

ARMANDO BERGAMIN FILHO

ENGENHEIRO AGRÔNOMO

Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

**O CONCEITO DE FORÇA DE DROGAS ILUSTRADO COM
RESISTÊNCIA DE *CORYNEBACTERIUM MICHIGANENSE*
(SMITH) JENSEN A ANTIBIÓTICOS**

Orientador : Hiroshi Kimati

**Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre.**

P I R A C I C A B A

Est. de São Paulo - Brasil

1 9 7 3

À Nicole

AGRADECIMENTOS

O autor expressa seus agradecimentos:

Ao Professor Dr. HIROSHI KIMATI pela valiosa colaboração como orientador deste trabalho e pela revisão dos originais;

Ao Professor Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO, quem me iniciou na Genética de Microrganismos, pela permissão de usar seus laboratórios, pelo isolamento de Corynebacterium michiganense que me pôs à disposição, pelo estímulo constante e pelas valiosas sugestões;

Ao Professor Dr. CLÉLIO LIMA SALGADO pelas valiosas sugestões;

À Professora Dr^a. ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO pela versão, para o Inglês, do Resumo.

Ao Professor Dr. ROLAND VENCOVSKY pelo auxílio na análise estatística;

À acadêmica NICOLE BAUDON pelo estímulo constante e imprescindível ajuda;

Ao acadêmico JORGE KIRYU pela imprescindível ajuda;

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO pela bolsa concedida, sem a qual este trabalho não seria realizado.

ÍNDICE

Página

DEDICATÓRIA	ii
AGRADECIMENTOS	iii
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1. Modelos de Resistência	2
2.2. Alteração na Taxa de Crescimento como Consequência da A quisição de Resistência a Drogas	4
2.2.1. Taxa de crescimento menor	4
2.2.2. Taxa de crescimento inalterada	6
2.2.3. Taxa de crescimento maior	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS	7
3.1. Local e Época da Pesquisa	7
3.2. Isolado de <u>Corynebacterium michiganense</u>	7
3.3. Meios de Cultura e Drogas	7
3.4. Ensaios	8
3.4.1. Obtenção de mutantes resistentes à estreptomicina	8
3.4.2. Obtenção de mutantes resistentes à eritromicina	8
3.4.3. Obtenção de mutantes resistentes à penicilina	9
3.4.4. Resistência cruzada	9
3.4.5. Determinação do crescimento da linhagem original em relação a cada uma das linhagens mutantes atra vés de misturas de linhagens	10
3.4.6. Curvas de crescimento	11
3.5. Análise dos Ensaios	11

3.5.1. O conceito de droga forte, droga fraca e droga neutra	11
3.5.2. Como determinar quantitativamente a força de uma droga	12
3.5.2.1. Determinação através da mistura da linhagem original com cada uma das linhagens mutantes	13
3.5.2.2. Determinação através das curvas de crescimento da linhagem original e das linhagens mutantes resistentes	15
4. RESULTADOS	18
4.1. Resultados dos Ensaiois	18
4.1.1. Obtenção de mutantes resistentes à estreptomici- na	18
4.1.2. Obtenção de mutantes resistentes à eritromicina	19
4.1.3. Obtenção de mutantes resistentes à penicilina	20
4.1.4. Resistência cruzada	21
4.1.5. Determinação do crescimento da linhagem original em relação a cada uma das linhagens mutantes através de misturas de linhagens	23
4.1.6. Curvas de crescimento	25
4.2. Resultados da Análise dos Ensaiois	31
4.2.1. Determinação das forças das drogas através da mistura da linhagem original com cada uma das linhagens mutantes	31
4.2.2. Determinação das forças das drogas através das curvas de crescimento da linhagem original e das linhagens mutantes	33

5. DISCUSSÃO	35
5.1. Aspectos Teóricos Gerais	35
5.2. O Conceito de Força de Drogas Ilustrado com <u>Corynebacterium michiganense</u> e os Antibióticos Estreptomicina, Eritromicina e Penicilina	40
5.2.1. Comportamento da bactéria frente a cada um dos antibióticos	40
5.2.2. Resistência cruzada	42
5.2.3. A força de cada um dos antibióticos	42
6. CONCLUSÕES	45
7. RESUMO	47
8. SUMMARY	48
9. LITERATURA CITADA	49

