

RESISTÊNCIA A DROGAS EM AMOSTRAS HOSPITALARES
DE *Staphylococcus aureus* E *Pseudomonas aeruginosa*

ANA MARIA DE ANDRADE

Orientador : Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho - 1984

Para

José Roberto

pelo seu incentivo e
pela sua confiança

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. *João Lúcio de Azevedo*, pela orientação.
- À Dra. *Catalina Romero Lopes*, pela iniciação científica e incentivo constantes.
- Ao Departamento de Microbiologia do IBBMA da UNESP - Botucatu-SP., na pessoa da Dra. *Claudia Esteves Pires de Campos*, pelas amostras concedidas e auxílios nas técnicas utilizadas.
- À Fundação Doutor Amaral Carvalho, na pessoa de seu presidente, Sr. *Oswaldo Amaral Carvalho*, pelas facilidades concedidas na utilização do laboratório de análises do Hospital Amaral Carvalho.
- À Eng^a Agr^a *Maria José Valarini*, pelas sugestões, colaborações e incentivos valiosos ao presente trabalho.
- Ao Dr. *Ricardo F. de Castro Peres*, pelo auxílio nas técnicas de eletroforese.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida.
- Aos colegas e funcionários do Setor de Genética de Microrganismos do Instituto de Genética - ESALQ.
- Aos colegas, *Tereza, Mazê, Afonso, Cristina e Aldo*, pela amizade.

I N D I C E

	<u>Página</u>
RESUMO	xi
SUMMARY.	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.	3
2.1. Resistência a drogas em bactérias	3
2.2. Genética da resistência a drogas.	5
2.2.1. Plasmídios	5
2.2.1.1. A descoberta dos "fatores R".. . . .	6
2.2.1.2. Resistência múltipla.	8
2.2.1.3. Instabilidade da resistência.	11
2.3. Resistência a drogas em <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.4. Resistência a drogas em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
2.5. Detecção de plasmídios em bactérias	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.	24
3.1. Espécies de bactérias utilizadas.	24
3.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	24
3.1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
3.2. Meios de cultura e soluções utilizadas.	25
3.2.1. Ágar nutriente (N.A. DIFCO).	25
3.2.2. Brain Heart Infusion (B.H. DIFCO).	25
3.2.3. Solução de Lisozima (pH 8.0)	26
3.2.4. Solução Alcalina de SDS.	26

	<u>Página</u>
3.2.5. Solução concentrada de Acetato de Sódio	26
3.2.6. Solução Tampão para Eletroforese.	26
3.2.7. Solução Salina.	26
3.3. Drogas utilizadas.	27
3.3.1. Antimicrobianos utilizados	27
3.4. Soluções estoques das drogas.	27
3.5. Determinação dos níveis naturais de resistên- cia as drogas.	27
3.6. Determinação dos modelos de resistência.	30
3.7. Separação de DNA extracromossômico em gel de Agarose	32
4. RESULTADOS.	34
4.1. Níveis de resistência de amostras isoladas.	34
4.2. Modelos de resistência.	53
4.3. Porcentagem de resistência.	53
4.4. Níveis de resistência.	53
4.5. Resistência múltipla.	66
4.6. Presença de plasmídios detectados em gel de agarose.	66
5. DISCUSSÃO.	70
5.1. Níveis de resistência das amostras isoladas.. . . .	70
5.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	70
5.1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75
5.2. Modelos de resistência múltipla	79
5.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	79

	<u>Página</u>
5.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	82
5.3. Presença de Plasmídios.	83
6. CONCLUSÃO.	86
7. LITERATURA CITADA.	87

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
1 - Antibióticos para os quais foram atribuídos instabilidade da resistência segundo a literatura.	12
2 - Exemplos de resistência obtidos em <i>S. aureus</i>	17
3 - Exemplos de resistência obtidos em <i>P. aeruginosa</i>	21
4 - Constituições químicas, ano de lançamento, modos de ação e fabricantes dos antimicrobianos utilizados para <i>S. aureus</i>	28
5 - Constituições químicas, ano de lançamento, modos de ação e fabricantes dos antimicrobianos utilizados para <i>P. aeruginosa</i>	29
6 - Quantidades e diluições utilizadas para obtenção de diferentes concentrações de drogas no meio de cultura.	31
7a. - Níveis de resistência de 26 amostras de <i>P. aeruginosa</i> pertencentes à população P_1 isoladas de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP.	35

Tabela

Página

7b.	-	Níveis de resistência de 28 amostras de <i>P. aeruginosa</i> , pertencentes à população P_2 , isoladas de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP.	36
8	-	Níveis de resistência de 68 amostras de <i>S. aureus</i> , isoladas de pacientes do Hospital Amaral Carvalho, de Jaú, SP.	37
9	-	Modelos de resistência de 68 amostras de <i>S. aureus</i> , isoladas de pacientes do Hospital Amaral Carvalho, de Jaú, SP.	54
10	-	Modelos de resistência de 26 amostras pertencentes à população 1 de <i>P. aeruginosa</i> isoladas no ano de 1980 no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP.	57
11	-	Modelos de resistência de 28 amostras pertencentes à população 2 de <i>P. aeruginosa</i> isoladas no ano de 1983 no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP.	59
12	-	Modelos de resistência encontrados para <i>S. aureus</i>	61
13	-	Modelos de resistência encontrados para as populações P_1 e P_2 de <i>P. aeruginosa</i>	62

Tabela

Página

14	-	Maiores níveis de resistência, número de isolados e tempo de lançamento encontrados para as populações P ₁ e P ₂ de <i>P. aeruginosa</i> .	63
15	-	Maiores níveis de resistência, número de isolados e tempo de lançamento encontrados para <i>S. aureus</i> .	64
16	-	Antibióticos, ano de lançamento e porcentagem de resistência para isolados de <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> utilizados no trabalho.	65
17	-	Porcentagem de diferentes tipos de resistência encontrada para isolados de <i>S. aureus</i> em relação aos 6 antibióticos utilizados.	67
18	-	Porcentagens de diferentes tipos de resistência encontradas para os isolados das populações P ₁ e P ₂ de <i>P. aeruginosa</i> .	68

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
1	- Distribuição gráfica dos níveis de resistência à oxacilina em 68 amostras de <i>S. aureus</i> isolados de pacientes do Hospital Amaral Carvalho.	40
2	- Distribuição gráfica dos níveis de resistência ao cloranfenicol em 68 amostras de <i>S. aureus</i> isolados de pacientes do Hospital Amaral Carvalho.	41
3	- Distribuição gráfica dos níveis de resistência à Estreptomina em 68 amostras de <i>S. aureus</i> isolados de pacientes do Hospital Amaral Carvalho	42
4	- Distribuição gráfica dos níveis de resistência à Tetraciclina em 68 amostras de <i>S. aureus</i> isolados de pacientes do Hospital Amaral Carvalho.	43
5	- Distribuição gráfica dos níveis de resistência à Canamicina em 68 amostras de <i>S. aureus</i> isolados de pacientes do Hospital Amaral Carvalho.	44

Figura

Página

6	-	Distribuição gráfica dos níveis de resistência à Penicilina em 68 amostras de <i>S. aureus</i> isolados de pacientes do Hospital Amaral Carvalho.	45
7	-	Distribuição gráfica dos níveis de resistência à Amicacina nas populações P ₁ e P ₂ de <i>P. aeruginosa</i> isoladas de pacientes do Hospital da Faculdade de Medicina de Botucatu.	46
8	-	Distribuição gráfica dos níveis de resistência à Gentamicina nas populações P ₁ e P ₂ de <i>P. aeruginosa</i> isolados de pacientes do Hospital da Faculdade de Medicina de Botucatu.	47
9	-	Distribuição gráfica dos níveis de resistência à Sisomicina nas populações P ₁ e P ₂ de <i>P. aeruginosa</i> isoladas de pacientes do Hospital da Faculdade de Medicina de Botucatu.	48
10	-	Distribuição gráfica dos níveis de resistência à Tobramicina nas populações P ₁ e P ₂ de <i>P. aeruginosa</i> isoladas de pacientes do Hospital da Faculdade de Medicina de Botucatu.	49

Figura

Página

11	-	Distribuição gráfica dos níveis de resistência à Carbenicilina nas populações P_1 e P_2 de <i>P. aeruginosa</i> isoladas de pacientes do Hospital da Faculdade de Medicina de Botucatu.	50
12	-	Distribuição gráfica dos níveis de resistência à Cloranfenicol nas populações P_1 e P_2 de <i>P. aeruginosa</i> isoladas de pacientes do Hospital da Faculdade de Medicina de Botucatu.	51
13	-	Distribuição gráfica dos níveis de resistência à Fosfomicina nas populações P_1 e P_2 de <i>P. aeruginosa</i> isoladas de pacientes do Hospital da Faculdade de Medicina de Botucatu.	52
14	-	Perfis eletroforéticos das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> realizados em placa vertical. São também indicadas as marcas de resistência a antibióticos encontradas para cada amostra.	69

RESISTÊNCIA A DROGAS EM AMOSTRAS HOSPITALARES
DE *Staphylococcus aureus* E *Pseudomonas aeruginosa*

Autora: ANA MARIA DE ANDRADE

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

RESUMO

Foram utilizadas 54 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes hospitalares, e os níveis de resistência foram determinados pelo método da diluição em placas, frente à gentamicina, sisomicina, tobramicina, carbenicilina, amicacina, fosfomicina e cloranfenicol. O mesmo método foi utilizado para 68 amostras de *Staphylococcus aureus*, em que foram ensaiados cloranfenicol, oxacilina, estreptomicina, tetraciclina, canamicina e penicilina. Os níveis de resistência foram comparados com os obtidos por outros autores, e possibilitaram a discriminação das amostras em resistentes ou sensíveis, a cada droga estudada. Os resultados mostraram altos níveis de resistência com relação à maioria dos antibióticos usados. Foi notado também que o antibiótico cloranfenicol apresentou maior nível de resistência para ambas espécies.

Para os isolados de *Staphylococcus aureus* verificou-se que a porcentagem de resistência múltipla foi bastante elevada, fato esse, que pode estar associado à presença plasmidial nessas amostras.

A técnica de extração de plasmídios seguida de eletroforese em gel de agarose foi utilizada para algumas amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, observando-se através dela, a presença de plasmídios.

DRUG RESISTANCE IN HOSPITAL ISOLATES TO *Staphylococcus aureus* AND *Pseudomonas aeruginosa*

JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

ANA MARIA DE ANDRADE

ADVISER

AUTHOR

SUMMARY

The resistance levels of 54 *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from hospital patients were tested in relation to gentamycin, sisomicin, tobramycin, carbenicylin, amycacin, fosfomicin and chloranfenicol by the dilution method in plates. The same method in plates was used for 68 samples of *Staphylococcus aureus* in which following antibiotics - chloranphenicol, oxacylin, streptomycin, tetracycline, kanamycin and penicylin were tested. The results were compared with the obtained by other authors and according to these parameters it was possible to classify the isolates in resistant and susceptible to the drugs. The results showed high levels of resistance in relations to most of the antibiotics used. The antibiotic chlorphenicol showed the highest level of resistance for both species analysed.

For *S. aureus* high percentagem of multiple resistant strains were found. This fact could be associated to the presence of plasmids. Plasmids were detected through the gel eletrophoresis techniques in *P. aeruginosa*.

1. INTRODUÇÃO

Bactérias, de modo geral, apresentam junto ao seu genoma, além do cromossomo principal, grupos de ligações adicionais, facultativos, autônomos e separados do cromossomo, os plasmídios. Assim, há uma tendência natural em atribuir muitas das propriedades bacterianas a plasmídios. A partir de 1960, uma proporção significativa principalmente de Enterobactérias patogênicas mostraram a propriedade de adquirir fatores transmissíveis de resistência a drogas. A este fenômeno associou-se uma incidência progressiva de elementos extracromossômicos designados de plasmídios R.

Os plasmídios conferem a uma população de células maior flexibilidade, provendo as espécies com um "reserva

tório" de genes os quais podem fornecer vantagem seletiva sem mudança permanente do cromossomo. O uso indiscriminado de antibióticos no homem e em animais domésticos, tem indubitavelmente concorrido para aumentar o número de plasmídios favoráveis as células bem como suas trocas intra e interespecíficas. Tal fato tem sido motivo de alerta, uma vez que doses mal calculadas, uso indevido e profilático de antibióticos ocorrem com frequência, facilitando o aparecimento de organismos resistentes através de seleção natural.

O presente trabalho tem por objetivo verificar o nível de resistência em amostras de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em pacientes hospitalares frente a diferentes antibióticos lançados no comércio em tempos diferentes, e tentativamente observar a ocorrência de plasmídios nessas populações.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Resistência a drogas em bactérias

Desde a descoberta da penicilina e do pronto sil, o sucesso da quimioterapia se tornou um dos grandes mo mentos da história da medicina. Decorridos mais de um século dessa descoberta está-se diante de um novo problema que é o da resistência a drogas em bactérias (MITSUHASHI, 1979).

Inicialmente pensava-se que a resistência ad quirida era consequência direta do contato da bactéria com o antibiótico, levando à chamada teoria da adaptação. Logo após foi verificado que o que ocorria era mutação e seleção. A aqui sição de resistência era decorrência de mutações cromossômi cas que ocorriam espontaneamente independente da presença do

antibiótico. A presença deste tinha o único papel de selecionar os mutantes resistentes. Aproximadamente 10 anos após a comprovação definitiva da teoria da mutação seguida de seleção, investigadores japoneses descobriram que a resistência a drogas podia decorrer da presença, dentro da célula de um elemento extra-cromossômico, transportando genes de resistência e com a faculdade de se transmitir de uma bactéria para outra. A resistência bacteriana à droga, é decorrência primária de uma alteração do genoma da célula, de natureza cromossômica ou extracromossômica. 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, sabe-se ser duplo: o mais importante é o de destruir as bactérias sensíveis, e o outro é o de selecionar as resistentes que ocupam o lugar deixado pelas primeiras. (MITSUHASHI, 1979).

O uso indiscriminado de antibióticos tem trazido vários problemas, sobretudo o aumento da resistência de determinados microorganismos, sendo a literatura farta em exemplos e dados que motivam preocupações quanto ao futuro da terapêutica de muitas doenças infecciosas (CUNHA e SUASSUNA, 1980).

Plasmídios conferindo resistência a drogas antibacterianas têm-se tornado elementos amplificadores dos pro

blemas de saúde pública. A existência de tais plasmídios exige o redimensionamento de toda estratégia usada no controle destas infecções (CAMARA e CARDOSO, 1981).

Sabe-se que uma das principais fontes de disseminação de enterobactérias para o homem são os alimentos, tendo papel de destaque carnes e derivados. Em vários países inclusive no Brasil, os antibióticos são empregados como aditivo em rações para promover o crescimento dos animais. Muitas vezes esses mesmos antibióticos são utilizados no tratamento de doenças humanas e animais. SMITH (1968) mostrou o aparecimento de bactérias resistentes seguido à inclusão de antibióticos na ração. Porém é o uso indiscriminado de antibióticos na profilaxia e tratamento de doenças humanas e em menor escala veterinárias, que seleciona linhagens de bactérias resistentes, portadoras do plasmídio R.

2.2. Genética da resistência a drogas

2.2.1. Plasmídios

Os plasmídios R apresentam várias propriedades como replicação, regulação de sua própria replicação, transmissão por conjugação, e capacidade de conferir resistência a drogas (MITSUHASHI, 1979). Podem também conferir resistência a muitos outros agentes que são tóxicos para bactérias tais como: bacte

riófagos, bacteriocinas, metais pesados, radiações ionizantes, componentes séricos, detergentes, etc. Provavelmente devem existir outros determinantes que protegem bactérias contra agentes tóxicos e que não foram ainda reconhecidos. (DAVIES, 1981).

A replicação dos plasmídios pode ocorrer de maneira autônoma em células em condições boas de crescimento; em condições subótimas, a replicação de plasmídios pode não ser concomitante com a divisão celular, o que ocasiona o aparecimento de células sem plasmídios (NOBLE e NAIDOO, 1978).

2.2.1.1. A descoberta dos "fatores R"

A maioria das linhagens de *Shigella* isoladas até 1956 eram resistentes somente à estreptomicina, sulfonamida ou tetraciclina e nenhum caso de disenteria bacilar causado por linhagens com resistência múltipla havia sido descrito entre 1945 e 1951 em mais de 10.000 isolados. O primeiro caso de resistência múltipla, em *Shigella*, ocorreu no Japão em 1952, e a segunda em 1956 também com *Shigella*. Essas datas sugerem que a resistência múltipla não apareceu em estágios graduais, mas sim de maneira explosiva. O aparecimento do "fator R" não pode ser precisado, mas não foi durante o uso da sulfonamida (1945) ou no início do uso dos antibióticos tais como estreptomicina, tetraciclina e canamicina (1950). O 1º isolado ocorreu em 1959 no Japão, podendo considerar-se o aparecimento do fa

tor R no período de 1952 a 1958 quando muitas linhagens com resistência múltiplas foram isoladas. Devido à presença de tais fatores em Israel e Formosa sugere-se que sua distribuição não foi devida a viajantes que se movimentavam de um país a outro, mas independentes, e em muitos lugares do mundo, em função do uso de drogas como sulfonamida, estreptomicina, tetraciclina e canamicina. Foram encontradas resistências múltiplas à tetraciclina, canamicina, estreptomicina e sulfonamida em bactérias gram negativas portadoras de plasmídios R. Resistências a aminoglicosídeos foram acompanhadas da presença de plasmídio R. Assim a resistência múltipla pode se espalhar rapidamente por transmissão infecciosa e pela força de seleção devido ao uso de tais drogas (MITSUHASHI, 1979).

FARAR (1981) em sua revisão relatou que em um só paciente foram encontradas 3 espécies diferentes de bactérias albergando o mesmo plasmídio, indicando que a transmissão pode ocorrer "in vivo". Verificou também que em um surto hospitalar parece ter havido uma sequência de DNA transponível carregando genes que se movem de um plasmídio a outro e que se espalham a muitas espécies bacterianas. No início, eram resistentes à gentamicina, *Serratia marcescens* e *Pseudomonas aeruginosa* e depois *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*. Em relação a *E. coli* não havia infecção. Um plasmídio (105 Md) isolado de *S. marcescens* foi colocado em uma *E. coli* contendo um plasmídio pequeno, o PM 88. Foram encontrados plasmídios híbridos

nessas células, as quais pareciam representar formas de PM 88 Md no qual, foi inserido um transposon de PM = 6,2 Md, contendo genes para a resistência a aminoglicosídeos e a β lactâmicos. Análise do heteroduplex confirmou essa interpretação. A transposição foi independente do sistema rec A. Experimentos similares foram realizados com plasmídios (105 Md) isolados de *H. pneumoniae* com resultados idênticos. Finalmente a análise heteroduplex usando transposon p BM8 : 6,2 Md e o plasmídio 9,8 Md da *S. marcescens* revelaram que estes dois plasmídios repartiam a região próxima a 62 Md. Esses estudos indicaram que não somente o plasmídio 105 Md contém transposon carregando genes para a resistência à gentamicina, como também esta sequência transponível é originada em plasmídios de 9,8 Md encontrado em amostras isoladas em estágios precoces de um surto. Como esse gene ficou restrito a um plasmídio não conjugativo, só poderia ser transferido se passasse a outro plasmídio grande e conjugativo, aumentando a possibilidade de espalhar-se a outras espécies.

