

BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS EM ALIMENTOS

JOSÉ CAVALCANTE DE ALBUQUERQUE RIBEIRO DIAS & ERNESTO HOFER

A partir de 154 espécimens de alimentos, representados por hortaliças (alface), leite e merenda escolar, obteve-se o isolamento e identificação de 400 amostras de bacilos Gram negativos. Esta amostragem se distribuiu em 339 enterobactérias (Escherichia, Shigella, Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter, Serratia e Proteus) e 61 de gêneros afins (Acinetobacter, Flavobacterium, Aeromonas e Pseudomonas).

Submetendo-se as culturas aos antimicrobianos: sulfadiazina (Su), estreptomomicina (Sm), tetraciclina (Tc), cloranfenicol (Cm), canamicina (Km), ampicilina (Ap), ácido nalidíxico (Nal) e gentamicina (Gm), observou-se apenas seis estirpes sensíveis a todas as drogas e sensibilidade absoluta à Gm. A predominância dos modelos Su (27,6%) e Su-Ap (39,6%) incidiu nas enterobactérias, enquanto que, 18,0% para Ap e 9,8% para Su-Ap foram detectados nos gêneros afins.

Para caracterização da resistência foram realizados testes de conjugação e a totalidade das culturas não revelou transferência para o gene que confere resistência ao ácido nalidíxico.

Relevantes são as taxas de amostras R⁺ observadas nos bacilos entéricos, oscilando em torno de 90% (leite e merenda escolar) e alface, em torno de 70%.

Palavras-chave: Plasmídios R – Enterobactérias – hortaliças
– merenda escolar – leite

Em paralelo ao progresso alcançado pela antibioticoterapia identifica-se a emergência gradativa de estirpes bacterianas revelando um espectro de resistência a vários antimicrobianos.

O fenômeno foi, inicialmente, observado no Japão, em 1956, por Kitamoto et al., que constataram em casos de disenteria bacilar a presença de amostras de *Shigella* resistentes a Su, Sm, Tc e Cm.

Estudos subseqüentes de Ochiai et al. (1959; apud Watanabe, 1963) e Akiba et al. (1960) demonstraram que os marcos de resistência poderiam ser transferidos em blocos para amostras sensíveis, mesmo entre espécies distintas, através do processo de recombinação genética, denominado conjugação.

Os trabalhos de Watanabe (1963) e Smith (1969) evidenciaram que tal transmissão também se realiza *in vivo*, tanto no homem como em animais.

As pesquisas no campo genético distingüiram dois mecanismos de resistência bacteriana: um envolvendo a expressão gênica de genes cromossômicos, e outro, representado pelo fenômeno mediado por genes plasmidiais, isto é, cujos *loci* estão situados em plasmídios R ou fatores R (Akiba et al., 1960).

A análise desses fatores constitui elemento fundamental de estudo em várias áreas da Bacteriologia, seja pela facilidade com que se transferem célula à célula, quer por sua importância médica, decorrente da incidência de bactérias resistentes em diversos nichos ecológicos.

Em nosso país as investigações, sobre este aspecto, foram realizadas por Trabulsi, Zuliani & Toledo (1970), Santos (1972) e Palmeira (1975) concentrando-se, essencialmente, na pesquisa de fatores R em membros da família *Enterobacteriaceae* patogênicos para o homem ou naqueles provindos de fontes animais e ambientais.

O trabalho em pauta teve por eleição analisar, em culturas isoladas de alimentos, o espectro de resistência, bem como estabelecer as possíveis conexões da microflora resistente e suas implicações em Saúde Pública.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Alface: os exemplares foram obtidos no comércio (feiras, supermercados, hortas, verdureiros e quitandas) de diferentes bairros da cidade do Rio de Janeiro, no período de outubro de 1979 a dezembro de 1980. Concomitantemente, fez-se a colheita da água utilizada no umedecimento do vegetal.

Leite: concentrou-se em três pontos a obtenção das amostras: I – Lactário do Hospital Geral de Bonsucesso – Rio de Janeiro, nos anos de 1974, 1975 e 1977, representado por duas marcas de um produto industrializado. As coletas foram obtidas diretamente de latas de leite em uso e daquele já diluído e pronto para ser distribuído em mamadeiras; II – Leite fervido ou apenas pasteurizado, servido em cantinas universitárias e lanchonetes da cidade do Rio de Janeiro e municípios adjacentes, correspondendo a leite tipo C com 3,2 e ou 2% de gordura, oriundo de quatro indústrias e III – Leite pasteurizado distribuído no comércio da cidade do Rio de Janeiro, adquirido no momento da recepção, sendo da mesma origem industrial, que aquela referida anteriormente, cognominado de controle.

Merenda escolar: consistindo de mingaus, sopas, canjas, arroz com carne moída, ovo cozido, salsicha, molho de peixe e feijão; base das refeições oferecidas pelos estabelecimentos da rede oficial de ensino do Estado do Rio de Janeiro.

Técnicas

Coleta do material: os espécimens foram colhidos em balão Erlenmeyer esterilizado, de 250ml de capacidade. Para o transporte ao laboratório fez-se uso de recipiente de isopor contendo gelo.

Alface: com o auxílio de pinça esterilizada foram selecionadas três a cinco folhas internas da hortaliça, limpas e sem alteração na sua estrutura.