LISTA DE TABELAS

	<u>Página</u>
1. Mutantes resistentes de <u>C. michiganense</u> à estreptomicina ensaiados em meio líquido + estreptomicina. Comparação com a linhagem original	18
2. Mutantes resistentes de <u>C. michiganense</u> à eritromicina ensaiados em meio líquido + eritromicina. Comparação com a linhagem original	19
3. Mutantes resistentes de <u>C. michiganense</u> à penicilina ensaiados em meio líquido + penicilina. Comparação com a linhagem original	20
4. Teste de inibição de linhagens, original e mutantes, de <u>C. michiganense</u> à estreptomicina	21
5. Teste de inibição de linhagens, original e mutantes, de <u>C. michiganense</u> à eritromicina	22
6. Teste de inibição de linhagens, original e mutantes, de <u>C. michiganense</u> à penicilina	22
7. Efeito do período de cultivo em líquido nutriente sobre a porcentagem de linhagens, original e resistente à estreptomicina, de <u>C. michiganense</u> em mistura	23
8. Efeito do período de cultivo em líquido nutriente sobre a porcentagem de linhagens, original e resistente à eritromicina, de <u>C. michiganense</u> em mistura	24
9. Efeito do período de cultivo em líquido nutriente sobre a porcentagem de linhagens, original e resistente à penicilina, de <u>C. michiganense</u> em mistura	25
10. Número médio de células viáveis por ml da linhagem original em diversos tempos	26

11. Número médio de células viáveis por ml da linhagem estreptom _o micina resistente em diversos tempos	27
12. Número médio de células viáveis por ml da linhagem eritromi _i cina resistente em diversos tempos	28
13. Número médio de células viáveis por ml da linhagem penicili _i na resistente em diversos tempos	29
14. Quantidade relativa de linhagens, estreptom _o micina resistente e original, de <u>C. michiganense</u> quando cultivadas em mistura	31
15. Quantidade relativa de linhagens, eritrom _i cina resistente e original, de <u>C. michiganense</u> quando cultivadas em mistura.	32
16. Quantidade relativa de linhagens, penicili _n a resistente e o _o riginal, de <u>C. michiganense</u> quando cultivadas em mistura.	32
17. Os valores do coeficiente de regressão linear (r) e da meia vida relativa (MV_r) dos 3 mutantes calculados através da mistura de linhagens	33
18. Os valores do coeficiente de regressão linear (r) das 4 li _n hagens e os valores da meia-vida relativa (MV_r) da lin _n hagem penicili _n a resistente calculados através de curvas de crescimento	34

LISTA DE FIGURAS

Página

1. O Significado da MV_r : é o tempo necessário para uma população de uma dada linhagem de um microrganismo cair até a metade ou dobrar em relação a uma outra linhagem considerada	14
2. A MV_r determinada pelas curvas de crescimento	17
3. As curvas de crescimento das linhagens, original, estreptomina resistente, eritromicina resistente e penicilina resistente, de <u>C. michiganense</u>	30
4. Os 3 tipos de drogas. Na figura estão representados dois cromossomos: o superior pertence à linhagem resistente a uma droga qualquer e o inferior pertence à linhagem sensível. A região escura no cromossomo superior é o gene que confere a resistência e o ponto de interrogação, na sensível, representa o gene perdido quando da aquisição da resistência	36

1. INTRODUÇÃO

O estudo da resistência dos microrganismos a drogas é de fundamental importância tanto na patologia humana e animal, onde intensivos estudos vêm sendo feitos (BRYSON e SZYBALSKI, 1955; SCHNITZER e GRUNBERG, 1957; NEWTON, 1965; GURGEL e AZEVEDO, 1969 e WATANABE, 1972), como na patologia vegetal (THIRUMALACHAR, 1968 e AZEVEDO, 1973). Atualmente, em consequência desses estudos, muito já se conhece a respeito de como aparecem os mutantes e das medidas que devem ser tomadas para que tal não aconteça (GURGEL e AZEVEDO, 1969).

