

CAPACIDADE RECEPTORA DE *SALMONELLA* *TYPHI* A FATORES R*¹

MARIA LUIZA PALMEIRA **

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Guanabara

SUMÁRIO: Estudando a incidência de fatores infecciosos de resistência, em amostras de *Salmonella*, foi verificado apresentarem as amostras de *S. typhi* uma fraca habilidade receptora inicial a esses fatores.

RECOMBINAÇÕES genéticas entre *Escherichia coli* e *Salmonella* foram descritas por Baron (2, 3) e intensivamente estudadas por vários pesquisadores, mostrando ser constante a baixa capacidade receptora das *Salmonella*.

Baron, Carey e Spilman (2) isolaram, ao acaso, uma amostra de *Salmonella* com boa capacidade receptora, a qual foi capaz de, em recruzamentos, produzir recombinantes em frequência muito mais alta que a amostra original, o que os levou a propor, que a baixa frequência de recombinação inicial observada representava a seleção de uma rara amostra "mutante" receptora, em uma cultura estéril.

Jonhson, Falkow e Baron (5) demonstraram, mais tarde, que o aumento da capacidade receptora de híbridos formados do cruzamento entre *E. coli* e *S. Typhi* era devido à presença

de material genético de *E. coli* integrado ao cromossomo da *Salmonella*. Miyake (10, 11) descreveu recombinantes em cruzamentos entre *E. coli* Hfr e *Salmonella typhimurium* Lt- 7 mut, em frequência muito baixa. Essas populações LT- 7 mut foram consideradas heterogêneas no que dizia respeito à capacidade de cruzar com *E. coli* Hfr doadora, supondo Miyake serem essas amostras constituídas de uma mistura de células, férteis e inférteis, cerca de 1:100, em que apenas as primeiras eram capazes de se recombinar com *E. coli* Hfr. Essas receptoras férteis LT- 7 "fer", com alta capacidade receptora, haviam sido obtidas de uma população de *Salmonella* mut, as quais nunca haviam estado em contato com *E. coli*.

Estudos feitos por Okada e Watanabe (13) demonstraram que amostras de *S. typhimurium* são geralmente

1 Recebido para publicação a 30 de novembro de 1971.

* Departamento de Microbiologia e Imunologia — Laboratório de Bacteriologia.

** Pesquisador em Biologia.

receptoras pobres para a transferência de fatores R e para o fator sexo F de *E. coli*.

Kondo e Mitsuhashi (8) estudando a capacidade de amostras de *Salmonella typhi* agirem como receptoras de fago PICM, encontraram, nessas amostras, uma baixa capacidade de adsorção quando cruzadas com *E. coli* F⁺ lisogênica para o referido fago. Os autores explicaram este fato como sendo bastante semelhante ao apresentado por amostras de *Salmonella typhi*, que quando cruzadas com *E. coli* Hfr apresentavam uma baixa, porém, homogênea, capacidade receptora a fatores F.

Como resultado dessas experiências, ficou evidenciado que as células de uma população de *Salmonella* são geralmente incapazes de agir como boas receptoras de fatores F, bacteriófagos lisogênicos e outros plasmídios, quando cruzadas com amostras de *E. coli* K₁₂ F⁺ ou Hfr.

Baseados nesses estudos, examinamos neste trabalho a possibilidade de utilizar essas conclusões para explicar a ausência de fatores R em amostras de *Salmonella typhi*.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras bacterianas: 73 amostras de *Salmonella typhi*, 17 *Salmonella typhimurium* e 10 amostras pertencentes a outros sorotipos, isoladas de casos clínicos de Salmoneloses, nos Estados da Bahia, S. Paulo e Guanabara, no período 1965-1970, foram usadas como amostras receptoras sensíveis. Cultura de *E. coli* K₁₂ (St, Tc, Cl, Su), foi empregada como doadora de fatores R.

Meios seletivos: Culturas em meio líquido, foram feitas em caldo Penassay, segundo fórmula Difco.