2.2.1.2. Resistência múltipla

A sequência de descobertas que vieram a mostrar como sendo plasmidial a responsabilidade da resistência múltipla pode ser assim sumarizada:

- A resistência a drogas podia ser transferida entre *Shigella* e *E. coli* quando cultivadas juntos em meio líquido. OCHIAI *et alii* (1959)
AKIBA *et alii* (1959)
- A transferência da resistência a drogas não é conseguida através de agentes filtráveis MITSUHASHI *et alii* (1960)
- A transferência da resistência é eliminada espontaneamente durante a estocagem. É também eliminada através de tratamento com brometo de etídio MITSUHASHI *et alii* (1960)
- Foi indicado o termo "Fator R" para designar a propriedade de transferir resistência a drogas. MITSUHASHI *et alii* (1960)
- A transmissão é observada em todas as espécies de *Enterobacteriaceae* HARADA *et alii* (1960)

As referências citadas acima estão na revisão de MITSUHASHI (1979).

Com a descoberta dos plasmídios R, a noção de transferência de resistência foi estabelecida através de conjugação. Entretanto, *S. aureus* não apresenta transferência de resistência por conjugação e sim por transdução (MITSUHAHI, 1979).

A recombinação entre genes separadas especificando resistência múltipla em plasmídio foi utilizada por LACEY e CHOPRA (1972) para explicar o problema da resistência múltipla, alegando que a resistência que surge por mutação é mais frequente em genes cromossômicos que plasmidiais.

LACEY e CHOPRA (1974) construíram uma linhagem artificial de *S. aureus* contendo oito plasmídios e observaram que ocorria recombinação entre os mesmos. Verificaram também que o número de plasmídios que podiam ser mantidos estáveis na célula era limitado. Essa limitação podia ser devida a um processo restritivo ou a vários processos restritivos além da incompatibilidade plasmidial.

O problema da resistência múltipla é complexo e vem sendo estudado por muitos pesquisadores inclusive no Brasil, como se pode verificar nas revisões feitas por SIQUEIRA (1976) e SOUZA (1975).

2.2.1.3. Instabilidade da Resistência

MITSUHASHI *et alii* (1963) observou que a resistência aos antibióticos macrolídicos era eliminada após tratamento pela acriflavina, o mesmo acontecendo com a penicilina.

LACEY e CHOPRA (1974) verificaram que a instabilidade da resistência ao cloranfenicol (linhagem 649 MR de *S. aureus*) era devida à redução do número de cópias de plasmídios por célula.

Plasmídios são perdidos espontaneamente numa frequência maior que a taxa de mutação a vários agentes químicos, os chamados agentes de cura que são capazes de aumentar essa frequência, sendo este um dos critérios para se determinar a localização plasmidial de marcas genéticas. 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 (SIQUEIRA, 1976).

NOBLE (1977) observou que ocorria eliminação de plasmídios quando as linhagens cresciam a 43°C e era usado brometo de etídio ou ditranol. Entretanto, quando as linhagens eram estocadas à temperatura ambiente, em agar-sangue, por 3 a 4 meses ocorria perda da resistência em altas frequências.

SIQUEIRA e AZEVEDO (1978) verificaram que o brometo de etídio fornece indicação da localização plasmidial de certas marcas genéticas e que na ausência de condições para metodologia mais sofisticada pode ser usada para tal.

MITSHUHASHI (1979) em sua revisão sobre resistência plasmidial, relacionou os trabalhos em que foram observados perda da resistência em *S. aureus*. Seus dados se encontram na Tabela 1.

Tabela 1. Antibióticos para os quais foram atribuídos instabilidade da resistência segundo a literatura.

Antibióticos	Referências *
(Pc) (penicilina)	BARBER 1949 HASHIMOTO <i>et alii</i> (1964)
(Mac) (macrolídeos)	MITSUHASHI <i>et alii</i> (1963)
(Pc Mac) (Macrolídeos e penicilina)	MITSUHASHI <i>et alii</i> (1965)
(Tc) tetraciclinas	MAY <i>et alii</i> (1964) KASUGA <i>et alii</i> (1968)
(Km) canamicina	CHARBERT <i>et alii</i> (1964)
(Sm) estreptomicina	MORIMURA <i>et alii</i> (1970)

*As referências dos autores na presente tabela podem ser encontradas em MITSUHASHI (1979).

POTTER e LOUTIT (1983) descreveram cura do plasmídeo FP2 em *P. aeruginosa*. O processo consistia em congelar as células componentes para a transformação, em glicerol 15% a -70°C por um período mínimo de 48 horas e selecionar os sobreviventes que perdiam a resistência a cloreto de mercúrio. A frequência da cura era de 0,5%.

2.3. Resistência a drogas em *S. aureus*

Em *S. aureus* consideram-se dois modelos básicos de "aquisição" de resistência, (a) resistência pode originar-se inicialmente, em resposta à presença de um antibiótico. Isto ocorre dentro de uma população microbiana através de uma seleção gradual de mutantes progressivamente mais resistentes até um estágio no qual a concentração da droga necessária para inibir o microrganismo, é maior que aquela suportada pelo hospedeiro do mesmo. O microrganismo é então considerado resistente ao antibiótico. Os genes responsáveis por tal resistência estão geralmente localizados no cromossomo; (b) alternativamente, genes extracromossômicos podem governar resistência do tipo "aquisição em um único passo" onde o microrganismo "muda" diretamente de "sensível" à "resistente". Esses genes extracromossômicos existem nas células microbianas como anéis circulares e covalentemente fechados (plasmídios) (NOBLE e NAIDOO, 1978).

Muitos exemplos de resistência em estafilococos são devidos a genes localizados no cromossomo como: estreptomicina (altos níveis), trimetropina, novobiocina e rifampicina. Determinantes para outras marcas de resistência como penicilina, estreptomicina (baixos níveis), canamicina, cloranfenicol, eritromicina, lincomicina são localizadas em plasmídios. Resistência a antibióticos como tetraciclina são codificados por genes localizados ou em plasmídios ou no cromossomo. A localização de outros genes resistentes são controvertidas como meticilina e gentamicina (LACEY, 1975; ASHESHOV, 1975).

A resistência a dois antibióticos era muitas vezes determinada por um único plasmídio (MITSUHASHI *et alii*, 1965; ANNEAR e GRUBB, 1972 e LACEY e ROSDANE, 1973, apud LACEY e CHOPRA, 1973); entretanto, resistência a mais de 2 antibióticos determinados por plasmídios é limitado provavelmente ao fato de que o tamanho do plasmídio é o fator importante durante sua transferência em estafilococos.

O grande número de antibióticos com estruturas similares tem trazido dúvidas no valor terapêutico de alguns deles. A produção de penicilinase por linhagens de *S. aureus* hidroliza β lactamas de vários agentes antimicrobianos como carbenicilina, cloxacilina, flucloxacilina, ampicilina, cefaloridina, cefalotina e outras. Nos países, onde esses antibióticos foram usados, foram progressivamente substituídos por β

lactamase resistentes. No Reino Unido foram detectadas linhagens resistentes à neomicina 9 anos após a sua introdução. A gentamicina, que foi o antibiótico mais recentemente introduzido para uso clínico, já foram detectadas linhagens resistentes (SOUSSY *et alii*, 1975).

Em análise genética da resistência a tetraciclina (Tc), estreptomicina (Sm), sulfonilamida (SA) e penicilina (P), realizada, através de transdução com fagos ligados obtidos de linhagem múltipla resistente de *S. aureus*, através de irradiação com luz ultra violeta, os transdutantes adquiriram resistência a Tc e SA enquanto somente um adquiriu resistência para SA e Tc. O locus responsável pela resistência a Tc não pode ser geneticamente separado da resistência a SA. Por outro lado, na transdução da resistência a Sm cerca de 30% dos transdutores adquiriram resistência a ambos Tc e SA. Essa observação sugere que o loco governando resistência a Tc, SA e Sm, existe em uma única unidade genética, pertencente provavelmente ao cromossomo. (KASUGA *et alii*, 1968).

A determinação genética da resistência a tetraciclina pode ter uma localização plasmidial ou cromossomal em *S. aureus* (LACEY, 1973). A resistência controlada por plasmídios é qualitativamente diferente da controlada por locos cromossômico. O gene plasmidial confere resistência a tetraciclina mas não a aminociclina, enquanto o gene cromossômico con

trola a resistência a ambas as drogas. A resistência cromossômica pode ter um único locus determinando as duas resistências ou ambas serem determinadas por locus ligados (ASHESHOV, 1975).

A resistência à gentamicina levou 12 anos após a sua introdução para aparecer, mas vem ativamente, aumentando o seu aparecimento em publicações científicas. É mediada por gene plasmidial (NOBLE e NAIDOO, 1978).

LACEY (1975) indicou que a resistência ao clo^ranfenicol era determinada por um gene plasmidial. A estreptomⁱcina em altos níveis de resistência (MIC > 10 mg/ml) em 70% dos achados, corresponde a locus cromossômico. Baixos níveis de resistência à estreptomⁱcina (MIC a 0,1 mg/ml) é típico de herança plasmidial (Tabela 2).

A primeira evidência de que a resistência à eri^tromicina poderia ser plasmidial, foi obtida por MITSUHASHI *et alii* (1963).

Outras marcas genéticas podem se localizar no plasmí^dio PC ase, como resistência à canamicina (ANNEAR e GRUBB, 1972) ao ácido fusídico (LACEY e GRINSTED, 1972) e ao brometo de etí^dio (JONNSTON e DYKE, 1969).

TABELA 2. Exemplos de resistência obtidos em *S. aureus*.

Níveis de resistência	Literatura
Tetraciclina	
- gene cromossômico - 3 a 6 µg/ml	NOBLE e NAIDOO (1978)
- gene plasmidial - 25 a 300 µg/ml	
Estreptomicina	
- gene cromossômico 10 mg/ml	LACEY (1975)
- gene plasmidial - 0,1 mg/ml	
Cloranfenicol - 50 µg/ml	SIQUEIRA (1976)
Penicilina - 200 µg/ml	SIQUEIRA (1976)

2.4. Resistência a drogas em *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma enterobactéria causadora de graves infecções, particularmente em pacientes debilitados ou imunodeprimidos, sendo um organismo de difícil terapia devido a sua resistência a muitos antibióticos (BREMNER, 1979). Trabalhos de resistência a drogas observados em literatura (Tabela 3), para *Pseudomonas aeruginosa* mostram os elevados níveis atingidos para os antibióticos dos grupos dos β lactamas e aminopropanodiol, principalmente.

Testes de sensibilidade em 1452 linhagens de *P. aeruginosa* isolados entre 1966 e 1969 demonstraram um aumento

na proporção de linhagens sensíveis à polimixina e gentamicina e resistentes à carbenicilina. Linhagens que apresentavam tipos sorológicos distintos adquiriam a mesma forma de resistência em 24 horas. Bactérias sensíveis atingiam rapidamente um alto nível de resistência à carbenicilina com produção de carbenicilinase quando cresciam na presença de carbenicilina, nenhum aumento na resistência à carbenicilina foi achado quando linhagens sensíveis cresciam com ampicilina ou cloxacilina. A instabilidade das linhagens resistentes e sua reversão à sensibilidade quando expostas à acriflavina sugeriram que fatores extracromossômicos eram responsáveis pela resistência (LOWBURY *et alii*, 1969).

Plasmídios R em *P. aeruginosa* não eram conhecidos até 1968 quando LOWBURY *et alii* (apud Olsen 1973) isolaram linhagens de pacientes na Inglaterra, que eram altamente resistentes à carbenicilina. Demonstraram que essa resistência era determinada por plasmídios R que também conferiam resistência à tetraciclina, neomicina e canamicina.

WITCHITZ e CHABBERT (1971) identificaram plasmídios R que conferiam resistência à gentamicina, ampicilina, clo-ranfenicol e sulfonamida.

DATTA e HEDGES (1972) identificaram um plasmídio em *Pseudomonas* que conferia resistência à gentamicina formando um grupo de compatibilidade designado pelos autores de C.

Desde que plasmídios R foram observados com frequência em muitas partes do mundo, mais de 100 plasmídios são agora conhecidos. Com maior interesse clínico e epidemiológico estão os plasmídios R, que são "promíscuos", isto é, podem ser transferidos para bactérias de outros gêneros, OLSEN e SHIPHY (1973).

KANABE *et alii* (1975) descreveram uma linhagem de *P. aeruginosa* resistentes à amicacina e à enzima responsável, era medida pelo plasmídio R, que também carregava resistência à gentamicina, canamicina e sulfonamida.

INGRAM e HASSAN (1975) descreveram uma linhagem de *P. aeruginosa* resistente a 400 µg/ml ao cloranfenicol. Era controlada por plasmídio e a enzima Cm-transacetilase era produzida somente pelas linhagens resistentes.

Altos níveis de resistência à gentamicina levaram STEAL e STRANGEWAIS (1976) a acreditarem em mutação genômica que alterava a função ribossomal; a mutação podia ser expressa por sensibilidade à temperatura, sendo portanto, um útil marcador. Esses altos níveis poderia ser devido à inativação enzimática da gentamicina consequente à aquisição do Fator R.

MAGALHÃES e VERÃS (1976) estudando 40 amostras de *P. aeruginosa* gentamicina-resistente que foram ensaiadas frente à tobramicina obtiveram resultados que mostravam inequívoca resistência cruzada entre gentamicina e tobramicina. Isso

sugere o emprego de apenas um das drogas, nos antibiogramas usados rotineiramente.

FALKINER *et alii* (1977) relataram que linhagens de *P. aeruginosa* resistentes à gentamicina, canamicina, tobramicina e sulfonamida era determinada pelo plasmídeo pertencente ao grupo P3. A resistência à aminoglicosídeos era devido à acetilação.

KNOTHE e KRÉMÉRY (1979) descreveram um aumento na resistência e multi-resistência à gentamicina e outros aminoglicosídeos. Linhagens resistentes à gentamicina, sisomicina e tobramicina foram também resistentes à amicacina. Investigando a resistência cruzada, sugeriram que existia mais que uma enzima envolvida na inativação de aminoglicosídeos e que havia linhagens que possuíam várias enzimas capacitadas contra uma única substância.

Em estudos com 422 linhagens de *P. BREMMER* (1979) observou que havia 23 bactérias resistentes à gentamicina, resistência essa que era transferida por conjugação. A resistência à gentamicina chegava a 160 µg/ml. Linhagens resistentes à tobramicina e sisomicina somavam 19 e somente 1 era resistente à tobramicina, sisomicina e amicacina.

Foi observado um estudo comparativo entre as membranas de células resistentes e sensíveis verificando-se conteúdo de proteína total, carboidratos e padrão proteico,

através de eletroforese. Na célula resistente ocorre redução de lipopolisacarídeos e alterações na composição proteica verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida. Assim, a resistência à polimixina está associada com alterações de membrana, devido à perda de lipopolisacarídeos ou outras proteínas da membrana (GILLELAND JR. *et alii*, 1979).

TABELA 3. Exemplos de resistência obtidos em *P. aeruginosa*

Níveis de resistência	Literatura
Amicacina - 50 µg/ml	BREMNER (1979)
Carbenicilina - 256-512 µg/ml	LOWBURY (1969)
Cloranfenicol - 400 µg/ml	INGRAM e HASSAM (1975)
Sisomicina - 25 µg/ml	BREMNER (1979)
Tobramicina - 160 µg/ml	BREMNER (1979)
Gentamicina - 160 µg/ml	BREMNER (1979)

2.5. Detecção de plasmídios em bactérias

Em 1976, MEYERS *et alii* divisaram um método bastante simples para detecção e caracterização de plasmídios variando entre 0,6 e 95 mdal. A técnica requeria apenas a purificação parcial de um lisado celular que, em seguida era submetido à eletroforese. Os autores propunham ainda uma forma de estimar os pesos moleculares dos plasmídios, utilizando uma curva padrão em papel di-log que relacionava o peso molecular de plasmídios conhecidos e sua migração no gel.

Diversos trabalhos foram publicados posteriormente procurando, cada vez mais, simplificar e agilizar a técnica de extração do DNA plasmidial. Mas, as etapas de purificação ainda sujeitavam o DNA a um considerável "stress", o que dificultava o isolamento de plasmídios acima de 50 mdal, e mesmo de plasmídios muito pequenos mas com baixo número de cópias por célula.

Em 1979, BIRBOIM e DOLY propuseram um método rápido que eliminava totalmente a necessidade de purificação. A técnica permitia verificar plasmídios grandes e pequenos. Neste método as bactérias são adicionadas a uma mistura contendo lisozima (para iniciar o desarranjo da parede de mureína) e RNase para eliminar o RNA bacteriano). A mistura ainda contém azul de bromofenol que serviria como indicador da corrida ele

troforética. No preparo da suspensão de células é usado dodecil sulfato de sódio (SDS) que iria lisar parcialmente as células expondo o DNA. Após completada a eletroforese, a visualização dos plasmídios era feita utilizando-se como corante, brometo de etídio que tornava as bandas de DNA fluorescentes quando vistas sob luz ultra violeta. A migração dos plasmídios no gel seria tanto maior quanto menor fosse seu peso molecular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Espécies de bactérias utilizadas

3.1.1. *Staphylococcus aureus*

Foram utilizadas 68 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de pacientes do Hospital Amaral Carvalho, de Jaú-SP., em 1980.

3.1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Foram utilizadas 54 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu-SP. Essas amostras foram divididas em duas populações P_1 e P_2 , segundo a época de isolamento, 1980 e 1983, respectivamente.

3.2. Meios de cultura e soluções utilizadas

3.2.1. Ágar nutriente (N.A. DIFCO)

Extrato de carne.	3 g
Cloreto de sódio.	1 g
Peptona.	5 g
Ágar.	15 g
Água destilada.	1000 ml
pH = 7.2	

A autoclavagem foi feita em 20 minutos a 126 °C e uma atmosfera de pressão.

3.2.2. Brain Heart Infusion (B.H. DIFCO).

Infusão de cérebro de bezerro	200 g
Infusão de coração de boi	250 g
Peptona	10 g
Dextrose	2 g
Cloreto de sódio	5 g
Fosfato dissódico	2,5 g
pH = 7.4	

3.2.3. Solução de Lisozima (pH 8.0)

Lisozima	2 mg/ml
Glicose	50 mM
EDTA	10 mM
TRIS.HCl	25 mM

3.2.4. Solução Alcalina de SDS

NaOH	0.2N
Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	1%

3.2.5. Solução Concentrada de Acetato de Sódio

Acetato de Sódio 3 M (pH 4.8)

3.2.6. Solução Tampão para Eletroforese

TRIS.	40 mM
ACETATO DE SÓDIO.	20 mM
EDTA.	2 mM
pH.	7,8

3.2.7. Solução Salina

Solução aquosa de cloreto de sódio 0,89% e au
toclavada por 20 minutos a uma atmosfera.

3.3. Drogas utilizadas

3.3.1. Antimicrobianos utilizados

As tabelas 4 e 5 apresentam os antimicrobianos utilizados bem como o ano de lançamento, suas constituições básicas, modo de ação e fabricante, segundo VALARINI (1981).