Entretanto, ao lado do muito que já se conhece, existem diversos fatos que permanecem sem uma explicação convincente. Entre estes está o problema, de grande importância tanto teórico como prático, do diferente comportamento, quanto ao tempo de eficiência, das diversas drogas existentes no mercado: um grupo, desde sua primeira utilização até nossos dias, permanece altamente eficiente, enquanto que outro, ao contrário, teve sua eficiência rapidamente perdida.

As drogas que têm sua eficiência rapidamente perdida representam um enorme prejuízo para os laboratórios que as lançaram no mercado e, mais importante, representam também um sério risco para aqueles que delas se utilizam. Seria, portanto, altamente desejável desenvolver uma técnica que nos desse informações, rapidamente, sobre o tempo de duração da eficiência da droga antes de sua comercialização. Este trabalho, em última análise, trata desta técnica.

O organismo usado em nossos estudos foi a bactéria fitopatogênica Corynebacterium michiganense, como poderia ter sido qualquer outro microrganismo, em virtude do caráter geral desta pesquisa.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Modelos de Resistência

Quando células bacterianas são semeadas em placas de Petri contendo concentrações crescentes de diversos antibióticos, o número de sobreviventes nas diversas concentrações permite que se trace dois tipos característicos de curva, conforme o antibiótico usado. Esses dois tipos de curva correspondem aos dois principais modelos de resistência dos microrganismos às drogas (GURGEL e AZEVEDO, 1969).

Num dos modelos, obtêm-se mutantes semeando-se células bacterianas tanto em alta como em baixa concentração do antibiótico (DEMEREK, 1948), isso indicando claramente que a mutação em um único locus já confere elevada resistência ao antibiótico (DEMEREK, 1950 e NEWCOMBE e NYHOLM, 1950). No entanto, mutantes resistentes a diferentes níveis da droga podem aparecer. Para explicar esse fato DEMEREK (1948) propõe que diferentes níveis de resistência envolvem mutação em genes com diferentes potenciais ou, em outras palavras, numa determinada célula bacteriana um gene pode mutar e conferir a essa célula resistência máxima, ao passo que, em outra célula, um gene diferente pode sofrer a mutação e acarretar somente uma resistência intermediária. Trabalhos mais recentes têm confirmado essa hipótese (MITCHISON, 1951 e 1953).

DEMEREK (1948) propôs a esse modelo de resistência o nome de um só passo ("one-step") ou modelo da estreptomicina. Outros antibióticos que se comportam da mesma maneira incluem a eritromicina e a vancomicina (AZEVEDO, 1973).

No outro modelo típico de resistência, referido no início deste item, a semeadura de microrganismos em concentrações crescentes do antibiótico dá como resultado o aparecimento de mutantes resistentes até uma determinada con

centração, mas não em concentrações mais elevadas (DEMEREK, 1948). No entanto, se os mutantes resistentes a baixa concentração do antibiótico forem transferidos para concentrações cada vez mais elevadas, conseguir-se-ão, após várias transferências, mutantes altamente resistentes. Conclui-se daí que, neste caso, vários genes, cada um de pequena ação individual, conferem ao microrganismo alta resistência à droga (DEMEREK, 1948).

Cruzando linhagens sensíveis a cloranfenicol de Escherichia coli com linhagens altamente resistentes, CAVALLI e MACCACCARO (1952) mostraram que a resistência pode ser conferida por qualquer porção do cromossomo bacteriano e, além disso, esses autores encontraram uma correlação positiva entre o nível de resistência conferido com o tamanho do segmento do cromossomo transferido para a célula receptora. Esses resultados confirmam plenamente a hipótese de DEMEREK (1948).

A denominação de múltiplos passos ("multiple-step") ou modelo da penicilina foi proposto para este caso (DEMEREK, 1948). Outros antibióticos que são classificados neste grupo, além da penicilina e cloranfenicol, incluem a aureomicina e a tilosina (AZEVEDO, 1973).

