88:132-140.
- AYLIFFE, G.A.J. 1970. Stability of neomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Pathology* 23:195-201 (Apud LACEY, 1975).
- BARBER, M. 1949. The incidence of penicillin sensitive variant colonies in penicillinase producing strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Microbiology* 3:274 (Apud NOVICK e BOUANCHAUD, 1971).
- BARNES, I.J., A. BONDI e K.E. FUSCALDO. 1971. Genetic analysis of lysine auxotrophs of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 105:553-555.
- BARNES, I.J., A. BONDI e A.G. MOAT. 1969. Biochemical characterization of lysine auxotrophs of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 99:169-174.

- BAXTER-GABBARD, K.L. e P.A. PATTEE. 1970. Purine biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. Archiv für Mikrobiologie (Berlin) 71:40-48.
- BOUANCHAUD, D.H., M.R. SCAVIZZI e Y.A. CHABBERT. 1969. Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in Enterobacteria and Staphylococci. Journal of General Microbiology 54:417-425.
- BÜLOW, P. 1971. Staphylococci in Danish hospitals during the last decade: Factors influencing some properties of predominant epidemic strains. Annals of the New York Academy of Sciences 182:21-39.
- CARERE, A. e I. SPADA-SERMONTI. 1964. Nutritional mutations and transduction by ultraviolet inactivated phage in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology 88:226-232.
- CATLIN, B.W. e L.S. CUNNINGHAN. 1958. Studies of extracellular and intracellular bacterial deoxyribonucleic acid. Journal of General Microbiology 19:522-539 (Apud LACEY, 1975).
- CHABBERT, Y.A., J.G. BAUDENS e G.R. GERBAUD. 1964. Variation sous l'influence de l'acriflavine et transduction de la résistance a la kanamycin et au chloramphénicol chez les staphylocoques. Annales de L'Institut Pasteur 107:678-690.
- CHARTONE DE SOUZA, E. 1975. Resistência a drogas e propriedade colicinogênica em *Escherichia coli*. Tese de Mestrado. Univ. Fed. Minas Gerais. Belo Horizonte. 76pp.

CHOPRA, I., P. BENNETT e R.W. LACEY. 1973. A variety of staphylococcal plasmids present as multiple copies. *Journal of General Microbiology* 79:343-345.

FAVA NETO, C. 1975. In Lacaz, C.S. (org.) "Antibióticos". 3.^a ed. São Paulo. Ed. Edgar Blücher Ltda. e Ed. USP. 509pp.

GRINSTED, J. e R.W. LACEY. 1973. Genetic variation of streptomycin-resistance in clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology* 6:351-361 (Apud LACEY, 1975).

GRUBB, W.B. e R.J. O'REILLY. 1971. Joint transduction of separate extra-chromosomal drug resistance determinants in *Staphylococcus aureus* E169. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 42:377-383.

GRUBB, W.B., R.J. O'REILLY e J.W. MAY. 1972. Segregation of co-transduced streptomycin and tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus*. *Genetical Research (Camb.)* 20:43-50.

HARMON, S.A. e J.N. BALDWIN. 1964. Nature of the determinant controlling penicillinase production in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 87 593-597.

HASHIMOTO, H., K. KONO e S. MITSUHASHI. 1964. Elimination of penicillin resistance of *Staphylococcus aureus* by treatment with acriflavine. *Journal of Bacteriology* 88:261-262.

- HOWARTH, S. 1966. Increase in frequency of ultraviolet-induced mutation brought about by the colicine factor, *Col I* in *Salmonella typhimurium*. Mutation Research 3:129-134.
- HUMBERT, R.D. e J.N. BALDWIN. 1963. An analysis of the methionine loci in *Staphylococcus aureus*. Bacteriological Proceedings 63:31 (Apud HARMON e BALDWIN, 1963).
- INUZUKA, N., S. NAKAMURA, M. INUZUKA e M. TOMOEDA. 1969. Specific action of sodium dodecyl sulfate on the sex factor of *Escherichia coli* K-12 Hfr strains. Journal of Bacteriology 100:827-835.
- IORDĂNESCU, S. 1975. Recombinant plasmid obtained from two different compatible staphylococcal plasmids. Journal of Bacteriology 124:597-601.
- JOHNSTON, L.H. e K.G.H. DYKE. 1969. Ethidium bromide resistance, a new marker on the staphylococcal penicillinase plasmid. Journal of Bacteriology 100: 1413-1414.
- JOHNSTON, J.H. e M.H. RICHMOND. 1970. The increased rate of loss of penicillinase plasmids from *Staphylococcus aureus* in the presence of rifampicin. Journal of General Microbiology 60:137-139.
- KASUGA, T., H. HASHIMOTO e S. MITSUHASHI. 1968. Drug resistance of Staphylococci. VII. Genetic determinants responsible for the resistance to tetracycline, streptomycin, sulfanilamide, and penicillin. Journal of Bacteriology 95:1764-1766.