Os meios sólidos usados foram: Meio de Levine Agar, Mueller Hinton, contendo azul de bromotimol como indicador e 2% de lactose, e agar simples extrato de carne. **Antibióticos e quimioterápicos:** cloridrato de tetraciclina (cyanamide Co.), cloranfenicol (Park-Davis), sulfato de estreptomicina (Fontoura-Wyelth), sulfato de Kanamicina (Laborterápica Bristol S.A.), ampicilina (Laborterápica Bristol S.A.), Heticilina (Laborterápica Bristol S.A.) e Sulfadiazina (Sofa United Pharmaceutical Nork 3 Praha).

As substâncias foram diluídas em água destilada estéril, a fim de obtermos uma concentração de 100 µg/ml e juntada aos meios de cultivo em volumes apropriados para se ter o teor desejado das drogas empregadas.

Determinação dos níveis de resistência: Para avaliação dos níveis de resistência aos antibióticos e à sulfadiazina, empregamos o método das diluições em placa.

Técnica de cruzamentos genéticos: Amostras receptoras de *Salmonella typhi* foram inoculadas em caldo Penassay e incubadas por 22 h a 37°C. Amostras de *E. coli* K₁₂ doadoras, após 18 h a 37°C foram diluídas a 1:20 e incubadas a 37°C por 2 h para a obtenção de cerca de 4X10⁸ células por ml, e 0,5 ml de cultura doadora foi misturada a 4,5 ml da receptora. A mistura após 24 h a 37°C foi diluída em série, e diluições apropriadas, espalhadas em meio seletivo com os antibióticos e a sulfa, e ainda em placas sem as drogas como controle.

Técnica de hemaglutinação: As verificações da capacidade hemaglutinante das culturas foram feitas segundo J. P. Duguid (4).

RESULTADOS

Trabalhamos com 73 amostras de *S. typhi* previamente identificadas bioquímica e sorologicamente, e testadas quanto à resistência à sulfadiazina (Su), cloranfenicol (Cm), estreptomicina (Sm), Kanamicina (Kn), tetraciclina (Tc), ampicilina (Am) e heticilina (He), apresentando, todas elas, resistências muito baixas na ordem

de 1 a 5 $\mu\text{g/ml}$, o que nos leva a supor serem as mesmas de origem cromossomial e não episomática. O mesmo não ocorreu com as amostras de *Salmonella typhimurium* em que todas

apresentaram altas resistências aos seis antibióticos e à sulfa. Quatro das dez amostras pertencentes a outros sorotipos, apresentaram resistência para estreptomicina.

TABELA I
NÍVEIS DE RESISTÊNCIA DAS AMOSTRAS AOS ANTIBIÓTICOS E A SULFADIAZINA

Antibióticos e Sulfa	Concentração inibidora $\mu\text{g/ml}$						
	Ampic.	Cloranf.	Tetrac.	Estrept.	Kanamic.	Hetac.	Sulfa
Amostras							
<i>Salm. typhi</i> 73 amostras	<1	>1<5	>1<5	>1<10	>1<5	<1	<1
<i>Salm. typhimurium</i> 17 amostras	>300	>300	>300	>200	>500	>300	>1.200
Outros sorotipos 10 amostras	<1	<1	>1<5	>200	<10	<1	>1<5

Nos cruzamentos feitos entre *E. coli* K₁₂ (St., Tc., Cl., Su.) e *Salmonella*, todas as amostras de *Salmonella typhi* foram estéreis, como receptoras de fatores R, notando-se uma frequência muito baixa, na ordem de 10⁻⁶ por células doadoras nos cruzamentos do tipo *E. coli* K₁₂ R⁺ e *S. typhimurium*. Nos cruzamentos entre *E. coli* K₁₂ R⁺ e *E. coli* F⁻ e, ainda, *E. coli* K₁₂ R⁺ e *Shigella*, a frequência de transferência foi cerca de 10⁻² e 10⁻³ por célula doadora, respectivamente. (Ver tabela II).

Por processos indiretos, devido a limitações técnicas, examinamos as propriedades ligadas à produção de

pilus e fertilidade, com base nas características bioquímicas e capacidade dessas amostras de aglutinarem ou não hemácias de cobaio: (4) (Ver tabela III).

A amostra de *S. typhi* 643 Lac⁺ F⁻ foi isolada por Baron de um cruzamento inicial entre a amostra 643 Lac⁻ e *E. coli* Hfr.