Na maioria dos casos o modelo é característico para os antibióticos e não para os microrganismos, isto é, os esquemas da penicilina ou múltiplos passos e o da estreptomicina ou um só passo permanecem constantes seja qual for o microrganismo sensível ensaiado. Todavia, conforme citam GURGEL e AZEVEDO (1969), há exceções: Mycobacterium ranae, por exemplo, segue para o cloranfenicol o modelo de um só passo quando a regra geral para esse antibiótico é o modelo da penicilina ou de múltiplos passos.

Outras considerações sobre os dois modelos de resistência aqui discutidos podem ser encontrados nas revisões de BRYSON e SZYBASKY (1955); SCHNITZER e GRUNBERG (1957) e GURGEL e AZEVEDO (1969).

2.2. Alteração na Taxa de Crescimento como Consequência da Aquisição de Resistência a Drogas

A alteração da taxa de crescimento dos mutantes resistentes a drogas, quando comparados com suas linhagens originais sensíveis, é um fato amplamente conhecido, conforme se constata nas revisões de BRYSON e SZYBALSKI (1955); SCHNITZER e GRUNBERG (1957); GURGEL e AZEVEDO (1969) e AZEVEDO (1973).

Como regra geral, na ausência da droga, essa alteração implica numa menor taxa de crescimento para os mutantes resistentes, havendo, portanto, vantagem seletiva para as células sensíveis que, após algum tempo, acabarão sobrepujando as resistentes (GURGEL e AZEVEDO, 1969). No entanto, casos nos quais não há alteração na taxa de crescimento do mutante resistente não são raros e mesmo mutantes que apresentam taxa mais alta que a linhagem original sensível já foram descritos (SCHNITZER e GRUNBERG, 1957).

2.2.1. Taxa de crescimento menor

WITKIN (1947) misturou um mutante resistente à penicilina de Escherichia coli com a linhagem original sensível, em meio líquido sem penicilina. A proporção de células sensíveis e resistentes na mistura, que era de 20 e 80%, no início, após 20 dias transformou-se em 99,99995 e 0,00005%, respectivamente.

Trabalhando igualmente com Escherichia coli, mas usando mutantes resistentes à estreptomicina, DEMEREC (1951) também constatou a desvantagem seletiva dos mutantes resistentes. Para tal, além de misturar as linhagens e comprovar a queda da proporção do mutante na mistura, o autor mediu o tempo de divisão das células sensíveis e resistentes encontrando 20 minutos para aquelas e 25 minutos para estas.

Numa série de 3 trabalhos, BELJANSKI (1952; 1953a e 1953b) estudou o crescimento de mutantes resistentes de Staphylococcus aureus à estreptomina, penicilina e sulfamida e de um mutante resistente à penicilina de Escherichia coli. Nos 4 casos os mutantes apresentaram uma taxa de crescimento inferior à das células originais sensíveis, especialmente para o mutante de Staphylococcus aureus resistente à penicilina.

A regra geral de que os mutantes resistentes apresentam taxa menor de crescimento também é confirmada entre as bactérias fitopatogênicas. Assim é que RANGASWAMI (1957) relata o fato de 2 mutantes resistentes à estreptomina, um de Xanthomonas citri e o outro de Xanthomonas malvacearum, desenvolverem-se muito mais lentamente que as linhagens originais.

Os estudos de AZEVEDO e NEDER (1963) revelaram que um mutante de Xanthomonas campestris, resistente à aureomicina, teve seu tempo de geração de 131 minutos enquanto que o tempo de geração da linhagem original sensível foi de apenas 96,3 minutos. Além disso, o número de células desse mesmo mutante, quando misturado com células sensíveis, reduziu-se de 48,5% na população para 14,3% em 72 horas.