- KASUGA, T. e S. MITSUHASHI. 1968. Drug resistance of Staphylococci. VIII. Genetic properties of resistance to tetracycline in *Staphylococcus aureus* E 169. Japanese Journal of Microbiology 12:269-273 (Apud GRUBB, O'REILLY e MAY, 1972).
- KAYSER, F.H., J. WÜST e P. CORRODI. 1972. Transduction and elimination of resistance determinants in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2:217-223 (Apud LACEY, 1975).
- KIRBY, W.M.M. 1945. Properties of a penicillin inactivator extracted from penicillin-resistance staphylococci. Journal of Clinical Investigation 24:170 (Apud ASHESHOV, 1966a).
- KLOOS, W.E. e P.A. PATTEE. 1965. Transduction analysis of the histidine region in *Staphylococcus aureus*. Journal of General Microbiology 39:195-207.
- LACEY, R.W. 1975. Antibiotic resistance plasmids of *S. aureus*, and their clinical importance. Bacteriological Reviews 39:1-32.
- LACEY, R.W. e I. CHOPRA. 1972. Evidence for mutation to streptomycin resistance in clinical strains of *Staphylococcus aureus*. Journal of General Microbiology 73:175-180.
- LACEY, R.W. e J. GRINSTED. 1972. Linkage of fusidic acid resistance to the penicillinase plasmid in *Staphylococcus aureus*. Journal of General Microbiology 73:501-508.

LARPENT, J.P. e M. LARPENT-GOURGAND. 1975. *Microbiologia Prática*. Ed. Edgar Blücher Ltda. e Ed. USP (tradução). 162pp.

LEDERBERG, J. e E.M. LEDERBERG. 1952. Replic planting and indirect selection of bacterial mutants. *Journal of Bacteriology* 63:399-406.

LINDBERG, M., J.E. SJÖSTRÖM e T. JOHANSSON. 1972. Transformation of chromosomal and plasmid characters in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 109:844-847.

MAC PHEE, D.G. 1973. Effects of an R factor and caffeine on ultraviolet mutability in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research* 18:367-370.

MAY, J.W., R.H. HOUGHTON e C.J. PERRET. 1964. The effect of growth at elevated temperature on some heritable properties of *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Microbiology* 37:157-169.

MITSUHASHI, S., H. HASHIMOTO, M. KONO e M. MORIMURA. 1965. Drug resistance of staphylococci. II. Joint elimination and joint transduction of penicillinase production and resistance to macrolide antibiotics. *Journal of Bacteriology* 89:988-992.

MITSUHASHI, S., M. MORIMURA, K. KONO e H. OSHIMA. 1963. Elimination of drug resistance of *Staphylococcus aureus* by treatment with acriflavine. *Journal of Bacteriology* 86:162-164.

- MOORE, B. 1960. A new screen test and selective medium for the rapid detection of epidemic strains of *Staphylococcus aureus*. Lancet ii:453-458.
- MORTELMANS, K.E. e B.A.D. STOCKER. 1974. Effect of an R factor on susceptibility to the bactericidal action of ultraviolet irradiation and on rates of ultraviolet-induced and spontaneous mutation in *S. typhimurium*. Microbial Genetics Bulletin (Ohio-USA) 36:25-27.
- NOVICK, R.P. 1963. Analysis by transduction of mutations affecting penicillinase formation in *Staphylococcus aureus*. Journal of General Microbiology 33:121-136.
- NOVICK, R.P. 1967. Penicillinase plasmids of *Staphylococcus aureus*. Federation Proceedings 26:29-38.
- NOVICK, R.P. 1969. Extrachromosomal inheritance in bacteria. Bacteriological Reviews 33:210-263.
- NOVICK, R.P. e D. BOUANCHAUD. 1971. Extrachromosomal nature of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. Annals of the New York Academy of Sciences 182:279-294.
- NOVICK, R.P. e M.H. RICHMOND. 1965. Nature and interaction of the genetic elements governing penicillinase synthesis in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology 90: 467-480.
- NOVICK, R.P. e C. ROTH. 1968. Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology 95:1335-1342.

- OTAYA, H. 1974. Sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics. V. Differentiation of drug sensitive - and resistant - strains by minimal inhibitory concentration of the drug and annual change of sensitivity of the bacteria to various drugs. *The Journal of Antibiotics* 27:686-695.
- PATTEE, P.A. e D.S. NEVELN. 1975. Transformation analysis of three linkage groups in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 124:201-211.
- PEYRU, G., L.F. WEXLER e R.P. NOVICK. 1969. Naturally occurring penicillinase plasmids in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 98:215-221.
- POSTON, S.M. 1966. Cellular location of the genes controlling penicillinase production and resistance to streptomycin and tetracycline in a strain of *Staphylococcus aureus*. *Nature* 210:802-804.
- PROCTOR, A.R. e W.E. KLOOS. 1970. The triptophan gene cluster of *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Microbiology* 64:319-327.
- RICHMOND, M.H. 1965. Wild-type variants of exopenicillinase from *Staphylococcus aureus*. *Biochemical Journal* 94:584-593.
- RICHMOND, M.H. 1968. The plasmids of *Staphylococcus aureus* and their relation to other extrachromosomal elements in bacteria. *Advances in Microbiol Physiology* 2:43-88.