3.4. Soluções estoques das drogas

As soluções para a utilização dos antibioticos foram preparadas mediante a dissolução de 100 mg dos mesmos em 10 ml de água esterilizada. Para dissolução do cloranfenicol foi utilizado 1:9 de álcool etílico em H₂O. Todas as soluções estoques tiveram uma concentração final de 10 mg/ml.

3.5. Determinação dos níveis naturais de resistência as drogas

Os níveis de resistência foram obtidos utilizando-se o método da diluição em placas contendo concentrações crescentes de cada droga: 0, 1, 2, 5, 10, 50, 100, 200, 500 e 1000 µg/ml de meio de cultura (Ágar nutriente). A partir das soluções estoques, fizeram-se as diluições, adicionando-se quantidades adequadas a 20 ml de meio de cultura a 45°C,

TABELA 4. Constituições químicas, ano de lançamento, modos de ação e fabricantes dos antimicrobianos utilizados para *S. aureus*.

Antibiótico	Ano *	Constituição química	modo de ação	Laboratório
Penicilina	1950	ácido 6 amino penicilâmico	Interferente da formação da parede celular	Fontoura-Wyeth
Streptomomicina	1950	Aminoglicosídeo	Interferente da síntese proteica	Fontoura-Wyeth
Tetracilcina	1952	Hidrocarboneto aromático	Interferente da síntese proteica	Pfizer
Cloranfenicol	1955	2 amino 1,3 propanodiol	Interferente da síntese proteica	Carlo Erba
Oxacilina	1962	derivada do ácido 6 amino penicilâmico	Interferente da síntese proteica	Laborterápica Bristol S.A.
Canamicina	1974	Aminoglicosídeo	Interferente da síntese proteica	Laborterápica Bristol S.A.

* Fornecido pelos respectivos laboratórios

TABELA 5. Constituições químicas, ano de lançamento, modos de ação e fabricantes dos antimicrobianos utilizados para *P. aeruginosa*.

Antibiótico	Ano *	Constituição química	Modo de ação	Laboratório
Cloranfenicol	1955	2 amino, 3 propanodiol	Interferente da síntese proteica	Carlo Erba
Gentamicina	1968	aminoglicosídeo	Interferente da síntese proteica	Shering S.A.
Carbenicilina	1972	β lactamas	inibição da síntese da parede celular	Pfizer
Fosfomicina	1974	ácido L - 1,2 epoxipropilfosfônico	Interferente da síntese da parede celular	Andrômaco
Amicacina	1975	aminoglicosídeo	Interferente da síntese proteica	Laboterápica Bristol S.A.
Sisomicina	1976	aminoglicosídeo	Interferente da síntese proteica	Shering S.A.
Tobramicina	1977	aminoglicosídeo	Interferente da síntese proteica	Eli Lilly

* Fornecido pelos respectivos laboratórios.

tal como indicado na Tabela 6.

As amostras de *S. aureus* e *P. aeruginosa* depois de isoladas de secreções retiradas dos pacientes infectados, foram crescidas em tubo com 5 ml de meio líquido (B.H.I.) até a fase logarítmica. A seguir, as amostras foram diluídas retirando-se 0,05 ml do tubo em que foram crescidas e completando-se com 3 ml de meio líquido. Feita a diluição, foram transferidas para as placas, contendo dosagens das drogas, através de um replicador multialça (AZEVEDO *et alii*, 1980). Após o período de incubação de 24 a 48 horas, anotou-se o crescimento das colônias (17 placas) comparando-se com uma placa controle isenta das drogas. Considerou-se como concentração inibitória a menor concentração da droga que impedia o crescimento das colônias e conseqüentemente como nível de resistência a maior concentração usada que permitia o desenvolvimento das colônias.

A escolha dos antibióticos foi feita segundo o tempo de utilização comercial dos mesmos para cada espécie. Assim, utilizou-se para *S. aureus* penicilina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, oxacilina e canamicina e para *P. aeruginosa* cloranfenicol, gentamicina, carbenicilina, fosfomicina, amicacina, sisomicina e tobramicina.

3.6. Determinação dos modelos de resistência

A determinação das bactérias resistentes foi

TABELA 6. Quantidades e diluições utilizadas para obtenção de diferentes concentrações de drogas no meio de cultura.

Concentração final da Droga na Placa ($\mu\text{g/ml}$)	ml da solução da droga/placa	Diluição da Solução da droga
1	0,2	10^{-2}
2	0,4	10^{-2}
5	1,0	10^{-2}
10	2,0	10^{-2}
20	0,4	10^{-1}
50	1,0	10^{-1}
100	2,0	10^{-1}
200	0,4	sd
500	1,0	sd
1000	2,0	sd

feita baseando-se nos "picos" do histograma de cada antibiotico. Foram considerados como resistentes as bactérias crescidas em meio contendo concentrações imediatas e superiores àquela em que impedia o crescimento.

3.7. Separação de DNA extracromossômico em gel de Agarose (BIRBOIM, 1979).

Células das linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* foram incubadas por 18 horas. A seguir foi transferido 0,5 ml da cultura para tubos de centrifugação do tipo Eppendorf a fim de iniciar-se a extração dos plasmídios. Para isso foi adicionado em cada tubo glicerol a 40% e as amostras foram levadas a -20°C . Apos rápida estocagem, centrifugou-se por 15 segundos. Os sobrenadantes foram removidos cuidadasamente e as células receberam 100 μl da solução de lisozima. Apos 30 minutos a 0°C , foram adicionados 200 μl da solução alcalina de Dodecil Sulfato de Sódio. Os tubos foram mantidos por 5 minutos a 0°C e 150 μl da solução concentrada de acetato de sódio foram colocados, misturados e mantidos a 0°C por 60 minutos. Esse procedimento foi usado para provocar precipitações de proteínas, RNA de altos pesos moleculares e do DNA cromossomal. Apos nova centrifugação por 5 minutos, os sobrenadantes foram removidos para um segundo tubo. A seguir colocou-se 1 ml de etanol frio e deixado a -20°C por 30 minutos a fim de retirar qualquer outro material estranho que ainda estivesse presente. Os precipitados foram

levados para centrifugação por 2 minutos e os sobrenadantes removidos por aspiração. Logo após ocorreu dissolução das amostras em 100 μ l de acetato de sódio e 0,05 M de TRIS-HCl (pH 8) e reprecipitados em 2 volumes de etanol frio. Após 10 minutos a -20°C , os precipitados foram novamente coletados, centrifugados e redissolvidos em 40 μ l de água. Dessa forma, permaneceu somente o DNA plasmidial que foi aplicado em gel de agarose para análise eletroforética.

Para a eletroforese usou-se gel de agarose a 0,8% e colocou-se um "pente" de acrílico neste gel para provocar a formação de "poços" de aplicação. Para a aplicação dos 10-20 μ l da amostra no gel, utilizou-se uma pipeta de precisão. O tampão de eletroforese foi colocado nos compartimentos para eletroforese vertical. Após uma corrida inicial de 45 minutos, a 4 mA, aumentou-se para 45 mA, até que o corrente chegasse ao outro extremo da placa. Terminada a migração, as placas de gel foram colocadas em solução de brometo de etídio (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e coradas por 30 minutos. As observações dos gêis foram feitas com luz ultra-violeta de ondas curtas. Após análise dos gêis, foi feito um esquema gráfico para melhor observação do DNA plasmidial.

4. RESULTADOS

4.1. Níveis de resistência de amostras isoladas

As 68 amostras de *Staphylococcus aureus* foram ensaiadas frente aos antibióticos Penicilina, Estreptomicina, Tetraciclina, Cloranfenicol, Oxacilina e Canamicina. As 54 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* foram ensaiadas frente aos antibióticos cloranfenicol, gentamicina, carbenicilina, fosfomicina, sisomicina e tobramicina. O método usado foi o da diluição em placas usando-se as concentrações 1; 2; 5; 10; 50; 100; 200; 500 e 1000 µg da droga por ml de meio de cultivo.

Os resultados estão nas Tabelas 7a e b e foram colocados em gráfico (frequência x concentração da droga), para cada droga, os quais puderam ser divididos em duas regiões: S e R (sensível e resistente), sendo que em R estariam enquadradas as amostras resistentes usando-se o critério de SOUSA (1975) (Figuras 1 a 13).

TABELA 7a. Níveis de resistência de 26 amostras de *P. aeruginosa* pertencentes à População P₁ isoladas de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP.

Amostras	Drogas (µg/ml)						
	Ak	Gm	Ss	Tm	Cr	Cl	Fs
1	5	10	10	5	500	1000	50
2	50	< 1	20	5	500	1000	1000
3	20	1	20	5	500	1000	500
4	50	200	10	5	200	1000	1000
5	50	200	10	10	100	1000	200
6	100	500	200	500	500	1000	500
7	50	200	100	100	200	1000	200
8	50	100	200	200	50	1000	20
9	50	20	100	200	50	1000	20
10	50	50	200	200	200	1000	10
11	20	50	500	100	200	1000	10
12	200	200	500	200	100	1000	10
13	50	500	500	200	100	1000	100
14	50	50	200	200	50	1000	200
15	50	200	100	20	50	1000	100
16	100	200	500	50	100	1000	100
17	100	500	200	200	100	1000	5
18	5	50	50	2	200	1000	1000
19	5	50	50	5	200	1000	1000
20	5	500	200	< 1	20	20	5
21	5	200	100	5	200	200	20
22	5	20	10	5	200	1000	50
23	50	200	500	50	100	1000	20
24	50	500	500	200	200	1000	20
25	50	500	500	50	200	1000	5
26	5	< 1	10	10	20	1000	20

Ak = amicacina; Ss = sisomicina; Tm = tobramicina; Gm = gentamicina;
Cr = carbenicilina; Cl = cloranfenicol; Fs = fosfomicina

TABELA 7b. Níveis de resistência de 28 amostras de *P. aeruginosa*, pertencentes à População P₂, isoladas de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP.

Amostras	Drogas (µg/ml)						
	Ak	Gm	Ss	Tm	Cr	Cl	Fs
1	< 1	1	5	< 1	100	1	1
2	< 1	< 1	1	1	100	10	1
3	< 1	1	5	1	100	200	1
4	< 1	20	20	5	500	200	1
5	< 1	10	10	5	200	200	1
6	< 1	5	10	1	100	10	1
7	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
8	< 1	10	20	5	1000	500	1
9	< 1	1	1	1	10	< 1	1
10	< 1	< 1	5	1	100	< 1	< 1
11	< 1	1	< 1	1	50	< 1	< 1
12	< 1	1	10	1	50	1	< 1
13	< 1	10	20	5	200	200	1
14	< 1	10	10	5	200	100	1
15	< 1	1	10	1	50	200	< 1
16	< 1	1	10	1	100	200	1
17	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	1	< 1
18	< 1	1	1	1	100	200	1
19	< 1	1	10	1	50	200	1
20	< 1	< 1	1	< 1	100	10	1
21	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	1	< 1
22	< 1	< 1	< 1	< 1	100	5	< 1
23	< 1	< 1	< 1	< 1	10	< 1	< 1
24	< 1	< 1	< 1	< 1	20	1	< 1
25	< 1	< 1	< 1	< 1	50	5	1
26	< 1	< 1	< 1	< 1	20	1	< 1
27	< 1	< 1	< 1	< 1	100	5	1
28	< 1	< 1	< 1	< 1	20	< 1	1

Ak = ampicilina; Ss = sisomicina; Tm = tobramicina; Gm = gentamicina;
Cr = carbenicilina; Cl = cloranfenicol; Fs = fosfomicina.

TABELA 8. Níveis de resistência de 68 amostras de *S. aureus*, isoladas de pacientes do Hospital Amaral Carvalho de Jaú, SP.

Amostras	Drogas ($\mu\text{g/ml}$)					
	Ox	Cl	Sm	Tc	Km	Pn
1	< 1	10	< 1	10	< 1	< 1
2	1000	1000	100	100	1000	50
3	5	100	1	20	< 1	< 1
4	< 1	50	10	10	< 1	< 1
5	< 1	1000	20	200	100	1
6	10	100	1	100	1	2
7	5	1000	100	100	100	20
8	1	200	< 1	2	< 1	< 1
9	2	200	< 1	200	10	< 1
10	1	100	1	200	1	2
11	1	200	2	100	< 1	2
12	5	200	< 1	200	< 1	1
13	1	200	< 1	200	< 1	< 1
14	1	1000	1000	100	500	20
15	5	500	200	500	200	2
16	< 1	200	2	500	5	< 1
17	< 1	200	< 1	100	2	< 1
18	1	100	1	100	200	20
19	5	1000	100	500	1	50
20	< 1	2	5	2	< 1	1
21	< 1	2	2	2	< 1	1
22	1	1000	1	5	1	5
23	< 1	50	100	50	200	1
24	< 1	1000	200	500	< 1	10

TABELA 8. Continuação

Amostras	Drogas ($\mu\text{g/ml}$)					
	Ox	Cl	Sm	Tc	Km	Pn
25	1	50	200	500	20	1
26	1	500	100	5	10	< 1
27	< 1	50	200	500	1	1
28	1	1000	2	500	1	1
29	1	50	5	5	< 1	5
30	1	50	5	200	< 1	1
31	< 1	50	100	500	10	1
32	1	50	20	1	20	< 1
33	1	200	5	1	20	1
34	1	50	5	200	< 1	1
35	20	500	500	200	20	5
36	1	500	50	200	200	20
37	20	1000	100	100	20	20
38	20	500	500	200	20	20
39	20	500	50	100	20	20
40	< 1	500	50	200	200	10
41	< 1	1000	100	100	1000	20
42	1	1000	50	100	2	10
43	1	500	50	2	20	20
44	< 1	500	2	2	1	1
45	< 1	1000	100	200	200	1
46	1	1000	5	100	500	5
47	1	500	50	100	1	20
48	< 1	500	10	200	20	1
49	< 1	1000	100	200	5	1
50	1	1000	100	100	5	2

TABELA 8. Continuação

Amostras	Drogas ($\mu\text{g/ml}$)					
	Ox	Cl	Sm	Tc	Km	Pn
51	1	1000	S	1000	S	20
52	20	1000	200	200	1000	500
53	1	50	200	1	50	5
54	1	1000	2	2	2	100
55	100	1000	1000	200	20	100
56	100	50	2	200	20	< 1
57	< 1	50	1	1	1	10
58	< 1	50	1	200	10	< 1
59	< 1	1000	2	200	1	1
60	< 1	1000	2	2	20	10
61	20	1000	1	10	1	5
62	< 1	50	200	100	200	10
63	< 1	1000	100	100	20	< 1
64	< 1	500	2	100	20	< 1
65	< 1	50	1	100	10	< 1
66	< 1	50	2	100	5	< 1
67	< 1	500	5	100	20	< 1
68	20	500	2	100	5	< 1

Ox = oxacilina; Cl = cloranfenicol; Sm = estreptomicina;
Tc = tetraciclina; Km = canamicina; Pn = penicilina g.

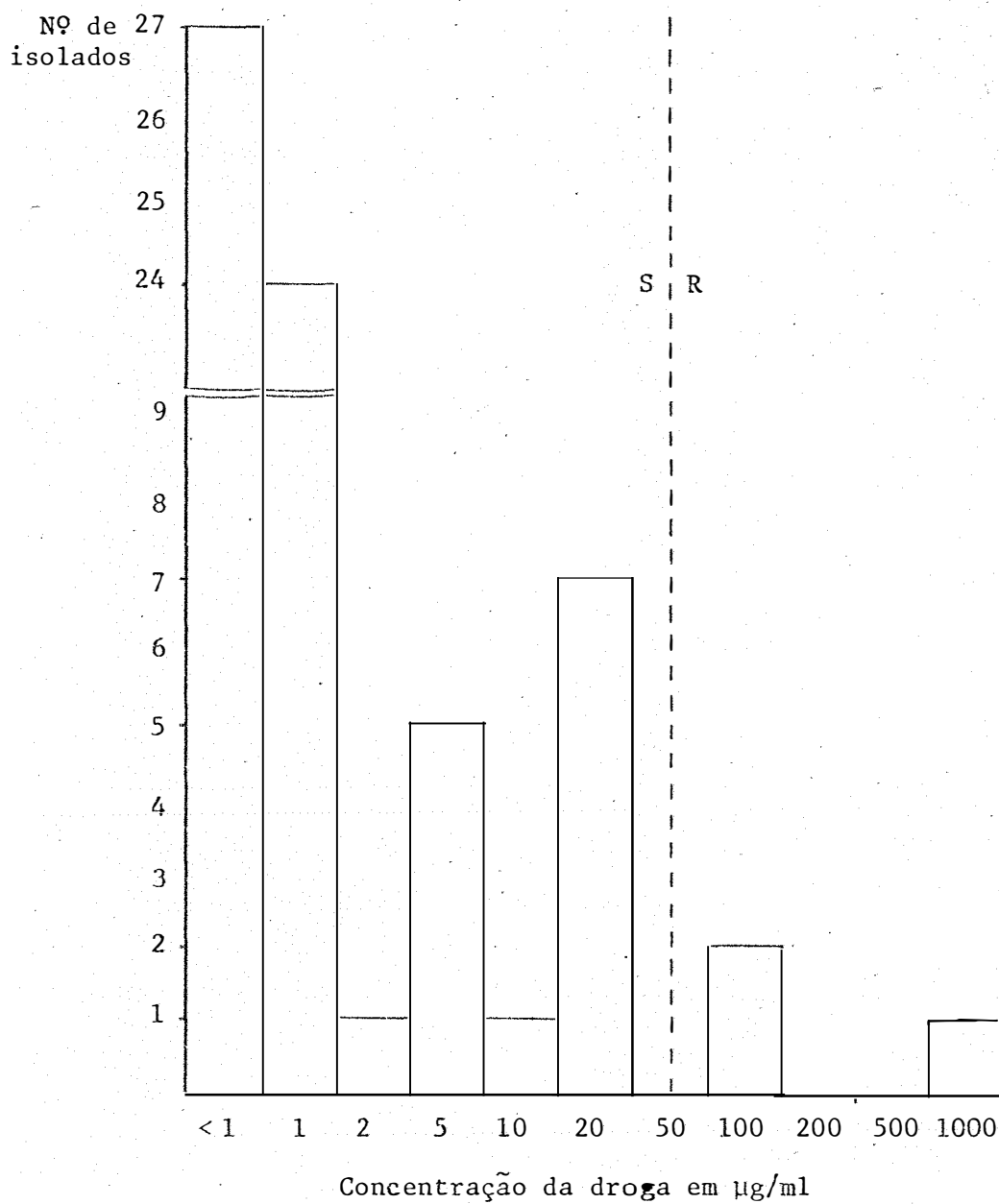


Figura 1. Distribuição gráfica dos níveis de resistência à oxacilina em 68 amostras de *S. aureus* isolados de pacientes do Hospital Amaral Carvalho.