Leite: do produto do hospital, eram tomados cerca de 10g do leite em pó, com auxílio de espátula estéril, enquanto daquele preparado no lactário foram recolhidos 100ml.

Quanto ao leite servido em cantinas, efetuou-se a colheita de 100ml tanto do alimento fervido como *in natura*, conservado sob refrigeração na própria embalagem ou em jarras plásticas.

As amostras designadas de controle foram adquiridas no comércio varejista. No laboratório, após lavagem do invólucro em água corrente e desinfecção com álcool iodado, uma quantidade equivalente a 10ml foi, assepticamente, recolhida.

Merenda escolar: da merenda sólida, colhiam-se, aproximadamente 100g e dos alimentos líquidos ou pastosos, cerca de 100ml, na ocasião em que eram distribuídos aos colegiais.

Isolamento e identificação: como processo de enriquecimento utilizou-se caldo nutriente lactosado a 2g% e posterior passagem do crescimento em meios seletivos-indicadores: Agar EMB e Agar MacConkey. A incubação foi realizada a 37°C por 18 a 24h.

As amostras de alface e merenda escolar foram transferidas do frasco coletor para recipientes contendo 50ml de meio de enriquecimento.

No que se refere à água de umedecimento, as amostras eram centrifugadas a 4.000rpm ($g = 2.500$), por 15 minutos e, após decantação parcial do sobrenadante, um volume de 5ml do centrifugado era introduzido em 50ml do meio de enriquecimento.

Com relação ao leite preparado no lactário e aqueles colhidos em cantinas e padarias, bem como à merenda escolar (líquida ou pastosa), uma alíquota de 1ml era semeada em tubos contendo 10ml de caldo lactosado. Igual procedimento foi usado para as amostras de merenda escolar, sendo previamente homogeneizadas em liquidificador Blender, quando sólidas.

Após a incubação, os recipientes que revelassem crescimento eram semeados em placas contendo os meios seletivos para enterobactérias.

No dia subsequente, cerca de três a cinco colônias eram isoladas e suspensas em volumes de 5ml de água destilada estéril. As suspensões eram distribuídas em kits para identificação bioquímica, com base em 21 provas de API System do Laboratório Mérieux, baseado no método clássico preconizado por Edwards & Ewing (1972).

Teste de sensibilidade aos antimicrobianos: adotou-se o método de diluição em placa, fazendo-se uso do Agar Mueller-Hinton e dos fármacos: sulfadiazina (Su), Spofa United Pharmaceutica Works-Praha; sulfato de estreptomicina (Sm), Fontoura Wyeth; cloridrato de tetraciclina (Tc),

Laborterápica Bristol S.A.; cloranfenicol (Cm), Parke-Davies; sulfato de canamicina (Km), Laborterápica Bristol S.A.; ampicilina (Ap), Laborterápica Bristol S.A.; ácido nalidíxico (Nal), Winthrop Products Inc. e sulfato de gentamicina (Gm), Laboratórios Schering. Foram utilizados nas seguintes concentrações: 10, 50 e 100mcg/ml para Sm, Tc, Cm, Km, Ap e Nal; 1, 5, 10, 50 e 100mcg/ml para Gm e para Su, 50, 100 e 200mcg/ml.

O inóculo consistiu no espalhamento de uma alça de 1,5 mm de diâmetro da cultura, crescido em caldo nutriente, a 37°C, por 18 a 24h.

Paralelamente, foram semeadas estirpes de *Escherichia coli* reconhecidamente sensíveis e resistentes, como controle do teste.

Foram consideradas culturas resistentes aquelas que apresentavam crescimento em concentração igual ou superior a 100mcg/ml, para Su; 10mcg/ml para Gm e Sm, e 50mcg/ml para as demais drogas.

Experimentos de conjugação: foram analisadas apenas as culturas que revelaram perfis mono ou birresistentes.

Como receptoras foram utilizadas as linhagens-padrão de *E. coli*: K 12 55 e K 12 JC 3272, respectivamente, portadoras de marcos de resistência cromossômica para Nal e Sm (cedidas gentilmente pelo Dr. W. Hayes da Universidade de Edinburg, Escócia).

A partir de um crescimento exponencial, isto é, com uma concentração de 10^8 células, procedeu-se à mistura das culturas-testes com as receptoras na proporção de 1:10, incubando-se em banho-maria a 37°C durante 3 e 24 horas. Após as incubações, 0,1 ml das misturas foi semeado em placas contendo uma modificação do meio de Mueller-Hinton com 2g% de lactose e 0,008g% de azul de bromotimol, além da inclusão das drogas em concentrações de 100mcg/ml para Su, 10mcg/ml para Sm e Gm e 25mcg/ml para outros antimicrobianos. Para contra-selecionar o crescimento da amostra doadora, acrescentou-se Sm ou Nal, em concentração de 25mcg/ml de acordo com a natureza da cultura padrão. Nesta etapa procurou-se analisar, além do perfil de resistência, a fermentação de lactose como outro marcador para detecção de transconjugantes.

Após 24 a 48h a 37°C, foram selecionadas cinco a dez colônias transconjugantes para confirmação da resistência através do método de diluição em placa.

RESULTADOS

Os espécimens analisados propiciaram o isolamento de 400 culturas de bactérias Gram negativas (Tabela I). Apenas seis colheitas, correspondendo ao leite (hospitalar e de cantinas) não revelaram crescimento (Tabela II).