F⁰- Foi a designação dada por Baron a populações de algumas ou talvez muitas espécies de *Salmonella*, incapazes de agirem como receptoras. Essas células F⁰ podem, em baixa frequência, "mutar", ou de alguma maneira adquirir o estado F⁻. Essas células ocasionais F⁻ na população F⁰

TABELA II

FREQUÊNCIA DE TRANSFERÊNCIA DE FATORES R

Cruzamentos	Frequência de transferência	Transferência
K ₁₂ R ⁺ × <i>E. coli</i>	10 ⁻²	+
K ₁₂ R ⁺ × <i>Shigella</i>	10 ⁻³	+
K ₁₂ R ⁺ × <i>S. typhimurium</i>	10 ⁻⁶	+
K ₁₂ R ⁺ × <i>S. typhi</i>	—	—

TABELA III

PROPRIEDADES LIGADAS À FERTILIDADE

	Lactose	Arabinose	Xilose	Indol	Hemaglutinação	Pilição	Fertilidade
<i>Salm. typhi</i> 73 amostras	—	—	±	—	—	Não piliada	F ^o
<i>Salm. typhi</i> 643 Lac ⁻	—	—	—	—	—	Não piliada	F ^o
<i>Salm. typhi</i> 643 Lac ⁺	+	—	—	—	—	Não piliada	F ⁻
<i>E. coli</i> K ₁₂ Hfr.	+	+	+	+	+	piliada	F ⁺

Amostras: pilus⁺
pilus⁻

Arabinose⁺
Arabinose⁻

Hemaglutinação⁺ = F⁺
Hemaglutinação⁻ = F⁻

podem cruzar com *E. coli* Hfr, dando origem a recombinantes em baixa frequência (2, 3).

Desses resultados, concluímos não serem as 73 amostras de *S. typhi* amostras F⁻ típicas, o que nos levou a chamá-las F^o em analogia com a amostra 643 Lac⁻ isolada por Baron.

DISCUSSÃO

De nossas experiências ficou evidenciado que as 73 amostras de *Salmonella typhi* apresentavam um comportamento único, com relação à sua capacidade receptora inicial a fatores R. Tanto "in vitro" (quando cruzadas com *E. coli* K₁₂) onde as condições fisiológicas, como densidade da cultura de concentração de sais, pH, etc., são ideais, e também "in vivo", evidenciado pela inexistência de culturas de *S. typhi* com fatores de resistência, isoladas de fontes naturais.

Segundo **Jonhson, Falkow e Baron** (5, 6, 7), o aumento da habilidade receptora de híbridos em cruzamentos entre *E. coli* e *S. typhi* era devido à presença de material genético de *E. coli* integrado ao cromossomo de *S. typhi*. Estudos recentes, feitos pelos mesmos autores, revelaram que nesses cruzamentos frequentemente se formam híbridos haplóides em baixa frequência, além de uma grande incidência de diplóides parciais, que, em frequência muito alta, segregam fenótipos positivos e negativos. Estes fatos os fizeram supor que a capacidade de *S. typhi*, de recombinar D.N.A. de *E. coli* com seu próprio cromossomo, não ocorre tão eficientemente, além de admitirem não terem, ainda, conheci-

mento suficiente para explicar a fraca habilidade inicial de *S. typhi* para receber D.N.A. de *E. coli*.

No caso da infecção de amostras de *S. typhi* por fatores R, em que o problema da integração não existe, levou-nos a admitir que a ausência de F, ou de um fator relacionado, é uma explicação inadequada para a existência dessas raras células receptoras, como o é o estado F⁻ de *E. coli* K₁₂, já que estudos feitos por **Lederberg, Cavalli e Lederberg** (9) e **Orskov** (14) demonstraram que a maioria das amostras de *E. coli* "Wild-type" ao perderem F, transformam-se em células estéreis ou receptoras pobres quando cruzadas com *E. coli* K₁₂. Concluímos, baseados nesses fatos, que um determinante genético deva estar envolvido na capacidade receptora inicial das amostras de *S. typhi*, quando cruzadas com *E. coli* Hfr.