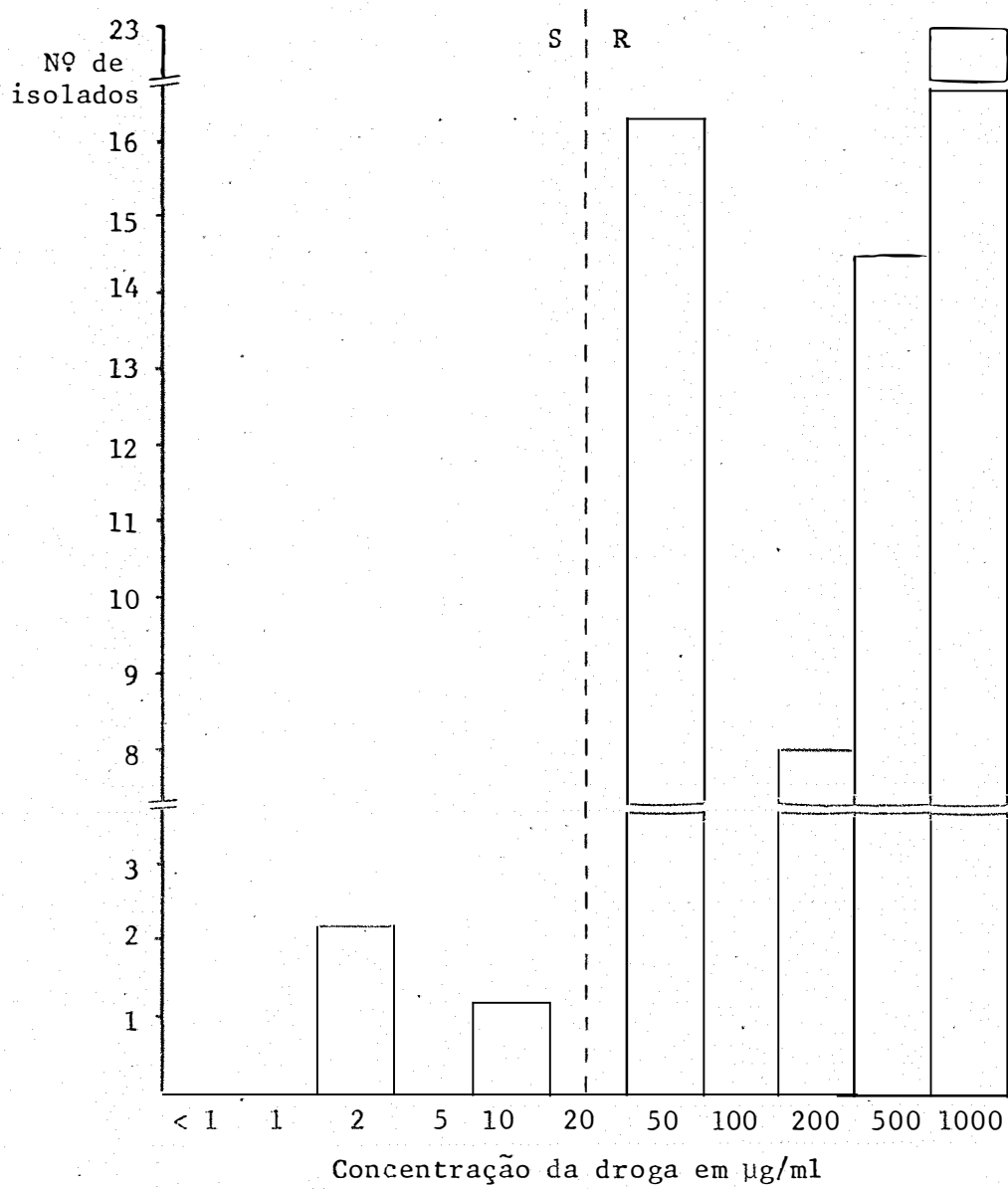


Figura 2. Distribuição gráfica dos níveis de resistência ao cloranfenicol em 68 amostras de *S. aureus* isolados de pacientes do Hospital Amaral Carvalho.

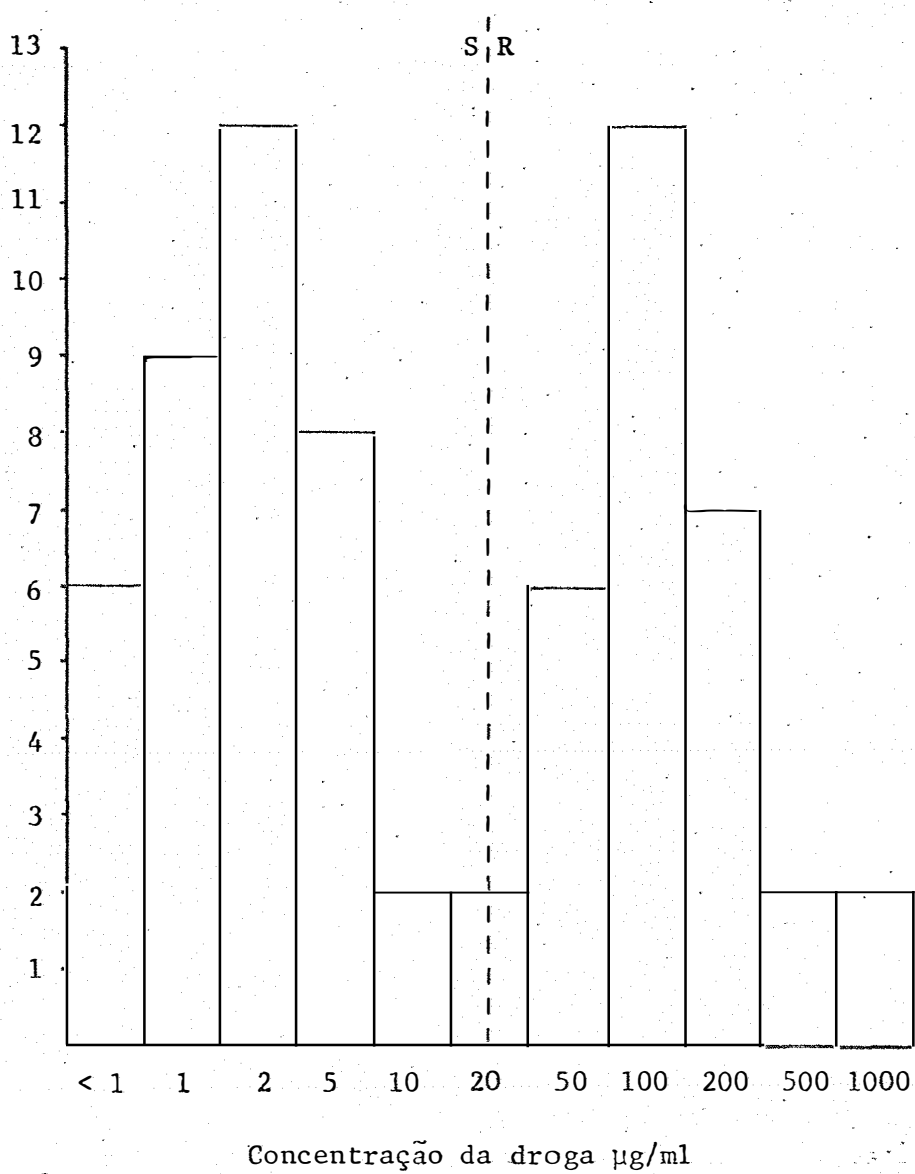


Figura 3. Distribuição gráfica dos níveis de resistência à Estreptomicina em 68 amostras de *S. aureus* isolados de pacientes do Hospital Amaral Carvalho.

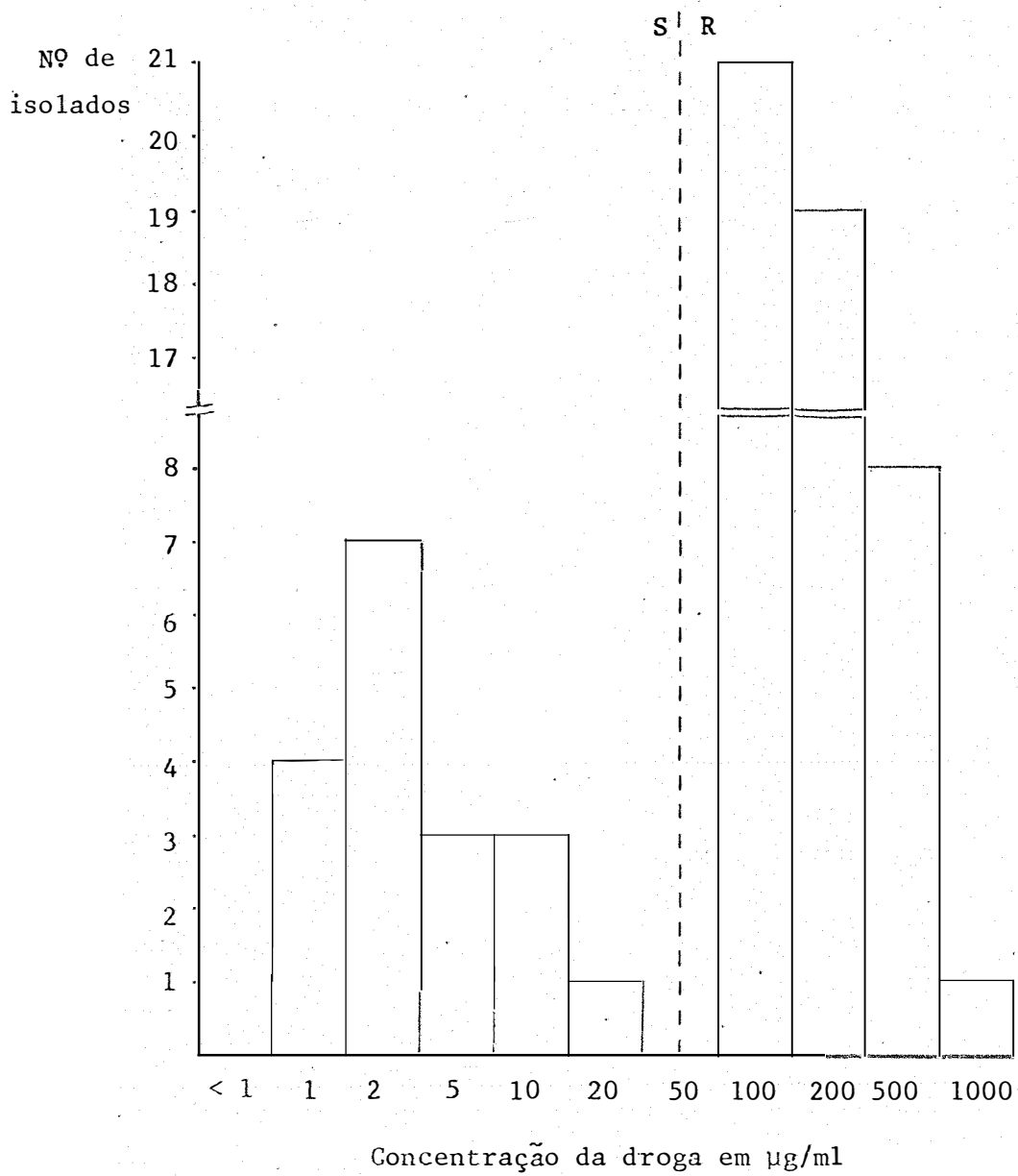


Figura 4. Distribuição gráfica dos níveis de resistência à Tetraciclina em 68 amostras de *S. aureus* isolados de pacientes do Hospital Amal Carvalho.

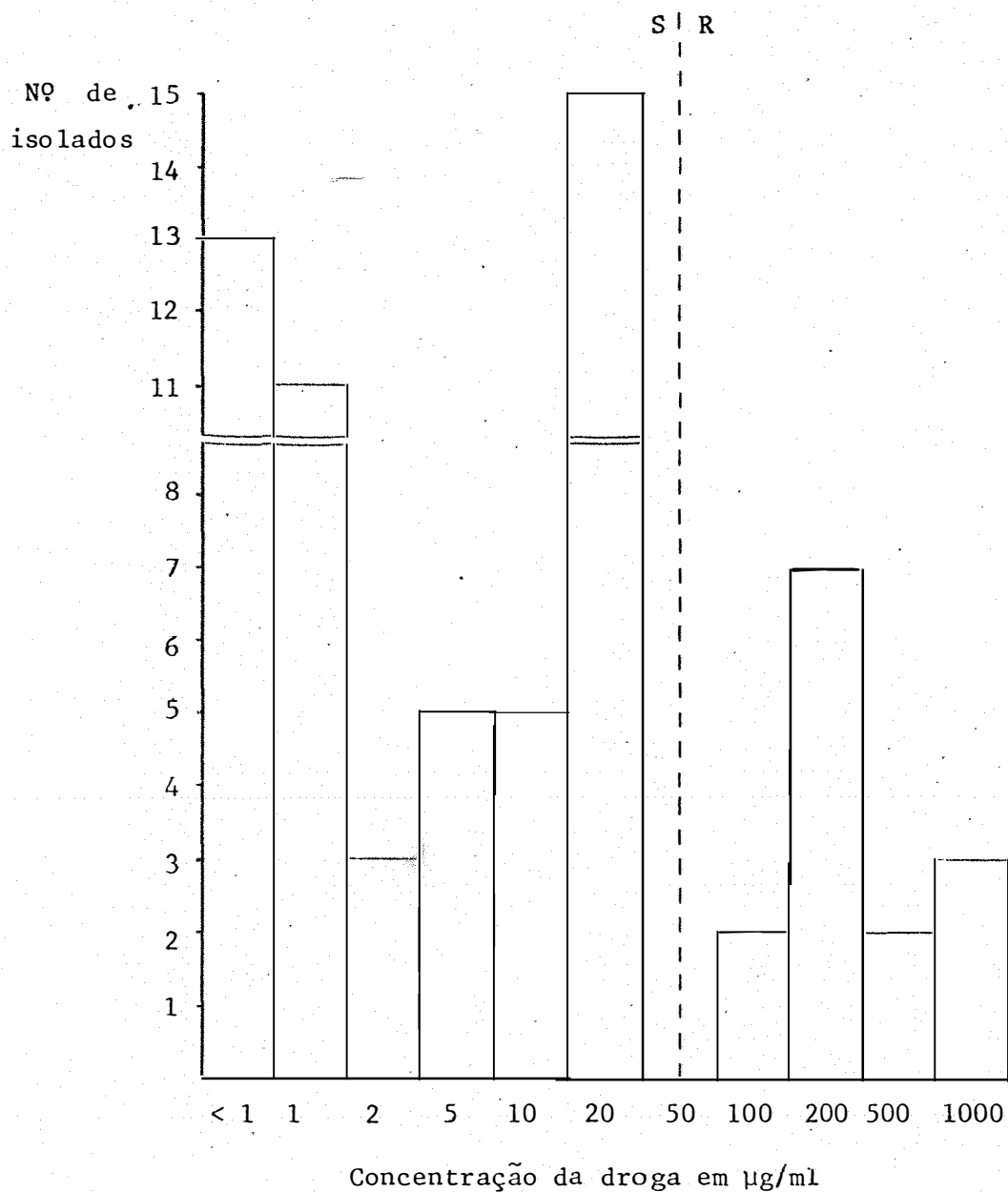


Figura 5. Distribuição gráfica dos níveis de resistência à Canamicina em 68 amostras de *S. aureus* isolados de pacientes do Hospital Amaral Carvalho.

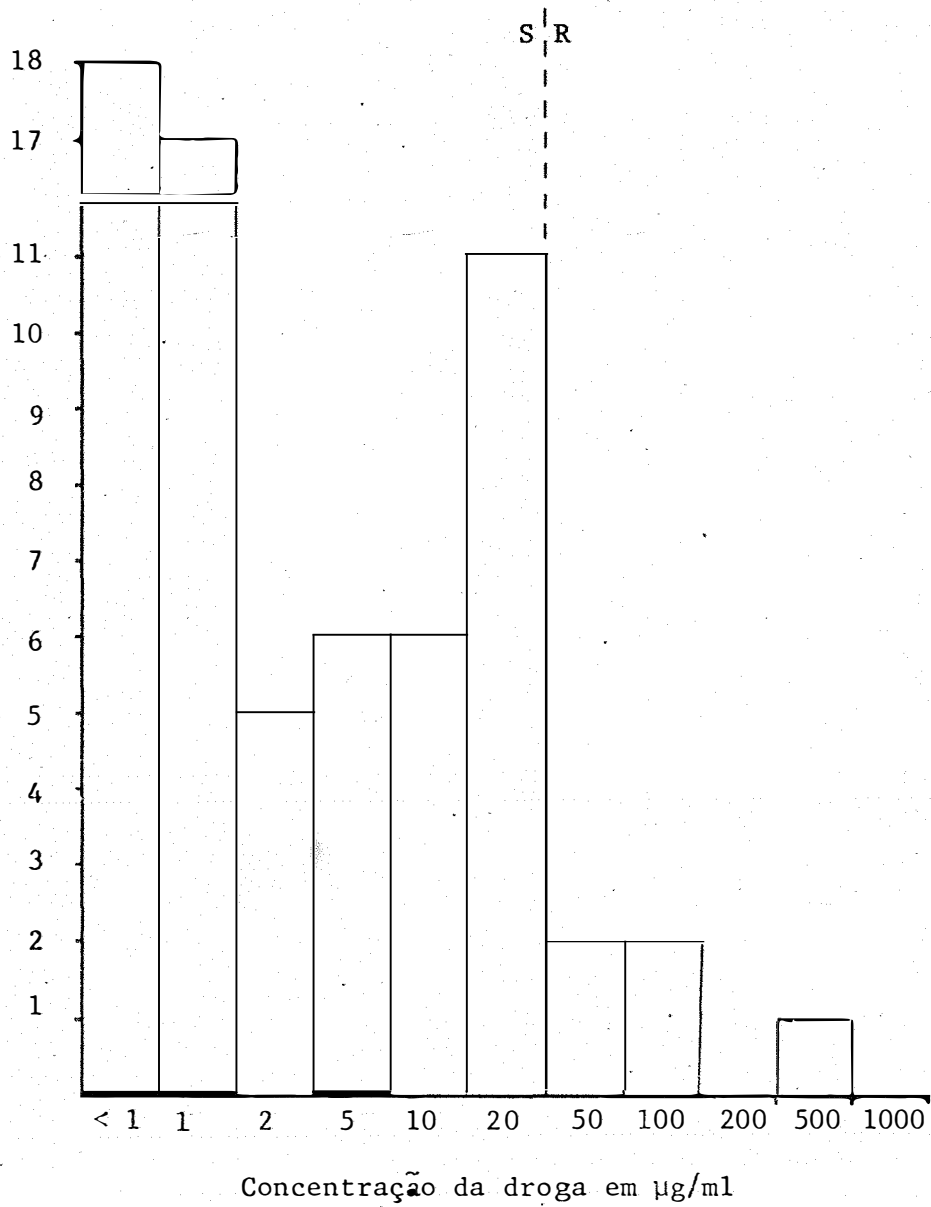


Figura 6. Distribuição gráfica dos níveis de resistência à Penicilina em 68 amostras de *S. aureus* isolados de pacientes do Hospital Amaral Carvalho.