TABELA I

Origem e freqüência das amostras bacterianas isoladas dos diferentes alimentos analisados

Alimentos	Fontes	Números de Coletas	Número de Isolamentos		
			Enterobactérias	Não Entéricos	Total
Alface (35)*	Hortas comerciais	5			
	Hortas domésticas	5			
	Feiras	5			
	Quitandas	5	112	9	121
	Supermercados	5			
	Verdureiros ambulantes	10			
	Água para umedecimento	5	24	1	25
Leite (82)	Lactário de hospital	26	56	13	69
	Cantinas e lanchonetes	50	70	30	100
	Controle	6	6	3	9
Merenda Escolar (32)	Escolas municipais	24	71	5	76
	Escolas estaduais	8			
Total		154	339	61	400

*Os números entre parênteses significam o total de coletas por alimentos.

A determinação do perfil bioquímico permitiu a divisão da amostragem em dois grupos: o primeiro constituído de 339 estirpes pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, com predominância dos gêneros *Klebsiella* (39,5%) e *Enterobacter* (38,6%), incidindo principalmente em folhas de alface e leite de lactário (Tabela III), e o segundo, representado por 61 culturas de outros Gram negativos, destacando-se como mais frequentes os gêneros *Acinetobacter* (63,9%) e *Pseudomonas* (27,8%), tendo ambos maior correlação com o leite obtido de cantinas (Tabela IV).

O teste de sensibilidade a antimicrobianos possibilitou o reconhecimento de 98,2% de amostras de enterobactérias com alguma resistência e 100% nos gêneros afins (Tabelas V e VI). Independente à caracterização taxonômica, as amostras expressaram taxas de maior resistência em relação a Su (64,2%) e a Ap (62,6%) (Tabela VII).

TABELA II

Frequência de isolamento de germes Gram negativos entre os produtos analisados

Natureza do Alimento		Número de Coletas	Crescimento em Caldo		Gram Negativos	
			Positivo	Negativo	Presença	Ausência
Alface	Folhas	35	35	0	35	0
	Água	5	5	0	5	0
Leite	Hospital	26	22	4	15	7
	Cantinas	50	48	2	36	12
	Controle	6	6	0	2	4
Merenda Escolar		32	32	0	22	10
Total		154	148	6	115	33

TABELA III

Frequência dos gêneros da família *Enterobacteriaceae* segundo a origem de isolamento

Gêneros	Número de Amostras Isoladas						Total	
	Alface		Leite			Merenda Escolar	Nº	%
	Folhas	Água	Lactário	Cantinas	Controle			
<i>Klebsiella</i>	56	15	9	22	2	30	134	39,5
<i>Enterobacter</i>	33	5	40	20	2	31	131	38,6
<i>Citrobacter</i>	7	2	3	17	0	5	34	10,0
<i>Escherichia</i>	12	0	2	7	2	1	24	7,0
<i>Serratia</i>	2	2	2	2	0	2	10	2,9
<i>Proteus</i>	0	0	0	2	0	2	4	1,1
<i>Shigella</i>	2	0	0	0	0	0	2	0,5
Total	112 (33,0)	24 (7,0)	56 (16,5)	70 (20,6)	6 (1,7)	71 (20,9)	339	99,7

O comportamento das culturas, em presença dos diferentes antibióticos, possibilitou a identificação de ampla variedade de perfis de resistência distribuídos, segundo a origem, nas Tabelas VIII e IX.

Nos experimentos de conjugação com as culturas mono e birresistentes, codificou-se como R⁺, aquelas linhagens que transferiram genes de resistência, isto é, as portadoras eventuais de fatores R, bem como, todas as culturas com perfis de resistência iguais ou superiores a três marcos. Em contraposição, quando o fenômeno de transferência gênica não foi observado, as culturas foram cognominadas de R⁻. Neste particular as Tabelas X e XI retratam as interrelações das culturas dos dois grupos taxonômicos com as fontes de isolamento, aspecto de resistência e sensibilidade às drogas antimicrobianas, assim como, a possível transferência genética da resistência.

TABELA IV

Frequência dos gêneros de bactérias Gram negativas não entéricas segundo a origem de isolamento

Gêneros	Alface		Leite			Merenda Escolar	Total	
	Folhas	Água	Lactário	Cantinas	Controle		Nº	%
<i>Acinetobacter</i>	4	0	10	18	2	5	39	63,9
<i>Pseudomonas</i>	1	1	3	11	1	0	17	27,8
<i>Aeromonas</i>	3	0	0	0	0	0	3	4,9
<i>Flavobacterium</i>	1	0	0	1	0	0	2	3,2
Total (Nº e %)	9 (14,7)	1 (1,6)	13 (21,3)	30 (49,1)	3 (4,9)	5 (8,1)	61	99,8

TABELA V

Distribuição numérica de amostras de enterobactérias resistentes segundo a origem

Gêneros	Número de Amostras						
	Alface		Leite			Merenda Escolar	Total
	Folhas	Água	Lactário	Cantinas	Controle		
<i>Klebsiella</i>	56	15	9	22	2	30	134
<i>Enterobacter</i>	33	5	35	20	2	31	126
<i>Citrobacter</i>	6	2	3	17	0	5	33
<i>Escherichia</i>	12	0	2	7	2	1	24
<i>Serratia</i>	2	2	2	2	0	2	10
<i>Proteus</i>	0	0	0	2	0	2	4
<i>Shigella</i>	2	0	0	0	0	0	2
Total	111	24	51	70	6	71	333 (98,2)*

* O número entre parênteses significa percentual.