Finalmente, deve-se ressaltar, ainda, não ser apenas entre os microrganismos que a aquisição da resistência a um agente inibidor implique geralmente numa menor taxa de crescimento. É bastante conhecido o fato de insetos que adquiriram resistência a inseticidas apresentarem, pelo menos durante os estágios iniciais de seleção, uma menor capacidade de sobrevivência (GEORGHIU, 1972). Se, porém, a pressão de seleção do inseticida sobre a população de insetos for bastante prolongada, tal desvantagem é anulada em virtude de, provavelmente, haver um balanceamento melhor entre os genes dos indivíduos resistentes, de tal modo que, mesmo na ausência do inseticida, a população permanecerá resistente (GEORGHIU, 1972). Tal fenômeno não é conhecido entre os microrganismos.

2.2.2. Taxa de crescimento inalterada

Células que adquirem resistência a agentes inibidores e não apresentam alteração em sua taxa de crescimento, ao contrário do caso precedente, são relatados em número bem menor na literatura (SCHNITZER e GRUNBERG, 1957). Entre esses relatos está o de QUADLING (1960) para um mutante resistente à estreptomicina de Xanthomonas phaseoli e o de AZEVEDO e NEDER (1963) para 2 mutantes de Xanthomonas campestris, um resistente à penicilina e o outro resistente à estreptomicina.

Ao mesmo tempo que se ressalta a relativa escassez de casos onde mutantes resistentes não apresentam alteração em suas taxas de crescimento, seria interessante enfatizar que várias evidências (WATANABE, 1972) indicam ser esta a regra geral para as células cuja resistência é devida a plasmídeos.

2.2.3. Taxa de crescimento maior

ENGLISH e McCOY (1951) relataram que um mutante resistente à estreptomicina de Micrococcus pyogenes var. aureus apresentou uma taxa de crescimento maior que a linhagem original sensível. Medições feitas em fotocolorímetro, para as 2 linhagens, após 35 horas de crescimento, deram como resultado 94% de transmitância para a linhagem original e 71% para o mutante resistente.

Outros 2 casos de aumento de taxa de crescimento são citados por SCHNITZER e GRUNBERG (1957), ambos com resistência para a estreptomicina, sendo um deles com Escherichia coli e outro com Staphylococcus sp.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local e Época da Pesquisa

O trabalho ora relatado foi realizado nos laboratórios do Departamento de Fitopatologia e nos laboratórios da Seção de Genética de Microrganismos do Instituto de Genética, ambos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, Piracicaba, entre março e outubro de 1973.

3.2. Isolado de *Corynebacterium michiganense*

Proveniente de tomateiro doente e cedido pelo Dr. João Lúcio de Azevedo do Instituto de Genética da ESALQ-USP.

3.3. Meios de Cultura e Drogas

O meio líquido usado foi o líquido nutriente, contendo 5 gramas de peptona e 3 gramas de extrato de carne dissolvidos em 1000 ml de água destilada. O meio sólido foi o nutriente agar, contendo 5 gramas de peptona, 3 gramas de extrato de carne e 15 gramas de agar dissolvidos em 1000 ml de água destilada.

Os antibióticos utilizados foram: sulfato de estreptomicina da Merck Sharp e Dohme S.A., penicilina G potássica da Fontoura Wyeth S.A. e eritromicina da Eli Lilly do Brasil. Para maior facilidade, tais antibióticos serão designados por estreptomicina, penicilina e eritromicina, respectivamente. As soluções de antibióticos foram sempre preparadas, momentos antes de serem utilizadas, por dissolução de quantidades apropriadas dos mesmos em água destilada.

da previamente esterilizada.

A adição do antibiótico ao meio de cultura foi sempre feita algum tempo após a autoclavagem do meio, quando este se encontrava a uma temperatura ao redor de 45° C.

3.4. Ensaio

3.4.1. Obtenção de mutantes resistentes à estreptomicina

O isolamento de mutantes resistentes à estreptomicina foi feito semeando-se 0,1 ml de cultura de Corynebacterium michiganense em placas contendo nutriente agar mais 100 mcg/ml de estreptomicina. Colônias que apareceram nessa concentração foram isoladas em nutriente agar inclinado e mantidas em estoque. A confirmação de se tratar de mutantes resistentes foi feita semeando-se esses isolados em meio líquido mais 1; 10; 20; 50; 100; 200; 500 e 1000 mcg/ml de estreptomicina. A leitura foi feita pela turvação do meio de cultura após 5-6 dias de incubação a 28° C.