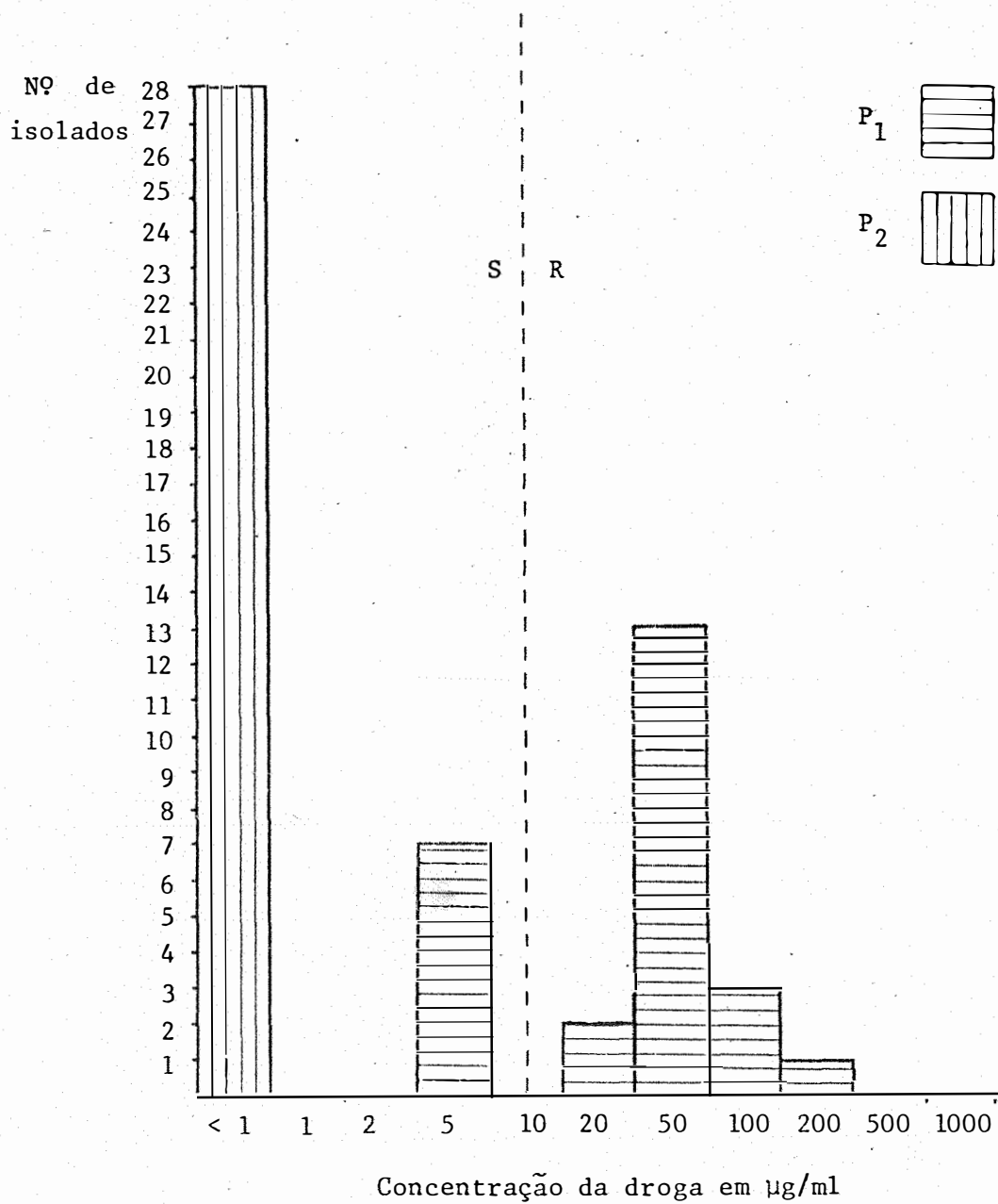


Figura 7. Distribuição gráfica dos níveis de resistência à Amicacina nas Populações P₁ e P₂ de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes do Hospital da Faculdade de Medicina de Botucatu.

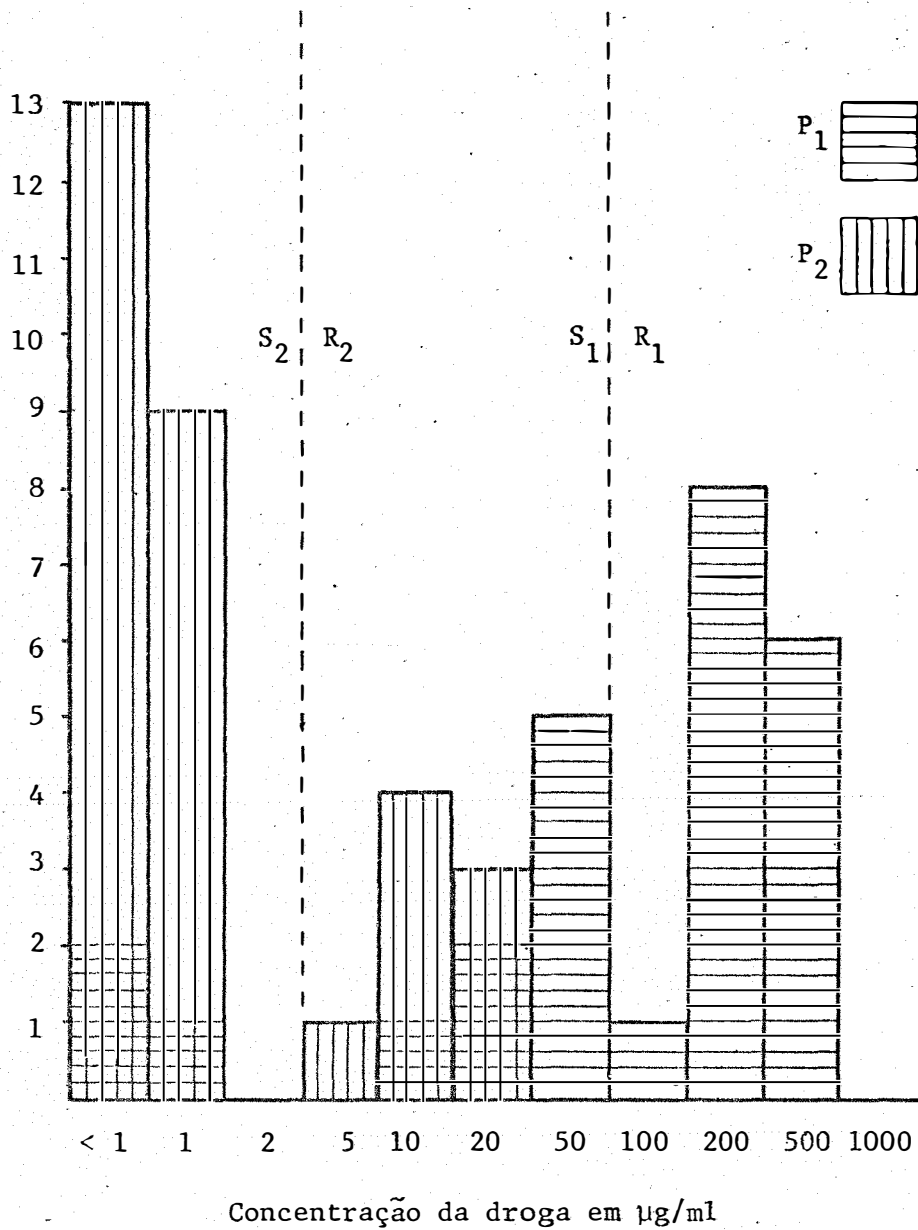


Figura 8. Distribuição gráfica dos níveis de resistência à Gentamicina nas Populações P₁ e P₂ de *P. aeruginosa* isolados de pacientes do Hospital da Faculdade de Medicina de Botucatu.

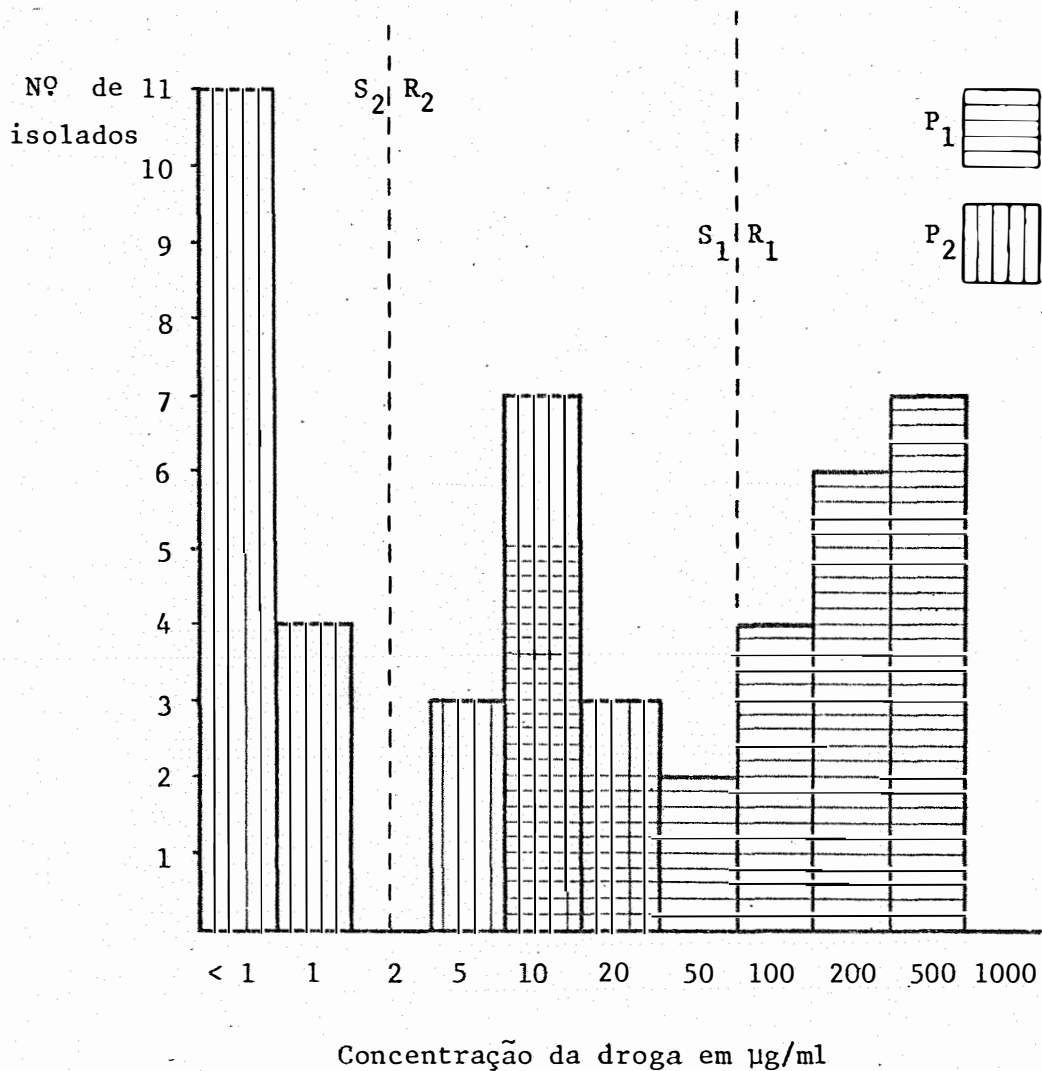


Figura 9. Distribuição gráfica dos níveis de resistência à Sisomicina nas Populações P₁ e P₂ de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes do Hospital da Faculdade de Medicina de Botucatu.

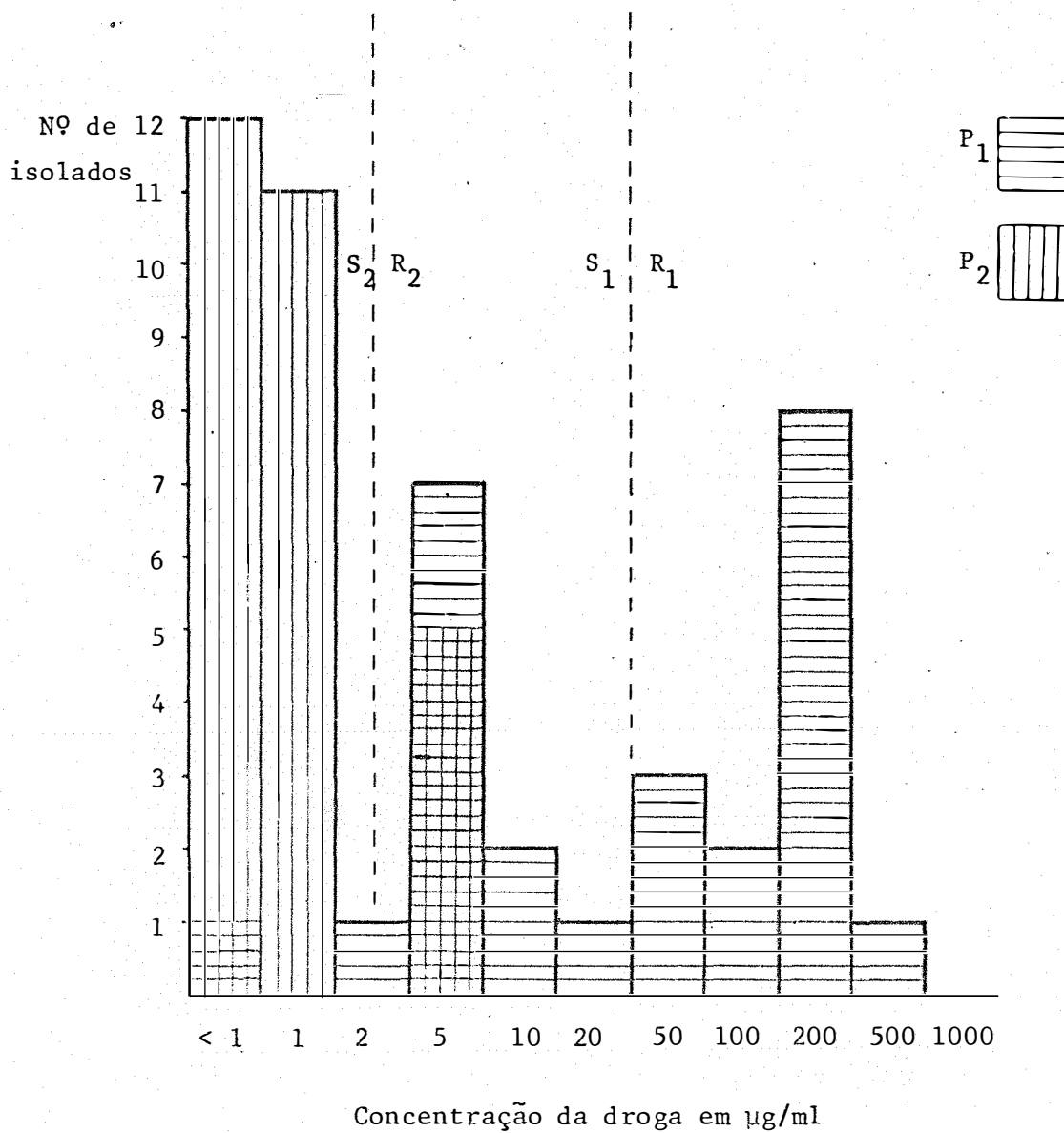


Figura 10. Distribuição gráfica dos níveis de resistência à Tobramicina nas Populações P₁ e P₂ de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes do Hospital da Faculdade de Medicina de Botucatu.

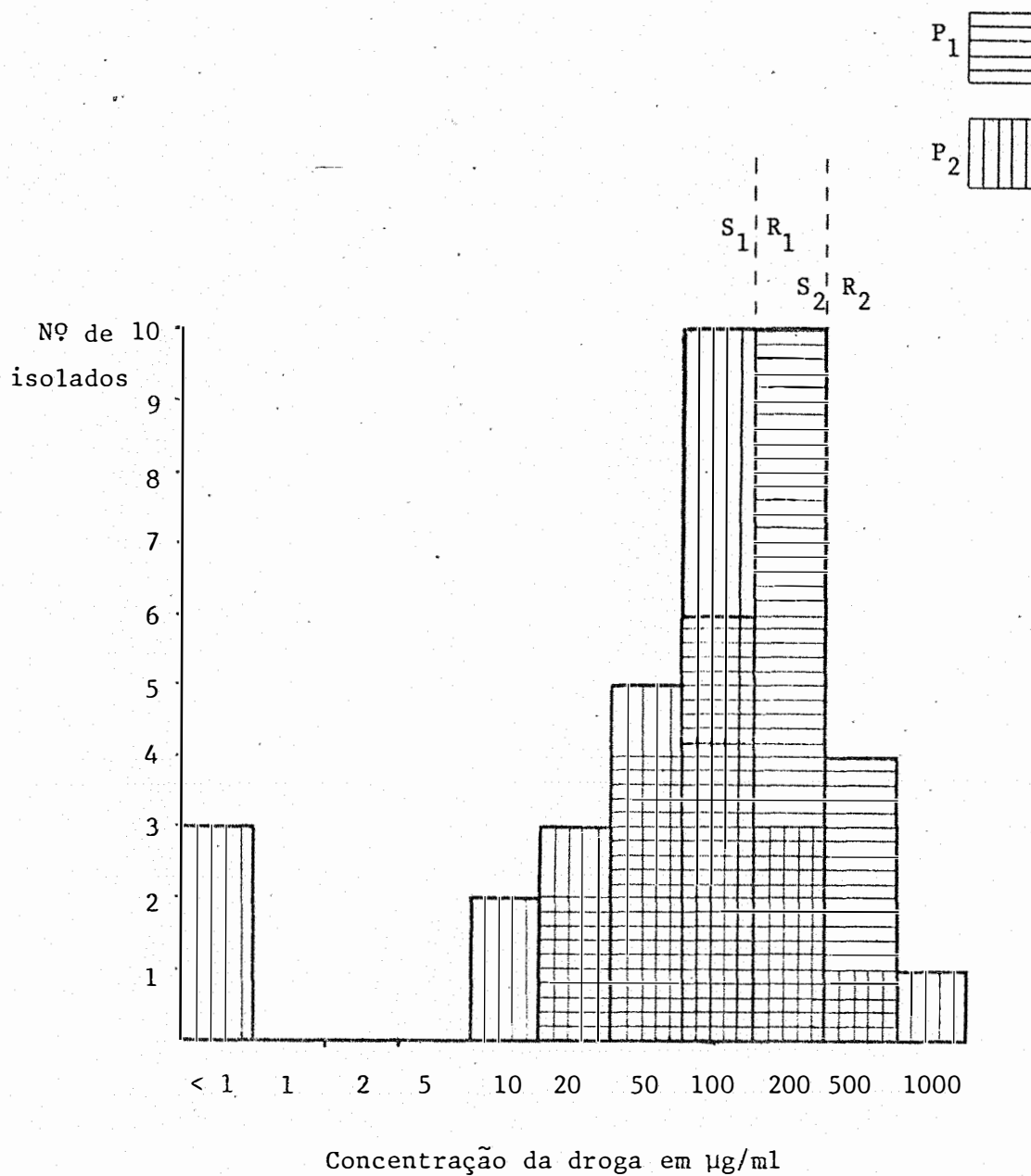


Figura 11. Distribuição gráfica dos níveis de resistência à Carbenicilina nas Populações P₁ e P₂ de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes do Hospital da Faculdade de Medicina de Botucatu.