TABELA VI

Distribuição numérica de culturas de bacilos Gram negativos não entéricos resistentes segundo a origem

Gêneros	Alface		Leite			Merenda Escolar	Total
	Folhas	Água	Lactário	Cantinas	Controle		
<i>Acinetobacter</i>	4	0	10	18	2	5	39
<i>Pseudomonas</i>	1	1	3	11	1	0	17
<i>Aeromonas</i>	3	0	0	0	0	0	3
<i>Flavobacterium</i>	1	0	0	1	0	0	2
Total por Origem	9	1	13	30	3	5	61 (100) *

* O número entre parênteses significa percentual.

TABELA VII

Distribuição numérica e percentual dos marcadores de resistência nas culturas de estudo

Culturas	Determinantes de Resistência							
	Su	Sm	Tc	Cm	Km	Ap	Nal	Gm
Enterobactérias								
333 (98,2)*	211 (63,3)	12 (3,6)	31 (9,3)	42 (12,6)	4 (1,2)	205 (61,5)	31 (9,3)	— (0,0)
Bacilos não Entéricos								
61 (100)	42 (68,8)	19 (31,1)	7 (11,4)	39 (63,9)	3 (4,9)	42 (68,8)	18 (29,5)	— (0,0)
Total	394 (98,5)	253 (64,2)	31 (7,8)	38 (9,6)	81 (20,5)	7 (1,7)	247 (62,6)	49 (12,4)

* Os números entre parênteses significam percentuais

TABELA VIII

Distribuição numérica e percentual dos perfis de resistência mais frequentes nas enterobactérias segundo a origem

Perfis de Resistência	Origem						Total
	Alface		Leite			Merenda Escolar	
	Folhas	Água	Lactário	Cantinas	Controle		
Su	33 (35,8)	7 (7,6)	1 (1,0)	22 (23,9)	5 (5,4)	24 (26,0)	92 (27,6)
Ap	1 (5,5)	—	17 (94,4)	—	—	—	18 (5,4)
Su-Tc	7 (46,6)	—	—	5 (33,3)	—	3 (20,0)	15 (4,5)
Su-Ap	57 (43,1)	4 (3,0)	25 (18,9)	15 (11,3)	1 (7,5)	30 (22,7)	132 (39,6)
Su-Cm-Ap	2 (10,0)	9 (45,0)	—	4 (20,0)	—	5 (25,0)	20 (6,0)

277
(83,1)

TABELA IX

Distribuição numérica e percentual dos perfis de resistência mais frequentes entre os bacilos Gram negativos não entéricos, segundo a origem

Perfis de Resistência	Origem						Merenda Escolar	Total
	Alface		Leite					
	Folhas	Água	Lactário	Cantinas	Controle			
Ap	—	—	10 (90,0)	1 (9,0)	—	—	11 (18,0)	
Su-Cm	1 (16,6)	—	—	2 (33,3)	—	3 (50,0)	6 (9,8)	
Su-Ap	5 (83,3)	1 (16,6)	—	—	—	—	6 (9,8)	
Su-Cm-Ap-Nal	—	—	—	4 (80,0)	—	1 (20,0)	5 (8,1)	
							28 (45,9)	

TABELA X

Distribuição numérica e percentual das culturas de enterobactérias (resistentes e sensíveis) isoladas dos diversos alimentos

Características Gerais	Alface			Leite				Merenda Escolar	Total
	Folhas	Água	Total	Lactário	Cantinas	Controle	Total		
Amostras Isoladas	112	24	136	56	70	6	132	71	339
Resistentes	111 (99,1)	24 (100)	135 (99,2)	51 (91,0)	70 (100)	6 (100)	127 (96,2)	71 (100)	333 (98,2)
Sensíveis	1 (8,9)	—	1 (0,7)	5 (8,9)	—	—	5 (3,7)	—	6 (1,7)
R+	78 (70,2)	17 (70,8)	95 (70,3)	46 (90,1)	66 (94,2)	6 (100)	118 (92,9)	65 (91,5)	278 (83,4)
R-	33 (29,7)	7 (29,1)	40 (29,3)	5 (9,8)	4 (5,7)	—	9 (7,0)	6 (8,4)	55 (16,5)

TABELA XI

Distribuição numérica e percentual das culturas de bacilos não entéricos (resistentes e sensíveis) isolados dos diversos alimentos

Características Gerais	Alface			Leite				Merenda Escolar	Total
	Folhas	Água	Total	Lactário	Cantinas	Controle	Total		
Amostras Isoladas	9	1	10	13	30	3	46	5	61
Resistentes	9 (100)	1 (100)	10 (100)	13 (100)	30 (100)	3 (100)	46 (100)	5 (100)	61 (100)
Sensíveis	— (0,0)	— (0,0)	— (0,0)	— (0,0)	— (0,0)	— (0,0)	— (0,0)	— (0,0)	— (0,0)
R+	4 (44,4)	— (0,0)	4 (40,0)	13 (100)	23 (76,6)	1 (33,3)	37 (80,4)	2 (40,0)	43 (70,4)
R-	5 (55,5)	1 (100)	6 (60,0)	— (0,0)	7 (23,3)	2 (66,6)	9 (19,5)	3 (60,0)	18 (29,5)

DISCUSSÃO

Em princípio, salienta-se que o trabalho desenvolvido tinha como intuito básico investigar o comportamento de enterobactérias isoladas de alimentos, diante de drogas antimicrobianas. No entanto, pelos resultados obtidos, procurou-se também valorizar os achados em relação aos outros Gram negativos isolados, não pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (Tabela I).