RICHMOND, M.H. 1972. A comparison of the exo-penicillinase mediated by a chromosomal gene in a strain of *Staphylococcus aureus* PS80 and by a plasmid gene in *Staphylococcus aureus* 8325. *Genetical Research (Camb.)* 19:187-189.

RICHMOND, M.H. e M. JOHN. 1964. Co-transduction by a staphylococcal phage of the genes responsible for penicillinase synthesis and resistance to mercury salts. *Nature* 202:1360-1361.

RICHMOND, M.H., M.T. PARKER, M.P. JEVONS e M. JOHN. 1964. High penicillinase production correlated with multiple antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Lancet* i: 293 (*Apud WILLIAMS, 1967*).

RITZ, H.L. e J.N. BALDWIN. 1962. A transduction analysis of complex loci governing the synthesis of triptophan by *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 110:667-671 (*Apud PROCTOR e KLOOS, 1970*).

RUBIN, S.J. e E.D. ROSENBLUM. 1971. Effects of ethidium bromide on growth and on loss of penicillinase plasmids of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 108: 1200-1204.

RUSH, M.G., C.N. GORDON, R.P. NOVICK e R.C. WARNER. 1969. Penicillinase plasmid DNA from *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 63:1304-1310.

SJÖSTRÖM, J.E., S. LÖFDAHL e L. PHILIPSON. 1975. Transformation reveals a chromosomal locus of the gene(s) for methicillin resistance in Staphylococcus aureus. Journal of Bacteriology 123:905-915.

SMITH, C.D. e P.A. PATTEE. 1967. Biochemical and genetic analysis of isoleucine and valine biosynthesis in Staphylococcus aureus. Journal of Bacteriology 93: 1832-1839.

SOLÉ-VERNIN, C. e A.M. UTHIDA-TANAKA. 1969. A prova de Moore conjugada ao antibiograma na identificação das amostras hospitalares e não hospitalares de Staphylococcus aureus. Hospital 75:2043-2086.

SONSTEIN, S.A. e J.N. BALDWIN. 1972. Loss of the penicillinase plasmid after treatment of Staphylococcus aureus, with sodium dodecyl sulfate. Journal of Bacteriology 109:262-265.

SOUSSY, C.J.; D.H. BOUANCHAUD, J. FOUACE, A. DUBLANCHET e J. DUVAL. 1975. A gentamicin resistance plasmid in Staphylococcus aureus. Annales de Microbiologie (Inst. Pasteur) 126B:91-94.

SWEENEY, H.M. e S. COHEN. 1968. Wild-type strain of Staphylococcus aureus containing two genetic linkage groups for penicillinase production. Journal of Bacteriology 96:920-924.

SZYBALSKI, W. e V. BRYSON. 1952. Genetics studies on microbial cross resistance to toxic agents. I. Cross resistance of Escherichia coli to five antibiotics. Journal of Bacteriology 64:489-499.

TRABULSI, L.R., M.E. ZULIANI e M.R.F. de TOLEDO. 1970. Resistance to nine drugs of *Shigella* strains isolated in São Paulo between 1963 and 1968. *Revista de Microbiologia* 1:71-77.

TURNER, G.C. e A.T. WILLIS. 1962. Staphylococcal invasion of a new surgical ward. *Journal of Pathology and Bacteriology* 84:349 (Apud WILLIAMS, 1967).

WARREN, R., M. ROGOLSKY, B.B. WILLEY e L.A. GLASGOW. 1974. Effect of ethidium bromide on elimination of exfoliative toxin and bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 118:980-985.

WILLIAMS, R.F. 1967. Mercury resistance and tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Higiene (Camb.)* 65:299-309.

WILLIAMS, R.F. 1971. Some feature of antibiotic resistance in Staphylococci: mercury resistance and multiple antibiotic resistance. *Proceeding of Royal Society of Medicine* 64:540-544.

WILLIS, A.T. e G.C. TURNER. 1963. Staphylococci in the hospital environment. *Journal of Pathology and Bacteriology* 85:395 (Apud WILLIAMS, 1967).

ZIMMERMANN, W., A. ROSSELET e F. KNÖSEL. 1971. Effect of rifampicin and selected rifamycin derivatived on *Staphylococcus* β lactamase plasmids. *Annals of New York Academy of Sciences* 182:329-341.

*Esta dissertação foi concluída no
ano do 75º aniversário da ESALQ
Piracicaba (1901-1976)*