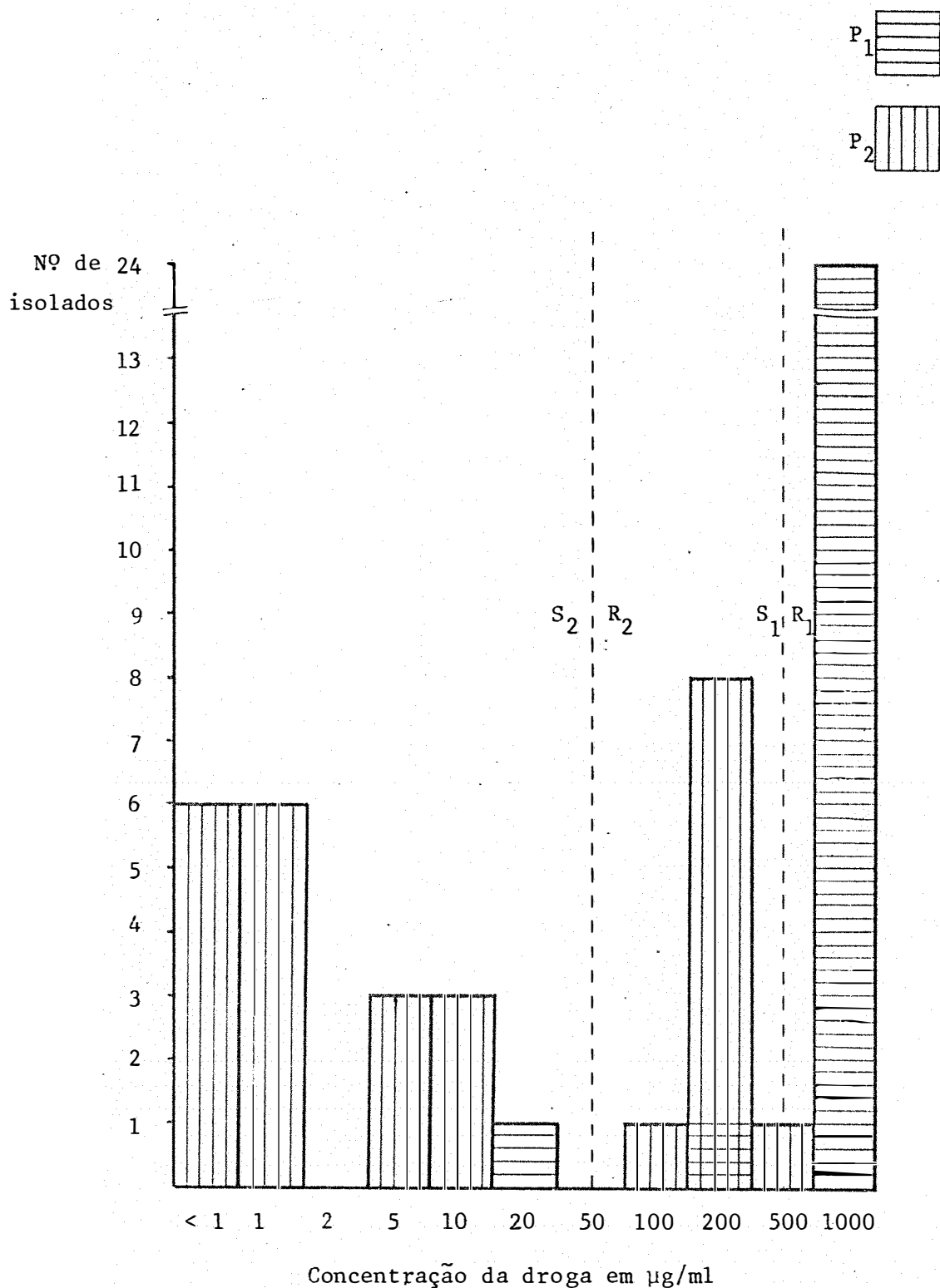


Figura 12. Distribuição gráfica dos níveis de resistência à Cloranfenicol nas Populações P₁ e P₂ de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes do Hospital da Faculdade de Medicina de Botucatu.

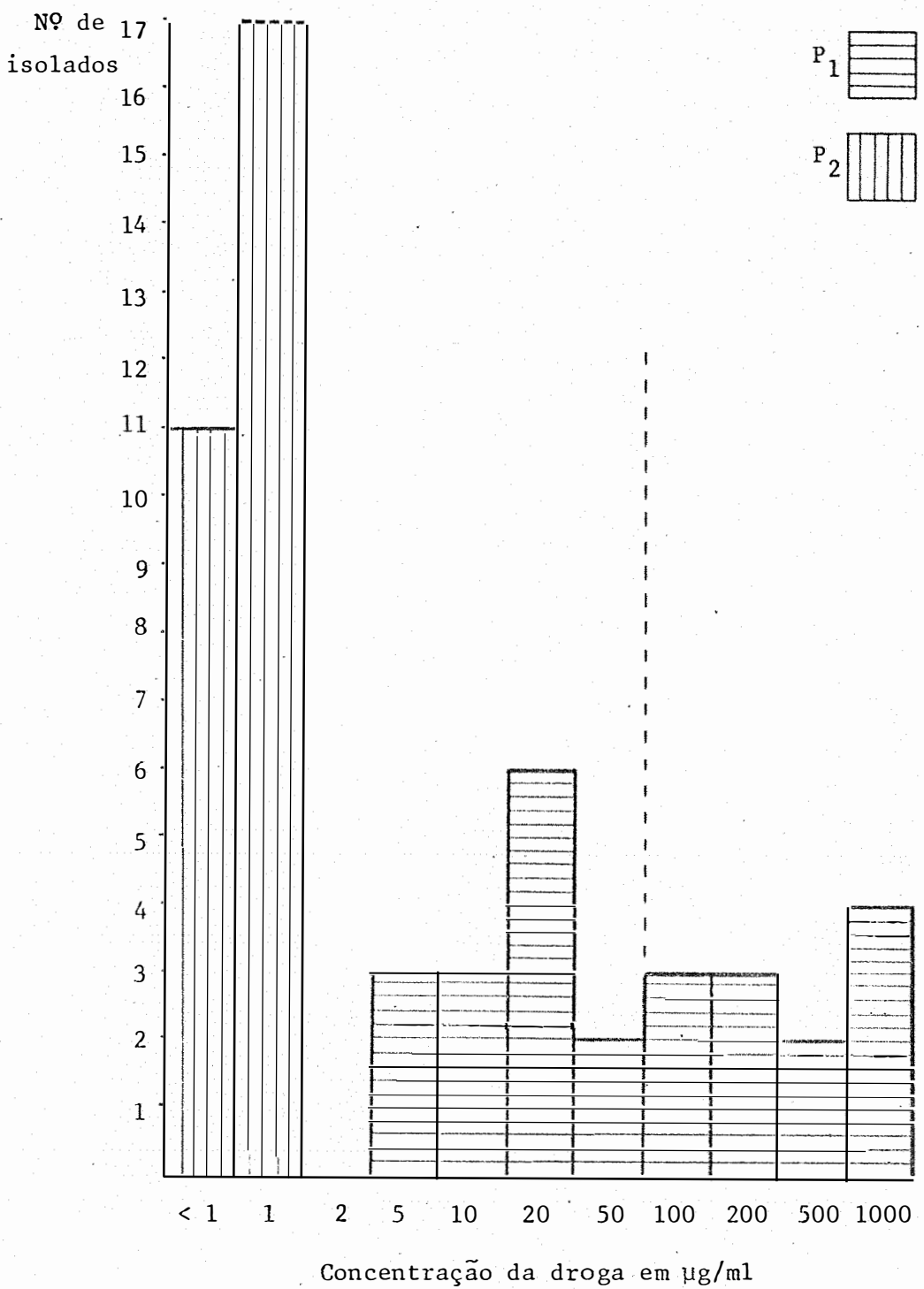


Figura 13. Distribuição gráfica dos níveis de resistência à Fosfomicina nas Populações P₁ e P₂ de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes do Hospital da Faculdade de Medicina de Botucatu.

4.2. Modelos de resistência

As Tabelas 9, 10 e 11 trazem os modelos de resistência propostos para as amostras de *P. aeruginosa* e *S. aureus* utilizados.

4.3. Porcentagem de resistência

Nas Tabelas 12 e 13 foram colocados cada modelo de resistência obtido, juntamente com o número de bactérias observadas e as porcentagens de resistência.

4.4. Níveis de resistência

O tempo de uso de cada antibiótico foi obtido através de informações fornecidas pelos laboratórios fabricantes; esse tempo, juntamente com os níveis de resistência, obtido para cada droga e o número de isolados que alcançou determinado nível de resistência encontram-se na Tabela 14 para *P. aeruginosa* e Tabela 15 para *S. aureus*.

O ano de lançamento dos antibióticos e a porcentagem de isolados resistentes obtidos para cada um acham-se na Tabela 16.

TABELA 9. Modelos de resistência de 68 amostras de *S. aureus*, isoladas de pacientes do Hospital Amaral Carvalho de Jaú, SP.

Amostras	Drogas ($\mu\text{g/ml}$)						Modelo de Resistência
	Ox	Cl	Sm	Tc	Km	Pn	
1	S	S	S	S	S	S	S
2	1000	1000	100	100	1000	50	Ox Cl Sm Tc Km Pn
3	S	100	S	S	S	S	Cl
4	S	50	S	S	S	S	Cl
5	S	1000	S	200	100	S	Cl Tc Km
6	S	100	S	200	S	S	Cl Tc
7	S	1000	100	100	100	S	Cl Sm Tc Km
8	S	200	S	S	S	S	Cl
9	S	200	S	200	S	S	Cl Tc
10	S	100	S	200	S	S	Cl Tc
11	S	200	S	100	S	S	Cl Tc
12	S	200	S	200	S	S	Cl Tc
13	S	200	S	200	S	S	Cl Tc
14	S	1000	1000	100	500	S	Cl Sm Tc Km
15	S	500	200	500	200	S	Cl Sm Tc Km
16	S	200	S	500	S	S	Cl Tc
17	S	200	S	100	S	S	Cl Tc
18	S	100	S	100	200	S	Cl Tc Km
19	S	1000	100	500	S	50	Cl Sm Tc Pn
20	S	S	S	S	S	S	S
21	S	S	S	S	S	S	S
22	S	1000	S	S	S	S	Cl
23	S	50	100	S	200	S	Cl Sm Km
24	S	1000	200	500	S	S	Cl Sm Tc

Amos tras	Drogas ($\mu\text{g/ml}$)						Modelo de Resistência
	Ox	Cl	Sm	Tc	Km	Pn	
25	S	50	200	500	S	S	Cl Sm Tc
26	S	500	100	S	S	S	Cl Sm
27	S	50	200	500	S	S	Cl Sm Tc
28	S	1000	S	500	S	S	Cl Tc
29	S	50	S	S	S	S	Cl
30	S	50	S	200	S	S	Cl Tc
31	S	50	100	500	S	S	Cl Sm Tc
32	S	50	S	S	S	S	Cl
33	S	200	S	S	S	S	Cl
34	S	50	S	200	S	S	Cl Tc
35	S	500	500	200	S	S	Cl Sm Tc
36	S	500	50	200	200	S	Cl Sm Tc Km
37	S	1000	100	100	S	S	Cl Sm Tc
38	S	500	500	200	S	S	Cl Sm Tc
39	S	500	50	100	S	S	Cl Sm Tc
40	S	500	50	200	200	S	Cl Sm Tc Km
41	S	1000	100	100	100	S	Cl Sm Tc Km
42	S	1000	50	100	S	S	Cl Sm Tc
43	S	500	50	S	S	S	Cl Tc
44	S	500	S	S	S	S	Cl
45	S	1000	100	200	200	S	Cl Sm Tc Km
46	S	1000	50	100	500	S	Cl Sm Tc Km
47	S	500	50	100	100	S	Cl Sm Tc Km
48	S	500	S	200	S	S	Cl Tc
49	S	1000	100	200	S	S	Cl Sm Tc
50	S	1000	100	100	S	S	Cl Sm Tc
51	S	1000	S	100	S	S	Cl Tc
52	S	1000	200	200	1000	500	Cl Sm Tc Km Pn
53	S	50	200	S	S	S	Cl Tc

TABELA 9. Continuação

Amos tras	Drogas ($\mu\text{g/ml}$)						Modelo de Resistência
	Ox	Cl	Sm	Tc	Km	Pn	
54	S	1000	S	S	S	100	Cl Pn
55	100	1000	1000	200	S	100	Ox Cl Sm Tc Pn
56	100	50	S	200	S	S	Ox Cl Tc
57	S	50	S	S	S	S	Cl
58	S	50	S	200	S	S	Cl Tc
59	S	1000	S	200	S	S	Cl Tc
60	S	1000	S	S	S	S	Cl
61	S	1000	S	S	S	S	Cl
62	S	50	200	100	200	S	Cl Sm Tc Km
63	S	1000	100	100	S	S	Cl Sm Tc
64	S	500	S	100	S	S	Cl Tc
65	S	50	S	100	S	S	Cl Tc
66	S	50	S	100	S	S	Cl Tc
67	S	500	S	100	S	S	Cl Tc
68	S	500	S	100	S	S	Cl Tc

Ox = oxacilina; Cl = cloranfenicol; Sm = estreptomicina; Tc = tetraciclina; Km = canamicina; Pn = penicilina
S = sensível

TABELA 10. Modelos de resistência de 26 amostras pertencentes à população 1 de *P. aeruginosa* isoladas no ano de 1980 no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu-SP.

Amostras	Drogas ($\mu\text{g/ml}$)							Modelo de Resistência						
	Ak	Gm	Ss	Tm	Cr	Cl	Fs							
1	S	S	S	S	500	1000	S	Cr	Cl					
2	20	S	S	S	500	1000	1000	Ak	Cr	Cl	Fs			
3	20	S	S	S	500	1000	500	Ak	Cr	Cl	Fs			
4	50	200	S	S	S	1000	1000	Ak	Gm	Cl	Fs			
5	50	200	S	S	S	1000	200	Ak	Gm	Cl	Fs			
6	100	500	500	500	500	1000	500	Ak	Gm	Ss	Tm	Cr	Cl	Fs
7	50	200	100	100	S	1000	200	Ak	Gm	Ss	Tm	Cl	Fs	
8	50	100	200	200	S	1000	S	Ak	Gm	Ss	Tm	Cl		
9	50	S	200	200	S	1000	S	Ak	Ss	Tm	Cl			
10	50	S	200	200	S	1000	S	Ak	Ss	Tm	Cl			
11	20	S	100	100	S	1000	S	Ak	Ss	Tm	Cl			
12	200	200	200	200	S	1000	S	Ak	Gm	Ss	Tm	Cl		
13	50	500	200	200	S	1000	100	Ak	Gm	Ss	Tm	Cl	Fs	
14	50	S	200	200	S	1000	200	Ak	Ss	Tm	Cl	Fs		
15	50	200	S	S	S	1000	100	Ak	Gm	Cl	Fs			
16	100	200	S	50	S	1000	100	Ak	Gm	Tm	Cl	Fs		
17	100	500	200	200	S	1000	S	Ak	Gm	Ss	Tm	Cl		
18	S	S	S	S	S	1000	1000	Cl	Fs					
19	S	S	S	S	S	1000	1000	Cl	Fs					
20	S	200	200	S	S	S	S	Gm	Ss					
21	S	100	100	S	S	S	S	Gm	Ss					

Amos- tras	Drogas ($\mu\text{g/ml}$)							Modelo de Resistência
	Ak	Gm	Ss	Tm	Cr	Cl	Fs	
22	S	S	S	S	S	1000	S	Cl
23	50	500	500	50	S	1000	S	Ak Gm Ss Tm Cl
24	50	500	500	200	S	1000	S	Ak Gm Ss Tm Cl
25	50	500	500	50	S	1000	S	Ak Gm Ss Tm Cl
26	S	S	S	S	S	1000	S	Cl

S = sensível; Ak = amicacina; Gm = gentamicina; Ss = sisomici-
na; Tm = tobramicina; Cr = carbenicilina; Cl = cloranfenicol;
Fs = fosfomicina

TABELA 11. Continuação

Amos tras	Drogas ($\mu\text{g/ml}$)							Modelo de Resistência
	Ak	Gm	Ss	Tm	Cr	Cl	Fs	
24	S	S	S	S	S	S	S	Sensível
25	S	S	S	S	S	S	S	Sensível
26	S	S	S	S	S	S	S	Sensível
27	S	S	S	S	S	S	S	Sensível
28	S	S	S	S	S	S	S	Sensível

S = sensível; Ak = amicacina; Gm = gentamicina; Ss = sisomicina;
 Tm = tobramicina; Cr = carbenicilina; Cl = cloranfenicol; Fs =
 fosfomicina.

TABELA 12. Modelos de resistênça encontrados para *S. aureus*.

Modelo de Resistênça	Número de Isolados	% de isolados (*)
Ox Cl Sm Tc Km Pn	1	(1,5)
Cl Sm Tc Km Pn	1	(1,5)
Ox Cl Sm Tc Pn	1	(1,5)
Cl Sm Tc Km	10	(14,7)
Cl Tc Km	2	(2,9)
Cl Sm Km	1	(1,5)
Cl Sm Tc	13	(19,1)
Ox Cl Tc	1	(1,5)
Cl Tc	22	(32,4)
Cl Sm	1	(1,5)
Cl Pn	1	(1,4)
Cl	11	(16,2)
Sensíveis	3	(4,4)

Ox = oxacilina; Cl = cloranfenicol; Sm = estreptomicina;
 Tc = tetraciclina; Km = canamicina; Pn = penicilina

(*) Cálculo baseado no número total de amostras.

TABELA 13. Modelos de resistência encontrados para as populações P₁ e P₂ de *P. aeruginosa*.

Modelo de Resistência	Número de Isolados		% de isolados (*)	
	P ₁	P ₂	P ₁	P ₂
Ak Gm Ss Tm Cr Cl Fs	1	0	3,8	0
Ak Gm Ss Tm Cl Fs	2	0	7,7	0
Ak Gm Ss Tm Cl	6	0	23,1	0
Ak Ss Tm Cl Fs	1	0	3,8	0
Ak Gm Tm Cl Fs	1	0	3,8	0
Gm Ss Tm Cr Cl	0	4	0	14,3
Ak Cr Cl Fs	2	0	7,7	0
Ak Gm Cl Fs	3	0	11,5	0
Ak Ss Tm Cl	3	0	11,5	0
Gm Ss Tm Cr	0	1	0	3,6
Cr Cl	1	0	3,8	0
Cl Fs	2	0	7,7	0
Gm Ss	2	1	7,7	3,6
Ss Cl	0	4	0	14,3
Ss	0	3	0	10,7
Cl	2	1	7,7	3,6
Sensíveis	0	14	0	50

Ak = amicacina; Gm = gentamicina; Ss = sisomicina; Tm = tobramicina; Cr = carbenicina; Cl = cloranfenicol; Fs = fosfomicina.

(*) Cálculo baseado no número total de amostras.

TABELA 14. Maiores níveis de resistência, número de isolados e tempo de lançamento encontrados para as populações P₁ e P₂ de *P. aeruginosa*.