Muito embora a pesquisa apresente um caráter qualitativo, um primeiro ponto de realce emana da observação que apenas seis coletas de leite não propiciaram crescimento bacteriano (Tabela II). Nesse sentido pode-se apontar como causa a manipulação adequada do produto, pois das quatro coletas de leite de origem hospitalar, três correspondiam àquele em pó, retirado assepticamente do vasilhame e um outro preparado sob supervisão do chefe do Lactário. Paralelamente, nas duas colheitas de leite servido em cantinas, uma relacionava-se ao produto fervido e a outra ao leite pasteurizado aberto no momento da coleta.

Ainda nesta fase inicial é importante questionar o elevado número de culturas Gram negativas obtidas (Tabelas I e II). Conquanto seja extremamente difícil caracterizar e responsabilizar fatores de diversas ordens por tal acontecimento, admite-se que, provavelmente, a negligência aos princípios básicos de higiene dos alimentos, se constituiu na geratriz do fenômeno.

Outro aspecto de relevância na análise dos resultados se situa na identificação qualitativa e quantitativa das bactérias Gram negativas, de acordo com as fontes de origem (Tabelas III e IV). Nas enterobactérias (Tabela III) salientam-se três características: 1) predominância de *Escherichia coli* no cultivo das folhas de alface; 2) maior taxa de isolamentos de membros do gênero *Citrobacter* obtida no leite de cantina, e 3) prevalência dos gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter* em quase todas as fontes de colheita.

No primeiro caso, considerando que este microrganismo é um indicador de contaminação fecal, admite-se sua origem através da veiculação hídrica, carregada pela matéria orgânica e a manipulação da hortaliça desde a colheita até a comercialização. Os resultados obtidos por Souto & Correa (1945) e Gelli et al. (1979) na pesquisa das condições higiênico-sanitárias de hortaliças, na cidade de São Paulo, são compatíveis com este achado.

Quanto à maior frequência de isolamentos do gênero *Citrobacter* do leite colhido em cantinas, não se obteve uma explicação plausível, nem tão pouco encontram-se dados referenciados. Todavia assinala-se que *C. freundii*, está muitas vezes associada aos processos entéricos, principalmente em crianças, como relatam Suassuna, Suassuna & Costa (1958), Sedlák (1970) e Hodges, Degener & Barnes (1978).

A ocorrência expressiva de *Klebsiella* e *Enterobacter* em alimentos é comumente assinalada por diversos autores. Neste sentido, Shooter et al. (1971) obtêm taxas semelhantes em análise de alimentos de diversas origens. Ercolani (1979) salienta a facilidade de colonização de *Enterobacter* em vegetais. Cooke et al. (1980) relatam a predominância de *Klebsiella* tanto em água usada para lavagem de vegetais como em alimentos de origem hospitalar. Palmeira (1975); Palmeira, Dias & Hauila (1975a e 1975b); Palmeira (1976) e Palmeira et al. (1977) admitem que a colonização ambiental destes germes, principalmente na área nosocomial, se constitui na causa básica das contaminações dos alimentos, em particular do leite de lactário.

Concluindo esta etapa ressalta-se a presença de *Acinetobacter* e *Pseudomonas* em leite obtido de cantinas; tais bactérias são, em algumas circunstâncias, apontadas como agentes de enteroinfecções como descrevem Gardner et al. (1970) e Grawenitz (1977). A natureza telúrica destes microrganismos poderá estar envolvida como causa da contaminação do produto, associado à veiculação aerógena e talvez à participação de vetores mecânicos, representados por insetos.

Ao se analisar a resistência revelada pela amostragem, são enfatizadas as altas taxas obtidas, quer para as enterobactérias (98,2%) como para os outros Gram negativos (100%) (Tabelas V e VI). Este dado caracteriza, incontestavelmente, uma verdadeira "poluição" de marcadores genéticos de resistência a drogas nas culturas. Desta circunstância podem ser previstas as conseqüências geradas pelo consumo permanente de alimento com uma microflora portadora de resistência infecciosa. Aliás, o estudo pioneiro de Smith (1969) confirma esta preocupação, tendo em vista que *in vivo*, no homem ou animal, a transferência de resistência microbiana ocorre.

Confrontando as Tabelas III, IV, V e VI percebe-se que das 400 culturas submetidas ao antibiograma, cinco amostras de *Enterobacter*, provindas do leite hospitalar e apenas uma cultura de *Citrobacter*, isolada de folhas de alface (Tabelas III e V) manifestaram sensibilidade aos oito antimicrobianos utilizados, fato não detectado nos gêneros das outras famílias (Tabelas IV e VI). Assim, 394 estirpes bacterianas resistiram à ação antibiótica, representando 98,5% de resistência como revela a Tabela VII.