A grande incidência de amostras de *S. typhimurium* com resistência infecciosa por nós testadas, bem como a encontrada por outros autores (1, 2), pode ser explicada, pelo fato já demonstrado por **Anderson** (1), que a maioria das salmoneloses humanas, causadas por *S. typhimurium*, são de origem animal devido ao uso indiscriminado de antibióticos no tratamento de doenças animais, ou na conservação de alimentos. **Anderson** estudando 2 544 culturas humanas de *S. typhimurium*, isoladas em Londres em 1965, encontrou 96,5% dessas culturas com resistência infecciosa à droga, sendo 63% de origem bovina.

Quanto à existência natural de amostras de *S. typhi* com fatores de resistência, a numerosa bibliografia sobre o assunto nos dá notícia de uma

única amostra, colhida em Israel, portadora de um fator R com determinante de resistência para cloranfenicol, isolada das fezes de um doente com febre tifóide. O organismo inicialmente era sensível à droga. A origem desse fator R, no entanto, não foi explicada. (1).

A ausência de fatores R em amostras de *S. typhi* por nós encontrada e a frequência extremamente baixa na transferência de fatores R através da conjugação entre *E. coli* e *S. typhimurium*, constitui o nosso primeiro passo para a investigação do controle genético da especificidade hospedeira em *S. typhi*, fato já demonstrado em *S.*

typhimurium pelo isolamento de mutantes "fer".

O isolamento e a caracterização fenotípica de mutantes de *S. typhi* deficientes para restrição e modificação, a relação entre esses mutantes e a baixa capacidade receptora de tais amostras a fatores R estão sendo investigadas em nosso laboratório.

SUMMARY

On studying the appearance of resistance factors in samples of *Salmonella*, it was seen that *S. typhi* samples presented a weak initial recipient capacity to these factors.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — ANDERSON, E. S., 1968. The ecology of transferable drug resistance in the Enterobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 22: 131-180.
- 2 — BARON, L. S., CAREY, W. F. & SPILMAN, W. M., 1959. Genetic recombination between *E. coli* and *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 45: 976-984.
- 3 — BARON, L. S., SPILMAN, W. M. & CAREY, W. F., 1960. Diploid heterozygous hybrids from matings between *Escherichia coli* and *Salmonella typhosa*. *J. Exptl. Med.* 112: 361-372.
- 4 — DUGUID, J. P., ANDERSON E. S. & CAMPBELL, I., 1966. Fimbriae and adhesive properties in *Salmonella* — *J. Pathol. Bacteriol.* 92: 107-138.
- 5 — JOHNSON, E. M., FALKOW, S. & BARON L. S., 1964. Recipient ability of *Salmonella typhosa* in genetic crosses with *E. coli*. *J. Bacteriol.* 87: 54-60.
- 6 — JOHNSON, E. M., EASTERLING, S. B. & BARON, L. S., 1970. Conservation and transfer of *E. coli* genetic segments by partial diploid Hfr strains of *Salmonella typhosa* — *J. Bacteriol.* 104: 668-673.
- 7 — JOHNSON, E. M., EASTERLING, S. B. & BARON L. S., 1971. Inefficiency of Genetic recombination in hybrids between *Escherichia coli* e *Salmonella typhosa*. *J. Bacteriol.* 106: 243-249.
- 8 — KONDO, E. & MITSUHASHI, S., 1966. Drug resistance of Enteric Bacteria — VI — Introduction of bacteriophage PICM into *Salmonella typhi* and formation of PldCM and F-CM elements — *J. Bacteriol.* 91: 1787-1794.
- 9 — LEDERBERG, J., CAVALLI L. L. & LEDERBERG, E. M., 1952. Sex compatibility in *E. coli* — *Genetics* 37: 720-730.
- 10 — MIYAKE, T., 1959. Fertility factor in *Salmonella typhimurium*. *Nature*, 184: 657-658.

- 11 — MIYAKE, T., 1960. Mutator factor in *Salmonella typhimurium*. *Genetics*, 45: 11-14.
- 12 — MIYAKE, T., 1962. Exchange of genetic material between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* — *Genetics*, 47: 1043-1052.
- 13 — OKADA, M., WATANABE T. & MIYAKE, T., 1968. On the nature of the recipient ability of *Salmonella typhimurium* for foreign deoxyribonucleic acids. *J. Gen. Microbiol.*, 50: 241-252.
- 14 — ORSKOV, F. & ORSKOV I., 1961. The fertility of *Escherichia coli* antigen test strains in crosses with K12. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 51: 280.