Antibióticos	Níveis de Resistência µg/ml		Tempo de lançamento (anos)	
	P ₁	P ₂	P ₁	P ₂
Amicacina	200(1)*	Sensíveis	6	9
Carbencilina	500(5)	1000(1)	9	12
Cloranfenicol	1000(24)	500(1)	26	29
Fosfomicina	1000(4)	Sensíveis	7	10
Sisomicina	500(7)	20(3)	5	8
Tobramicina	500(1)	5(5)	4	7
Gentamicina	500(6)	20(1)	13	16

(*) Número de isolados encontrados

TABELA 15. Maiores níveis de resistência, número de isolados e tempo de lançamento encontrados para *S. aureus*.

Antibióticos	Níveis de resistência µg/ml	Tempo de lançamento (anos)
Penicilina	500(1)*	31
Estreptomicina	1000(2)	31
Oxitetracilcina	500(8)	29
Oxacilina	1000(1)	19
Canamicina	1000(3)	7
Cloranfenicol	1000(23)	26

(*) Número de isolados encontrados

TABELA 16. Antibióticos, ano de lançamento e porcentagem de resistência para isolados de *S. aureus* e *P. aeruginosa* utilizados no trabalho.

Antibióticos (ordem cronológica de lançamento)	% de Isolados Resistentes		
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
		P ₁	P ₂
Penicilina (1950)	7,3	-	-
Estreptomicina (1950)	44,1	-	-
Tetraciclina (1952)	72,0	-	-
Cloranfenicol (1955)	95,5	92,1	32,2
Oxacilina (1962)	4,4	-	-
Gentamicina (1968)	-	57,6	21,5
Carbenicilina (1972)	-	23,0	17,9
Fosfomicina (1974)	-	46,0	0
Canamicina (1974)	22,1	-	-
Amicacina (1975)	-	72,9	0
Sisomicina (1976)	-	57,6	46,5
Tobramicina (1977)	-	53,7	17,9

(-) Antibiótico não utilizado

4.5. Resistência múltipla

Devido ao grande número de bactérias resistentes, muitos foram também os diferentes tipos de resistência múltipla obtidos. Esses dados, bem como suas respectivas porcentagens estão na Tabela 17 para *S. aureus* e Tabela 18 para *P. aeruginosa*.

4.6. Presença de plasmídios detectados em gel de agarose

Devido à dificuldade técnica de se detectar plasmídios por meio de eletroforese em gel de agarose, em *S. aureus*, somente foram ensaiadas as amostras de *P. aeruginosa*. Para isso, escolheu-se algumas amostras ao acaso.

A figura 14 mostra os perfis de migração eletroforética em gel de agarose, do DNA, para as amostras acima referidas e as marcas de resistência a antibióticos encontradas para cada amostra.

TABELA 17. Porcentagem de diferentes tipos de resistência encontrada para isolados de *S. aureus* em relação aos 6 antibióticos utilizados.

Antibióticos	% Resistência					
	Simple	Dupla	Tripla	Quadru pla	Quin- tupla	Sextu- pla
Cloranfenicol	16,2	33,7	26,5	14,7	3,0	1,5
Tetraciclina	0	27,9	25,0	14,7	3,0	1,5
Estreptomicina	0	4,4	20,6	14,7	3,0	1,5
Canamicina	0	0	5,9	13,2	1,5	1,5
Penicilina	0	1,4	0	1,5	3,0	1,5
Oxacilina	0	0	1,5	0	1,5	1,5

TABELA 18. Porcentagens de diferentes tipos de resistência encontradas para os isolados das populações P₁ e P₂ de *P. aeruginosa*.

Antibióticos	% Resistência.													
	Simples		Dupla		Quadrupla		Quintupla		Sextupla		Setupla			
	P ₁	P ₂	P ₁	P ₂	P ₁	P ₂	P ₁	P ₂	P ₁	P ₂	P ₁	P ₂		
Cloranfenicol	7,7	3,6	11,5	14,3	30,8	0	30,8	14,3	7,7	0	3,8	0		
Carbenicilina	0	0	3,8	0	7,7	3,6	0	14,3	0	0	3,8	0		
Gentamicina	0	0	7,7	0	11,5	3,6	26,9	14,3	7,7	0	3,8	0		
Tobramicina	0	0	0	0	11,5	3,6	30,8	14,3	7,7	0	3,8	0		
Amicacina	0	0	0	0	30,8	0	30,8	0	7,7	0	3,8	0		
Sisomicina	0	10,7	7,7	14,3	11,5	3,6	26,9	14,3	7,7	0	3,8	0		
Fosfomicina	0	0	7,7	0	19,2	0	7,7	0	7,7	0	3,8	0		

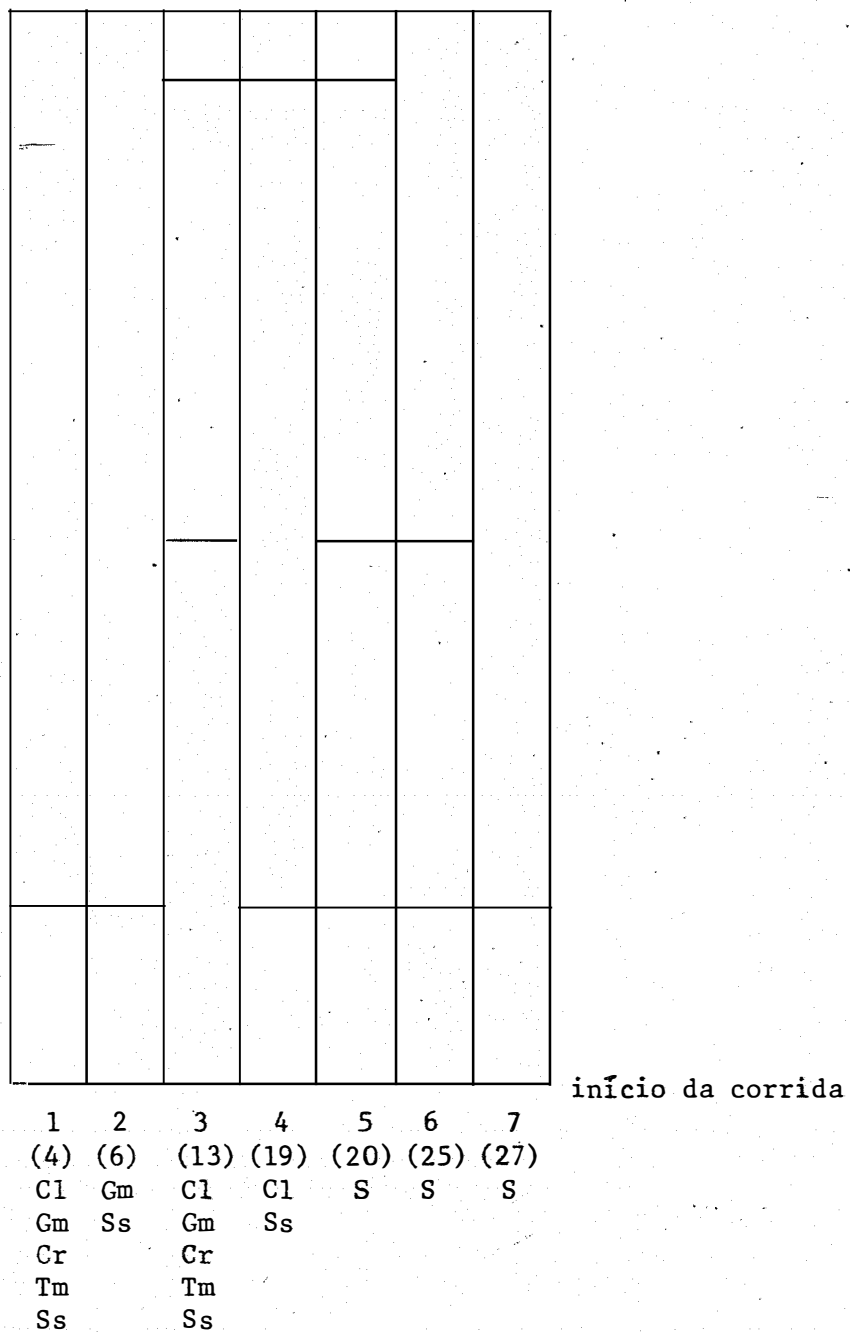


Figura 14. Perfis eletroforéticos das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* realizados em placa vertical. São também indicadas as marcas de resistência a antibióticos encontradas para cada amostra. Gm = Gentamicina; Ss = Sisomicina; Tm = Tobramicina; Cr = Cabenicilina; Cl = Cloranfenicol; S = sensível; () = número da amostra utilizada.

5. DISCUSSÃO

5.1. Níveis de resistência das amostras isoladas

5.1.1. *Staphylococcus aureus*

Pela observação da representação gráfica dos níveis de resistência (Figuras 1 a 6), verificou-se que a distribuição das amostras com relação a resistência ou sensibilidade dos antibióticos utilizados, foi bastante variável.

Com relação à Oxacilina(Figura 1) notou-se que a maioria das amostras foram sensíveis a essa droga. Apesar desse antibiótico ser um derivado semi-sintético da penicilina, para o qual existe um grande número de enzimas que o hidro-lizam, não houve aqui uma ação penicilinasê efetiva, uma vez que, somente três amostras resistentes foram encontradas.

Pela observação da Figura 2 pode-se verificar

que a situação da resistência frente ao cloranfenicol é bem diferente da anterior: 23 isolados apresentam resistência em seu nível máximo (1000 µg/ml) e os restantes, em sua maioria, estão dentro dos níveis de resistência normal encontrado para esse antibiótico, observando-se somente três amostras sensíveis. O nível máximo obtido por SIQUEIRA (1976) havia sido de 500 µg/ml, notando-se que até 1980, quando ocorreu a análise dessa população, o aumento da resistência ao cloranfenicol foi bastante significativo.

Analisando-se os níveis de resistência das amostras em relação à estreptomicina (Figura 3) observa-se uma distribuição equilibrada entre isolados resistentes e sensíveis. LACEY (1975) encontrou dois níveis de resistência diferentes para esse antibiótico. Assim, um nível de 10 µg/ml seria causado por gene cromossômico e níveis de 100 µg/ml por gene plasmidial. Sugere-se uma ação conjunta dos genes cromossômicos e plasmidiais, na população, uma vez que, ao nível de 100 µg/ml, tem-se a maior concentração de isolados e encontram-se também amostras a níveis iguais ou inferiores a 10 µg/ml.

Pela observação da Figura 4 verifica-se que a resistência à tetraciclina concentra-se em maior número ao nível dos 100-200 µg/ml. São encontrados 40 isolados nesse nível, o que sugere, em acordo com as observações de NOBLE e

NAIDOO (1978), tratar-se de herança plasmidial quando o nível de resistência encontra-se na faixa de 25 a 300 µg/ml.

Mesmo apresentando amostras com altos níveis de resistência à canamicina (Figura 5), 79% das amostras foram sensíveis a esse antibiótico.

Para a penicilina (Figura 6) encontrou-se um maior número de bactérias sensíveis. Somente três amostras foram consideradas resistentes. SIQUEIRA (1976) havia obtido níveis de até 200 µg/ml para penicilina.

Pela resistência apresentada por *S. aureus* nota-se que os números de isolados mais baixos (Tabela 15), foram obtidos quando se usou como antibióticos, a penicilina e a oxacilina; neste caso, ambas apresentam como grupamento químico, o ácido 6 amino penicilâmico. A bactéria consegue inativar esses antibióticos graças à produção de penicilinase. Essa enzima hidroliza a ligação C-N do anel β lactamas da penicilina causando inativação irreversível, sendo sua produção codificada por plasmídios. MITSUHASHI (1979) resumiu a ação das penicilinas em seus respectivos substratos. (Tabela 19).

Tabela 19. Tipos de Penicilinase e seus respectivos substratos

Penicilinase	Substratos
Tipo I	Cefalosporina, penicilina
Tipo II	Oxacilina, metecilina, penicilina
Tipo III	Fenitilina, oxacilina, penicilina
Tipo IV	Cefaloridina, penicilina

Estreptomina e Canamicina são aminoglicosídeos e seus mecanismos de resistência podem ser explicados através de três formas: (a) produção de enzimas que inativam o antibiótico; (b) troca na subunidade 30 S do ribossoma que é sítio de ação do antibiótico e (c) diminuição da permeabilidade celular a essas drogas. (MITSUHASHI, 1979).

Muitos pesquisadores têm proposto que a resistência à tetraciclina é causada por uma diminuição da permeabilidade da membrana celular a essa droga; *E. coli* e *S. aureus* se tornam altamente resistentes à tetraciclina depois que as células são incubadas em concentrações subinibitórias de tetraciclina. A indução dessa resistência em *S. aureus* é bloqueada por actinomicina D ou cloranfenicol, sugerindo que somente a síntese proteica da bactéria é requerida para essa indução. Com a aquisição da resistência ocorre uma diminuição no acúmulo

lo dessa droga na célula bacteriana, resultante de uma diminuição da permeabilidade à tetraciclina. (MITSUHASHI, 1979).

Os altos níveis de resistência ao cloranfenicol podem ser explicados por dois mecanismos: (a) Inativação da droga e (b) diminuição da permeabilidade nas células resistentes. A inativação enzimática ao cloranfenicol é feita pela enzima CATase, em presença de acetil CoA. Foi observado também que a atividade da CATase varia dependendo do sítio de integração do gene cml ao cromossoma. A atividade é maior quando o gene cml está integrado perto da origem de replicação do cromossomo. Quando 2 ou 3 genes estão integrados ao mesmo cromossomo, a atividade enzimática resulta da soma das atividades de cada uma. Se o gene cml estiver presente no citoplasma, junto ao fator R, a atividade CATase é quatro a oito vezes maior do que no estado cromossomal, sugerindo a existência de 4 a 8 cópias do fator R por cromossomo. A atividade enzimática retorna ao nível expresso pelo fator R quando o gene cml é desligado do cromossomo. (MITSUHASHI, 1979).

Numa tentativa de associar-se resistência ou sensibilidade ao tempo de utilização dos antibióticos pela população, foi feito um levantamento junto aos laboratórios fabricantes para se obter o ano em que cada droga foi lançada para uso clínico (Tabela 14). Pouca correlação positiva foi encontrada pois foram encontrados altos níveis de resistência

tanto para antibióticos novos como para os com maior tempo de uso. A forma de utilização dessas drogas, seria um fator mais atuante na seleção de resistentes do que o tempo. Há que se considerar que, de maneira geral, os antibióticos são ministrados levando-se em conta sua atuação sobre as bactérias e não por análise de um antibiograma prévio.

5.1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Para melhor estudo da resistência a antibióticos, os isolados de *P. aeruginosa* foram separados em duas populações distintas (P_1 e P_2). A população P_1 constituiu-se de 26 amostras e a população P_2 de 28 amostras. Essas bactérias foram isoladas em épocas distintas, a P_1 em 1980 e a P_2 em 1983. Em cada análise (Figuras 7 e 13) estão diferenciadas graficamente as duas populações.

Na Figura 7 tem-se a distribuição gráfica dos níveis de resistência frente à amicacina e observa-se que as populações 1 e 2 são distintas. A P_1 se encontra distribuída entre os níveis de 5 a 500 $\mu\text{g/ml}$ e separadas em sensíveis e resistentes. A P_2 se coloca totalmente a nível menor que 1 $\mu\text{g/ml}$. A população 1 foi ensaiada coletando-se as amostras durante um ano todo (1980), de modo que, as coletas foram espaçadas. Já a População 2 foi recolhida num só tempo, dado o número de pacientes portadores de infecção causada por *Pseudomonas*. Essa variação no tempo de coleta da amostragem pode ser bastante sig

nificativa uma vez que no caso da população 2 pode-se estar à frente de uma mesma cepa contaminando um grande número de pacientes hospitalares.

—Ensaiou-se também a sensibilidade à gentamicina (Figura 8) e verificou-se que a P_2 foi mais sensível que a P_1 . Os dados obtidos para a P_2 vai de encontro aos de MORENO *et alii* (1973) onde a gentamicina foi o antibiótico com melhor atividade antibacteriana. Para a P_1 encontramos maiores níveis de resistência. BREMMER (1979) observou isolados resistentes a 160 $\mu\text{g/ml}$, enquanto o observado no presente trabalho foi de 500 $\mu\text{g/ml}$.

Através da figura 9 verifica-se, como nos casos anteriores, que a População 2 é também mais sensível que a 1 frente à sisomicina. BREMMER (1979) encontrou uma resistência máxima de 25 $\mu\text{g/ml}$, dado esse que se enquadra na P_2 , mas que é muito distante dos 500 $\mu\text{g/ml}$ observado para a P_1 .

A Figura 10 traz a distribuição gráfica dos níveis de resistência à tobramicina e verificou-se novamente que a P_2 é mais sensível que a P_1 . De acordo com os dados obtidos em literatura como 25 $\mu\text{g/ml}$ (MORENO *et alii*, 1976; WATANABE *et alii*, 1977), os observados no presente trabalho são bastante altos, uma vez que atingiram 500 $\mu\text{g/ml}$.

Não notou-se para carbenicilina (FIG. 11) a mesma separação populacional encontrada para antibióticos anteriormente discutidos. Nesse caso, as populações se sobrepõem.

Os níveis máximos de resistência foram de 500 µg/ml para ambas as populações, dado esse semelhante ao observado por LOWBURY *et alii* (1969) que foi de 512 µg/ml. Nota-se pois que tratam-se de duas populações altamente resistentes.

Para o antibiótico cloranfenicol (Figura 12) encontramos duas populações de *P. aeruginosa* bastante resistentes. Na P₁ quase a totalidade das amostras se encontra ao nível máximo de 1000 µg/ml. A P₂ mesmo apresentando uma distribuição mais uniforme tem amostras resistentes a 500 µg/ml.

Na Figura 13 observa-se as Populações 1 e 2 ensaiadas quanto à sensibilidade à fosfomicina e encontra-se uma População 2 altamente sensível e a População 1 distribuída em todos os níveis de resistência.

Depreende-se pela análise dos resultados obtidos que a população 2 é sensível à maioria das drogas antibacterianas empregadas, com exceção feita à carbenicilina e cloranfenicol. A população 1 se mostrou resistente a grande parte dos antibióticos usados sendo que carbenicilina e cloranfenicol foram os menos eficazes para *Pseudomonas aeruginosa*. As drogas com melhores atividades antibacterianas foram fosfomicina e amicacina seguidas de sisomicina e tobramicina. Os estudos sobre resistência a drogas em bactérias apresentam muita variabilidade devido ao grande número de fatores que podem alterar os resultados, incluindo-se desde forma de uso do antibiótico

até número de plasmídios envolvidos na transmissão da resistência. DE BIAGI (1982) observou que os isolados do gênero *Pseudomonas* apresentavam-se, em sua maioria, sensíveis à canamicina, estreptomicina e tetraciclina, uma vez que cresceram apenas na faixa de 50 µg/ml das drogas. Com relação ao cloranfenicol as amostras, em sua maioria, localizaram-se nas concentrações intermediárias dessa droga, ficando difícil uma distinção entre sensíveis e resistentes. Para a gentamicina, só ocorreram linhagens sensíveis. MORENO *et alii* (1973) observaram que a gentamicina era o antibiótico mais eficaz contra *Pseudomonas*. Em 1976, os mesmos autores verificaram que a Tobramicina apresentava atividade antibiótica melhor que gentamicina e carbenicilina.