Ainda na Tabela VII observa-se que o comportamento das culturas isoladas diante das drogas antimicrobianas apresenta outras informações de interesse. Assim, identifica-se a sensibilidade absoluta das culturas à gentamicina, que provavelmente pode ser explicada pela discreta utilização deste antibiótico nesta microflora. Todavia, ao se considerar o ambiente hospitalar (ambulatório e enfermarias) onde seu uso é difundido, os resultados são inteiramente opostos, conforme os trabalhos de Dias et al. (1979) que demonstraram o surgimento da resistência a este antimicrobiano, em ambiente hospitalar, a partir de 1976, e de Magalhães & Vêras (1979) que se detiveram na análise de plasmídeo que codifica a resistência à gentamicina em culturas de *Salmonella typhimurium* isoladas de uma unidade hospitalar.

Quanto ao determinante de resistência para o ácido nalidíxico verificou-se uma frequência mais acentuada nas culturas de gêneros afins, comparando-se com as enterobactérias (Tabela VII). É oportuno relatar que as amostras que manifestaram resistência não transferiram este marco genético, concordando com os achados de Santos (1972) e Palmeira (1975).

Por outro lado a resistência das culturas à sulfadiazina e ampicilina muito se assemelham em aspecto numérico de frequência, tanto nas enterobactérias como nos outros gêneros. No que se refere à resistência para o quimioterápico Su é conveniente lembrar que esta droga vem sendo usada desde a década de 30, tornando viável a suposição que germes Gram negativos revelam, em sua grande maioria esta resistência, provavelmente oriunda da ação seletiva exercida pelo antimicrobiano. Reforçando esta idéia destacam-se as observações de Palmeira (1975) que ao analisar a disseminação da resistência infecciosa em nosso meio, situou o período de 1937-1951 para o aparecimento da resistência a este fármaco.

Para os antimicrobianos Sm, Tc, Cm e Km as taxas obtidas são inferiores a 50%, excetuando-se aquela verificada nos gêneros afins para o determinante de resistência ao cloranfenicol.

Destaca-se que o teste de sensibilidade, no cômputo geral, permitiu detectar, 30 modelos distintos de resistência, variando os perfis de monorresistentes até heptarresistentes. Em decorrência da multiplicidade dos modelos, as análises se concentraram somente naqueles com maior predominância (Tabelas VIII e IX).

Analisando os resultados referentes às 277 amostras de enterobactérias (Tabela VIII) assinala-se uma frequência quase que equivalente dos modelos Su e Su-Ap nas culturas dos diversos alimentos pesquisados. Salienta-se a incidência do perfil Ap nas enterobactérias do leite de lactário, admitindo-se que seja resultante de contaminações no ambiente nosocomial, uma vez que as taxas encontradas nas culturas dos outros alimentos são quase nulas. Quanto aos perfis Su-Tc e Su-Cm-Ap, pode-se afirmar que apresentam expressividade nas culturas originárias da maioria dos alimentos, com exceção do leite obtido do lactário e controle, imaginando-se que, potencialmente, resultem da seleção natural imposta pelos antibióticos sobre esta microbiota. Entretanto, considerando a observação de Hofer et al. (1979) que analisaram aspectos ecológicos e epidemiológicos em *Salmonella typhimurium*, admite-se também uma relação taxonômica destes perfis com a espécie bacteriana isolada e sua origem.

Este último raciocínio talvez constitua explicação para a acentuada desuniformidade dos resultados, no tocante aos Gram negativos afins (Tabela IX), nos quais reconheceu-se apenas 28 culturas, de um total de 61, que apresentaram identidade de comportamento. Inerente a esta suposição cita-se a ausência de identificação dos modelos Su e Su-Tc, bem como, a ocorrência de Su-Cm e Su-Cm-Ap-Nal, quando se confrontam os dados das Tabelas VIII e IX.

Quando se tenta globalizar os resultados obtidos dispondo-os em paralelo com a natureza da amostragem (Tabelas X e XI), outras conclusões são possíveis de se aquilatar. Deste modo percebe-se que dentre as enterobactérias (Tabela X) os percentuais de R⁺, isto é, aquelas culturas nas quais se visualizou a transferência de marcos genéticos e/ou aquelas que revelaram multirresistência, são em sua maioria próximos a 100. Curiosamente, constatou-se que as culturas de leite (cantinas e controle) e merenda escolar apresentaram frequências de resistência e R⁺ superiores àquela obtida para os germes isolados do leite de lactário. Muito embora se reconheça o tempo distinto em que se efetuou o isolamento dessas culturas, este fenômeno não pode ser ignorado, tendo em vista que o ambiente hospitalar representa o modelo clássico e atual da pressão seletiva imprimida pelas drogas antimicrobianas. Em contraposição, as amostras bacterianas originárias de alface e água revelaram percentuais inferiores. Talvez, a explicação para este achado resida na discreta exposição da microflora desta amostragem aos produtos antimicrobianos, embora este aspecto não tenha sido avaliado no presente estudo.

Já as amostras não pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (Tabela XI) apresentam características pouco homogêneas distinguindo-se, em parte, dos resultados até então discutidos. A resistência das culturas, expressa em percentuais máximos, contrapõe-se com uma variedade

maior de taxas para as culturas R⁺. Esta evidência pode ser interpretada, talvez, como decorrente de uma especificidade taxonômica dos germes em questão associada ao seu patrimônio genético, como já se fez alusão em aspecto anterior desta análise. Acrescentando mais um respaldo a esta suposição é conveniente citar que Câmara & Cardoso (1981), detendo-se na epidemiologia da resistência plasmidial, relatam que a multirresistência em *Salmonella*, isolada de água de esgoto, se concentra nos sorotipos do grupo sorológico B.

Sumarizando estas considerações enfatiza-se que a ausência de transferência de resistência, através de conjugação — taxas de culturas R⁻ (Tabelas X e XI), não significa, categoricamente, que esta resistência não seja mediada por plasmídios R, pois os fatores R podem ser defectivos, isto é, perdem os genes que determinam sua transferência, como assinalam Rownd, Kasamatsu & Mickel (1971).

Alicerçando-se na presença característica de enterobactérias com resistência infecciosa em taxas elevadas é óbvio supor que a ingestão de alimentos carreadores desses germes, amplia as possibilidades de colonização no trato intestinal de indivíduos sadios podendo acarretar problemas futuros de ordem médica e sanitária. Deste modo é admissível incriminar os alimentos como um veículo de transmissão e disseminação de bactérias portadoras de fatores R. Estas conclusões contradizem as deduções formuladas por Falcão et al. (1982) que ao analisarem enterobactérias isoladas de produtos cárneos crus, não obtiveram altos níveis de resistência.

Sem dúvida que outros fatores, intrínsecos e extrínsecos, podem estar envolvidos no mecanismo da incidência de bactérias portadoras de plasmídios R, tais como: o discreto controle sobre o uso de antimicrobianos nos alimentos e rações; a indiscriminada utilização dos antimicrobianos nas enfermidades humanas, animal e até certo ponto vegetal; a propaganda inadequada, difundida através de veículos de comunicação de massa, sugerindo o consumo de fármacos desta natureza; a automedicação e as deficiências higiênico-sanitárias relacionadas à produção, industrialização e comercialização de produtos alimentícios.

Com base em tais considerações torna-se difícil sugerir soluções preventivas imediatas. No entanto, acredita-se que a orientação e a conscientização da comunidade, sobre o problema, venham constituir o caminho mais viável, embora os resultados sejam obtidos a longo termo.

SUMMARY

From 154 food samples, including vegetables (lettuce), milk and meals served at school it was possible to isolate and identify 400 Gram negative bacilli distributed among 339 enteric bacteria (*Escherichia*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* and *Proteus*) and other 61 non enteric bacilli (*Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Aeromonas* and *Pseudomonas*).

Submitting this cultures to the drugs sulfadiazine (Su), streptomycin (Sm), tetracycline (Tc), chloranphenicol (Cm), kanamycin (Km), ampicilin (Ap), nalidixic acid (Nal) and gentamycin (Gm) it was observed only six stocks susceptible to all drugs and total sensibility to Gm. Among enteric bacteria the profiles Su (27,6%) and Su-Ap (39,6%) predominated, while for the non enteric bacilli percentages of 18,0 for Ap and 9,8 for Su-Ap were detected.

Aiming to better characterization of resistance, experiments of conjugation were made with standard strains of *Escherichia coli* K 12.

Great concern was raised by the recognition of these cultures due to the elevated R⁺ taxes for the enteric bacilli that were close to 90% (milk and food at school) and about 70% in relation to lettuce.

AGRADECIMENTOS

Ao corpo técnico-científico do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz pelas contribuições imprescindíveis à realização do trabalho; e aos Srs. Chefes do Berçário e Lactário do Hospital Geral de Bonsucesso, Rio de Janeiro, RJ, bem como aos Srs. Diretores de Escolas que, gentilmente permitiram a colheita de amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIBA, T.; KOYAMA, K.; ISHIKI, Y.; KIMURA, S. & FUKUSHIMA, T., 1960. On mechanism of development of multiple drug-resistant clones of *Shigella*. *Japan J. Microbiol.*, 4 :219-227.
- CÂMARA, F.P. & CARDOSO, M.A., 1981. Epidemiologia da resistência plasmidial a drogas em *Salmonella* isoladas em esgotos da cidade do Rio de Janeiro. *Rev. Microbiol.*, 12 (1) :14-16.