Com relação à atividade bioquímica dos antibióticos ensaiados para *P. aeruginosa* nota-se que 4 antibióticos são aminoglicosídeos: gentamicina, amicacina, sisomicina e tobramicina e sofrem vários mecanismos de resistência, trazendo sérias consequências no caso de organismos gram negativos. Os aminoglicosídeos são amplamente usados em terapia desses microorganismos, principalmente em infecções hospitalares. Tornam-se ainda um problema mais complexo que a resistência a β lactamas e outros antibióticos devido à variabilidade de formas alostéricas da enzima que os inativam e que atuam em diferentes substratos. (DAVIS, 1981).

Carbenicilina e fosfomicina atuam ao nível de

membrana e paredes celulares, alterando a síntese ou a permeabilidade da mesma. Os antibióticos que impedem a síntese de parede celular podem causar nas células sensíveis, acúmulo de viridina difosfato e muramil peptídeos, precursores da síntese de parede celular; muitos bloqueiam a incorporação mucopeptídica em diferentes passos na síntese de parede. (SCHWINGHAMER, 1967 apud VALARINI, 1981).

Com relação à fosfomicina sabe-se que o mecanismo de resistência da bactéria consiste no fato da mesma perder o sistema de transporte do α (alfa) glicerofosfato, impedindo que o antibiótico chegue ao seu local de ação. A resistência bacteriana é do tipo cromossomal, não sendo encontrada, até o momento, resistência bacteriana transferível.

5.2. Modelos de Resistência múltipla

5.2.1. *Staphylococcus aureus*

O modelo de resistência de uma bactéria pode variar segundo o uso clínico do antibiótico, o qual causa seleção de bactérias resistentes, e segundo o mecanismo genético que confere a resistência.

Para *S. aureus* encontra-se (Tabela 12) maior número de isolados de bactérias apresentando modelo de resistência dupla seguida de tripla e simples. Verifica-se que 14,7% das bactérias foram resistentes a 4 antibióticos, 3,5% a 5 antibióti

cos e somente 1,5% a 6 antibióticos. Esses dados sugerem a presença de plasmídios nessas amostras uma vez que 3 marcas de resistência por célula bacteriana facilmente seriam transportadas por esses elementos extracromossômicos.

A Tabela 17 analisa os modelos de resistência para cada antibiótico. Cloranfenicol e Tetraciclina apresentam maiores porcentagens de resistência dupla e tripla. As porcentagens de resistência quádrupla se equivalem para o cloranfenicol, tetraciclina, estreptomicina e praticamente, também, para Canamicina. Penicilina e Oxacilina aparecem em menor escala percentual em todos os tipos de resistência.

O antibiótico "de escolha" para *S. aureus* é normalmente Penicilina G e Oxacilina e que aqui aparecem em menor número de vezes nos modelos de resistência. Os demais antibióticos estão sendo preteridos do uso clínico por apresentarem pouca eficiência, dado esse, compatível com o alto grau de resistência encontrado.

Na Tabela 16 encontra-se também o ano de lançamento de cada droga associada a sua % de resistência. Penicilina g e Oxacilina são os antibióticos para os quais foram encontrados menores taxas de resistência, sendo que o primeiro foi lançado no mercado em 1950. De acordo com os dados fornecidos pelos laboratórios fabricantes, nenhuma das duas drogas foram retiradas por algum tempo do uso comercial.

Sabe-se entretanto, que ocorre uma reciclagem natural dos antibióticos, ou seja, quando se tornam pouco eficazes são substituídos por outros mais novos, ou algum novo radical é acrescentado em uma fórmula antiga. Esse período de esquecimento permite que populações resistentes se tornem sensíveis pois deixa de existir mecanismos que pressionem essa seleção. Por outro lado, BERGAMIN FILHO (1974) e BERGAMIN FILHO *et alii* (1975) estabeleceram o conceito de "Força de Antibiótico", onde discutiram a existência de drogas "fortes" e "fracas" para isolados dentro de uma mesma espécie de microrganismo devido a diferentes locos mutados, conferindo resistência a mesma droga.

A estreptomicina que apresenta 44% de resistência demonstra claramente essa reciclagem. Na época em que foram ensaiados os antibióticos não encontrava-se essa droga disponível no mercado e clinicamente sabia-se que estava sendo pouco usada.

Tetraciclina, canamicina e cloranfenicol atualmente apresentam altas porcentagens de resistência e não sendo usadas como antibiótico "de escolha" para *S. aureus*, sugere-se, novamente, a existência de um período de esquecimento natural.

5.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pela análise da Tabela 13 pode-se observar os modelos de resistência obtidos para *P. aeruginosa*. Para a população 1 encontra-se maior número de amostras portando resistência quádrupla, seguida de dupla, quádrupla, simples, sextupla e uma amostra resistente a 7 antibióticos. Para a população 2 encontram-se 2 amostras com resistência quádrupla (28,3%), seguida de 1 tripla (3,6%), 1 quádrupla (3,6%) sendo a grande porcentagem dos isolados encontrados entre as sensíveis (50%).

Na Tabela 18 tem-se os modelos de resistência a cada antibiótico e pode-se notar que cloranfenicol e gentamicina apresentam maiores porcentagens de resistência seguida de carbenicilina, sisomicina e tobramicina. Amicacina e fosfomicina se encontram entre as porcentagens mais baixas.

Seria lógico inferir-se que os antibióticos lançados há mais tempo para uso clínico, tenham maior porcentagens de resistência e que antibióticos mais novos tenham menores taxas de resistência. Esse fato, entretanto, pode ser observado em somente alguns antibióticos. Cloranfenicol é um exemplo, pois com maior tempo de utilização clínica mostrou-se menos eficaz. A carbenicilina, com menor tempo de uso que o cloranfenicol, alcançou seus níveis de resistência. Gentamicina não vinha sendo utilizada clinicamente devido a sua ineficácia, fato esse comprovado pelas suas altas taxas de

resistência. As demais drogas, amicacina, fosfomicina, tobra micina e sizomicina, são relativamente recentes e apresentam menores índices de resistência.

Há que se salientar ainda, que as drogas anti microbianas são usadas de maneira profilática para impedir infecções hospitalares e complicações em cirurgia, fato esse que aumenta a pressão de seleção de bactérias resistentes.

5.3. Presença de Plasmídios

A interpretação dos resultados obtidos na corrida eletroforética em gel de agarose aqui utilizada, leva em conta, a migração das moléculas de DNA no gel; o DNA cromossômico que conseguir penetrar no gel bandeará numa posição intermediária que se apresentará difusa.

Plasmídios maiores (PM > 15 Mdal) bandearão acima da região cromossômica e plasmídios de pesos moleculares menores bandearão abaixo da região cromossômica.

Na Figura 14 observam-se os perfis eletroforéticos de amostras pertencentes a P₂ de *Pseudomonas aeruginosa*. As amostras 4 (1), 6 (2), 19 (4), 20 (5), 25 (6), 27 (7) apresentam uma banda com menor migração que corresponde a plasmídios de menor peso molecular; a região intermediária aparece nos perfis 3, 5, 6, uma região que provavelmente corresponde ao DNA cromossômico; verifica-se também uma migra

ção maior nas corridas 3, 4 e 5. Comparando-se com os modelos de resistência podemos verificar que os isolados 4 e 13 apresentam maior número de marcas de resistência e somente na amostra 13 pode-se observar uma região que corresponderia a um plasmídio maior. As migrações menores referem-se a amostras com menor número de marcas de resistência pertencendo provavelmente a plasmídios menores.

Pela análise acima pode-se constatar a presença de plasmídios nos isolados sem contudo, associá-las as marcas de resistência, uma vez que outros genes podem estar presentes nos plasmídios que não os aqui enfocados. Não foram feitas estimativas do peso molecular dos plasmídios pela ausência de isolados de *P. aeruginosa* transportando plasmídios de peso molecular conhecido.

Possivelmente muitos são os recursos que as bactérias dispõem para preservar suas espécies, e portanto faz-se necessário uma maior busca e pesquisa dos mecanismos de controle. DAVIES (1981) fez uma série de observações a esse respeito: a) Os mecanismos bioquímicos de resistência utilizados pelas bactérias retiradas de infecções hospitalares não são diferentes dos mecanismos que as bactérias encontradas na natureza realizam; b) mecanismos de resistência a antibióticos novos ou raramente usados têm sido encontrados em microrganismos produtores de antibióticos; c) a forte homologia bioquímica entre a resistência de isolados clíni-

cos e de bactérias produtoras de antibióticos tem sido usadas como base de hipótese, de que mecanismos de resistência plasmidial podem ter evoluído de organismos que produzem antibióticos (in natura); d) os mecanismos de resistência a um certo antibiótico podem ser limitados.

Pelo presente trabalho e através dos dados obtidos em literatura observa-se que inúmeras são as formas encontradas pelas bactérias para neutralizar a ação de drogas bactericidas, formas essas, que são "criações" do DNA bacteriano. É possível que uma simples troca de bases durante a síntese proteica, resulte numa nova forma de resistência. As pesquisas precisam se concentrar nesses mecanismos, pois dada a simplicidade do seu material genético, pode-se encontrar finalmente, complexas formas de resistência originadas em simples mecanismos celulares.

6. CONCLUSÕES

- (1) Resistência a drogas em *S. aureus* é variável em função do inibidor utilizado, principalmente;
- (2) Resistência a drogas em *P. aeruginosa*, é variável em função do inibidor utilizado, principalmente;
- (3) Resistência a drogas em *S. aureus* e *P. aeruginosa* nem sempre está associada ao tempo de lançamento do antimicrobiano pelo laboratório fabricante.

7. LITERATURA CITADA

ANNEAR, D.I. e V.T. ROSDAHL, 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.

ASHESHOV, E., 1965. The genetics of penicillinase production in *Staphylococcus aureus* strain p. 80. *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.

- AZEVEDO, J.L.; S.A. CASSINI e A. OLIVEIRA, 1982. Replicador multi-alça para uso geral em bacteriologia. *Poliagro* 4: 11-18.
- BERGAMIN FILHO, A., 1973. O conceito de força de drogas ilustrado com resistência de *Corynebacterium michiganense* (Smith) Jensen a antibióticos. Dissertação apresentada à ESALQ/USP, para obtenção do título de Mestre. 51p.
- BERGAMIN FILHO, A.; H. KIMATI e J.L. AZEVEDO, 1975. O conceito de força de drogas. *Summa Phytopathologica*, 1:31-42.
- BREMNER, D.A., 1979. Transfer of Plasmid mediated antibiotic resistance in strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Auckland. *Journal of Medical Microbiology*, 12:303-310.
- BIRBOIM, H.C.; DOLY, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research*, 7:1513-1523.
- CÂMARA, F.P. e A.M. CARDOSO, 1981. Epidemiologia da resistência plasmidial a drogas em salmonelas isoladas em esgotos da cidade do Rio de Janeiro. *Revista de Microbiologia*, 12:14-16.
- CHOPRA, I. e I.G.B. HOWE, 1978. Bacterial resistance to the tetracyclines. *Microbiological Reviews*, 42:707-724.

- COHEN, S.S., 1976. Transposable genetic elements and plasmid evolution. *Nature*, London, 263:731.
- CUNHA, M.A.S. e I. SUASSUNA, 1980. Níveis de sensibilidade "in vitro" de *Salmonella thypimurium* isoladas no Brasil, no período de 1930 a 1973, a antimicrobianos de emprego clínico. *Revista de Microbiologia*, 11:113-116.
- DATTA, N. e R.W. HEDGES, 1972. R factors identified in Paris, some conferring gentamicin resistance, constitute a new compatibility group. *Anneur Institute Pasteur*, 123:849-852.
- DAVIES, J.E., 1981. Molecular Biology, Pathogenicity, and Ecology of Bacterial Plasmids. Edited by Stuart B. Servy, Clowes, R.C.; Koenig, E. 145-156.
- DE BIAGI, C.M.R., 1982. Fatores que atuam na produção de bactericinas de bactérias fitopatogênicas. Dissertação apresentada à ESALQ/USP para obtenção do título de Doutor. 140p.
- FALCÃO, D.P.; M.B. LIMA, E. MARINI e M.T. SHIMIZU, 1982. Resistência a drogas em enterobactérias isoladas de alimentos. *Revista Microbiologia*, 13:402-411.
- FARAR, E.W., 1981. Evolution of plasmid R in hospital. Edited by Stuart B. Servy, Clowes R.C. Koenig, E. 157-165.

- FALKINER, R.R.; C.T. KEANE; M. DALTON; M.T. CLANCY e G.A. JACOB, 1977. Cross infection in a surgical ward caused by *Pseudomonas aeruginosa* with transferred resistance to gentamicin and tobramycin. *Journal Clinical Pathology*, 30:731-737.
- GILLELAND Jr., H.E. e R.D. LYLE, 1979. Chemical alteration in cell envelop of polimixin - Resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Journal of Bacteriology*, 183:839-845.
- INGRAM, J.M. e M. HASSAN, 1975. The resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to chloranphenicol. *Canadian Journal of Microbiology*, 21:1185-1191.
- 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.
- KASUGA, T.H. HASHIMOTO e S. MITSUHASHI, 1968. Drug resistance of *Staphylococci*. *Journal of Bacteriology*, 95:1764-1766.
- KANABE, H.; T. NAITO e S. MITSUHASHI, 1975. Acetylation of amikacin, a new semisynthetic antibiotic by *Pseudomonas aeruginosa* carrying R factor. *Antimicrobial Agentes Chemoterapy*, 7:50-54.

- KNOTHE, H. e I. KRČMĚRY, 1979. Amikacin and Netilmicin Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Incidence and Transfer. *Chemotherapy*, 25:23-29.
- LACEY, R.W. e I. CHOPRA, 1972. Evidence for mutation to Streptomycin resistance in clinical strain of *Staphylococcus aureus*. *Journal General Microbiology*, 73:175.
- LACEY, R.W. e I. CHOPRA, 1973. Genetic studies of a multi-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Journal Medical Microbiology*, 7:285-297.
- LACEY, R.W. e J. GRINSTED, 1973. Genetic analysis of methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*; evidence for their evolution from a single clone. *Journal Medical Microbiology*, 6:516.
- LACEY, R.W. e I. CHOPRA, 1974. Genetic studies of a multi-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Journal Medical Microbiology*, 7:285-297.
- LACEY, R.W., 1975. Antibiotic resistance plasmid of *S. aureus* and their clinical importance. *Bacteriology Reviews*, 39:1-32.

- LOWBURY, E.L.; H.A. LILLY; A. KIDSON; G.A. AYLIFFLE e R.J. JONES, 1969. Sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics. Emergence of strain highly resistant to carbenicillin. *The Lancet*, 30:448-452.
- LOWBURY, E. e R. JONES, 1957. Treatment and prophylaxis for *Pseudomonas* infections, in Brocin M. (ed.). Resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. John Willey, London 237. Apud Dean H.F. A.F. Morgan, V. Asche, B.W. Holliday, 1977. Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Australian Hospitals Haring R. Plasmid Determined Antibiotic Resistance. *The Medical Journal of Australia*, 116-119.
- MAGALHÃES, M.A. VERÁS, A., 1976. Ineficácia da tobramicina in vitro sobre *Pseudomonas* gentamicina resistentes. *Revista Microbiologia*, 1:4-6.
- MITSUHASHI, S.; M. MORIMURA KONOK e H. OSHIMO, 1963. Elimination of drug resistance of *S. aureus* by treatment with acriflavine. *Journal of Bacteriology*, 86:162-164.
- MITSUHASHI, S.; H. HASHNIMOTO, M. KONO e M. MORIMURA, 1965. Drug resistance of staphylococci. *Journal Bacteriology*, 89:988-992.
- MITSUHASHI, S., 1979. Resistance Plasmids. *Molecular & Cellular Biochemistry*, 26:135-181.

MORENO, G.; LOPES, C.A.M., De CARLIS, R.M.S.T. 1973.

Resistência a drogas em bactérias gram negativas isoladas de secreções purulentas. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, 15:166-121.

MORENO, G.; GOMES, M.C.; LOPES, M. 1976. Atividade "in

vitro" da tobramicina, gentamicina e carbenicilina. *Botucatu Científica*, Série B, 20:23-28.

NOBLE, W.C., 1977. Variation in the Prevalence of

Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* from Human skin and Nares. *Journal of General Microbiology*, 98:125-132.

NOBLE, W.C. e J. NAIDOO, 1978. Evolution of Antibiotic

resistance in *Staphylococcus aureus*: The role of the skin. *British Journal of Dermatology*, 98:481-489.

OLSEN, R.H. e P. SHIPHY, 1973. Host range and properties

of the *Pseudomonas aeruginosa* R factor r 1822. *Journal Bacteriology*, 113:772-780.

POTTER, A.A. e LOUTIT, J., 1983. FP₂ plasmid curing in *P.*

aeruginosa. *Canadian Journal Microbiology*, 29:732-733.

REANNEY, D., 1976. Extracomossomal elements as possible

agents of adaptation and development. *Bacteriological Reviews*, 40:552.

- STEAL, D.V. e F.E.M. STRANGWAYS, 1976. Gentamicin-resistant. *Pseudomonas aeruginosa*. *The Lancet*, 3:747.
- SCHWINGHAMER, E.A. Effectiveness of Rhizobium as modified by mutation for resistance to antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 33:121-126, *Apud VALARINI* 1981, in Aspectos genéticos e ecológicos em espécies de *Rhizobium*. Dissertação apresentada à ESALQ/USP para obtenção do título de Mestre. 93p.
- SMITH, H.W., 1968. Antimicrobial drugs in animal fields. *Nature*, London, 218:728-731.
- SIQUEIRA, JR., 1976. Natureza e implicação da resistência a drogas em amostras de *S. aureus*. Dissertação apresentada à ESALQ/USP, para obtenção do título de Mestre. 71p.
- SIQUEIRA, JR. e J.L. AZEVEDO, 1978. Efeito do brometo de etídio em amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a drogas. *Revista Microbiologia*, 9:137-141.
- SOUSSY, C.J.; D.H. BOUANCHAUD; J. FONACE, A. DUBLANCHET; J. DURVAL, 1975. A gentamycin resistance plasmid in *S. aureus*. *Annual Microbiology*, 126:91-94.
- SOUZA, E.C., 1975. Resistência a drogas e propriedades colicinogênico em *Escherichia coli*. UFMG, Belo Horizonte. 76p. (Dissertação de Mestrado).

- TRABULSI, L.R., 1973. Aspectos médicos da resistência bacteriana a drogas. *Reviews Microbiology*. Suplemento Especial.
- VALARINI, M.J., 1981. Aspectos genéticos e ecológicos em espécies de *Rhizobium*. Dissertação apresentada à ESALQ/USP para obtenção do título de Mestre. 93p.
- WITCHITZ, J. e Y.A. CHABBERT, 1971. Resistance transferable a la gentamicine I. Expression du caractere de resistance. *Annual Institute Pasteur*, 121:733-742.
- YOUCCUM, R., H. AMANUMA, T.A. O'BRIEN, D.J. WAXMAN e J.C. SHOMINGER, 1982. Penicillin is and active-site inhibitor for Four Genera of Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 115:1150-1153.
- WATANABE, D.S.A. e G. MORENO, 1977. Identificação bioquímica e resistência a drogas em *Pseudomonas* isoladas de pacientes hospitalizados. *Revista Brasileira de Medicina*, 34:393-396.