- COOKE, M.E.; SAZEGAR, T.; EDMONDSON, A.S.; BRAYSON, J.C. & HALL, D., 1980. *Klebsiella* species in hospital food and kitchens: a source of organisms in the bowel of patients. *J. Hyg., Camb.*, 84 :97-101.
- DIAS, J.C.A.R.; PALMEIRA, M.L.; HAUILA, R.A.A. & OLIVEIRA, L.M., 1979. Evolução da Resistência Infeciosa à Gentamicina em Enterobactérias de Origem Hospitalar. In Resumos X Congr. Bras. Microbiol. Rio de Janeiro, RJ. p. 45.
- EDWARDS, P.R. & EWING, W.H., 1972. Identification of *Enterobacteriaceae*. 3rd ed. Burgess Publ. Co., Minnesota, USA.
- ERCOLANI, G.L., 1979. Differential survival of *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* and *Enterobacter aerogenes* on Lettuce in the Field. *Zbl. Bakt. Abt. A* 134 :402-411.
- FALCÃO, D.P.; LIMA, B.M.; MARINI, E. & SHIMIZU, M.T., 1982. Resistência a drogas em enterobactérias isoladas de alimentos. *Rev. Microbiol.*, 13 (4) :402-411.
- GARDNER, P.; GRIFFIN, W.B.; SWARTZ, M.N. & KUNZ, L.J., 1970. Non-fermentative Gram-negative bacilli of nosocomial interest. *Amer. J. Med.*, 48 :735-749.
- GELLI, D.S.; TACHIBANA, T.; OLIVEIRA, I.R.; ZAMBONI, C.Q.; PACHECO, J.A. & SPITERI, N., 1979. Condições higiênico-sanitárias de hortaliças comercializadas na cidade de São Paulo, SP, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39 (1) :37-43.
- GRAWENITZ, A. von, 1977. The role of opportunistic bacteria in human disease. *Ann. Rev. Microbiol.*, 31 :447-451.
- HODGES, G.R.; DEGENER, C.E. & BARNES, W.G., 1978. Clinical significance of *Citrobacter* isolates. *Am. J. Clin. Pathol.*, 70 :37-40.
- HOFER, E.; ANDERSON, E.S.; MACHADO, J.D.C.; DIAS, J.C.A.R.; RODRIGUES, D.R. & SOLARI, C.A., 1979. Considerações ecológicas e epidemiológicas sobre a subdivisão de *Salmonella typhimurium* em lisotipos e biotipos. In Resumos X Congr. Bras. Microbiol., Rio de Janeiro, RJ. p. 61.
- KITAMOTO, O.; KASAI, N.; FUKAYA, K. & KAWASH, A., 1965. Drug-sensitivity of *Shigella* strain isolated in 1955. *J. Japan. Assoc. Inf. Dis.*, 30 :403-404.
- MAGALHÃES, M. & VÉRAS, A., 1979. Plasmídios R de cepas hospitalares de *Salmonella typhimurium*. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 10 (2) :43-45.
- OCHIAI, K.; YAMANAKA, T.; KIMURA, K. & SAWADA, O., 1959. Studies on inheritance of drug-resistance between *Shigella* strains and *Escherichia coli* strains. *Nippon Iji Shimpo.*, 1961 :34-46.
- PALMEIRA, M.L., 1975. Resistência Infeciosa a Drogas em Enterobactérias no Brasil. Estudo comparativo da ocorrência de fatores R em amostras de origem hospitalar e extra-hospitalar. Tese de Livre-Docência em Bacteriologia. Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ.
- PALMEIRA, M.L., 1976. Incidência de Bactérias Gram-negativas portadoras de resistência transferível em infecções hospitalares. In Resumos VII Congr. Bras. Microbiol., Porto Alegre, RS, p. TL 08.
- PALMEIRA, M.L.; DIAS, J.C.A.R. & HAUILA, R.A.A., 1975 a. Evolução de Fatores R em amostras de Enterobactérias isoladas no Brasil. In Resumos VI Congr. Bras. Microbiol., Salvador, BA. p. 74.
- PALMEIRA, M.L.; DIAS, J.C.A.R. & HAUILA, R.A.A., 1975 b. Resistência Bacteriana transferível em amostras de Enterobactérias isoladas de Recém-nascidos. In Resumos VI Congr. Bras. Microbiol., Salvador, BA. p. 82.
- PALMEIRA, M.L.; DIAS, J.C.A.R.; HAUILA, R.A.A.; PALMEIRA, G.A. & GOMES, E.F., 1977. Incidência e características de amostras de *Klebsiella* isoladas de meio hospitalar e extra-hospitalar. In Resumos VIII Congr. Bras. Microbiol., Rio de Janeiro, RJ. p. 3.
- ROWND, R.; KASAMATSU, H. & MICKEL, S., 1971. The molecular nature and replication of drug-resistance factors of the *Enterobacteriaceae*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 182 :188-206.
- SANTOS, D., 1972. Resistência transmissível a drogas na família *Enterobacteriaceae*. Tese de Mestrado em Microbiologia e Imunologia. Escola Paulista de Medicina. São Paulo, SP.
- SEDLÁK, J., 1970. Zur Systematik der Gattung *Citrobacter*. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, 212 :497-499.
- SHOOTER, R.A.; FAIRES, M.C.; COOKE, E.M.; BREADEN, A.L. & O'FARRELL, S.M., 1971. Isolation of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella* from food in Hospitals, Canteens, and Schools. *Lancet.*, 2 :390-392.
- SMITH, D.H., 1969. Transfer of antibiotic resistance from animal and human strains of *E. coli* to resident *E. coli* in the alimentary tract of man. *Lancet*, 7607 (1) :1174-1179.
- SOUTO, A.B. & CORRÊA, M.O.A., 1945. Investigações microbiológicas e microscópicas sobre vegetais frescos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.*, 5 :342-352.
- SUASSUNA, I.; SUASSUNA, I.R. & COSTA, G.A., 1958. Estudos sobre os bacilos "Paracoli" do grupo Bethesda-Ballerup. I. Ocorrência em distúrbios intestinais. *Anais Microbiol.*, VI :177-190.
- TRABULSI, L.R.; ZULIANI, M.E. & TOLEDO, M.R.R., 1970. Resistance to nine drugs of *Shigella* strains isolated in S. Paulo between 1963 and 1968. *Rev. Microbiol.*, 1 (2) :71-77.
- WATANABE, T., 1963. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bact. Rev.*, 28 :87-115.