3.4.2. Obtenção de mutantes resistentes à eritromicina

O isolamento de mutantes resistentes à eritromicina foi feito semeando-se 0,1 ml de cultura de Corynebacterium michiganense em placas contendo nutriente agar mais 50 mcg/ml de eritromicina. Colônias que apareceram nessa concentração foram isoladas em nutriente agar inclinado e mantidas em estoque. A confirmação de se tratar de mutantes resistentes foi feita semeando-se esses isolados em meio líquido mais 1; 10; 20; 50; 100; 200; 500 e 1000 mcg/ml de eritromicina. A leitura foi feita pela turvação do meio após 5 - 6 dias de incubação a 28° C.

3.4.3. Obtenção de mutantes resistentes à penicilina

O isolamento de mutantes resistentes à penicilina foi feito pela técnica da placa gradiente de SZYBALSKY e BRYSON (1952). Foram feitas 7 transferências, com intervalos de 5 dias entre cada uma, empregando-se os seguintes gradientes:

- a. 0 a 10 mcg/ml
- b. 0 a 30 mcg/ml
- c. 0 a 40 mcg/ml
- d. 0 a 80 mcg/ml
- e. 0 a 200 mcg/ml
- f. 0 a 400 mcg/ml
- g. 0 a 1000 mcg/ml

Colônias que apareceram no último gradiente foram isoladas em nutriente agar inclinado e mantidas em estoque. A confirmação de se tratar de mutantes resistentes foi feita semeando-se esses isolados em meio líquido mais 1; 10; 20; 50; 100; 200; 500 e 1000 mcg/ml de penicilina. A leitura foi feita pela turvação do meio de cultura após 5 - 6 dias de incubação a 28° C.

3.4.4. Resistência cruzada

O mutante resistente à estreptomicina foi ensaiado em relação à resistência para eritromicina e penicilina. O mutante resistente à eritromicina foi ensaiado em relação à resistência para estreptomicina e penicilina e, finalmente, o mutante resistente à penicilina foi ensaiado em relação à resistência para estreptomicina e eritromicina.

Todos os ensaios foram feitos inoculando-se um pequeno número de bac-

térias em 10 ml de meio líquido mais 1; 10; 20; 50; 100; 200; 500 e 1000 mcg/ml de estreptomicina ou eritromicina ou penicilina conforme o caso.

Após a incubação por 5 - 6 dias a 28° C foi feita a leitura, considerando-se a turvação do meio de cultura. O controle foi sempre feito com a linhagem original sensível.

3.4.5. Determinação do crescimento da linhagem original em relação a cada uma das linhagens mutantes através de misturas de linhagens

Em tubos de ensaio com 10 ml de meio líquido foram inoculadas as seguintes misturas de linhagens:

- a. linhagem original + linhagem estreptomicina resistente
- b. linhagem original + linhagem eritromicina resistente
- c. linhagem original + linhagem penicilina resistente

Amostras foram retiradas nos tempos 0; 24; 48 e 96 horas sendo, em seguida, semeadas em placas com nutriente agar. Após 3 dias de incubação a 28° C, determinava-se o número de bactérias sensíveis e resistentes existentes em cada tempo, através da técnica da réplica de LEDERBERG e LEDERBERG (1952). A réplica era feita das placas onde cresciam as colônias em nutriente agar para placas com nutriente agar acrescidas do antibiótico em questão. A concentração de antibiótico no meio foi de 100 mcg/ml para a estreptomicina e de 50 mcg/ml para a eritromicina e penicilina. Quando as placas continham um número muito pequeno ou um número exagerado de colônias fizeram-se réplicas de colônias para placas com as quantidades de antibióticos já citadas.

Desta maneira puderam ser estabelecidas as porcentagens de células re

sistentes e sensíveis nas diversas misturas de linhagens e nos diversos tempos ensaiados.

3.4.6. Curvas de crescimento

A determinação da curva de crescimento foi feita para cada uma das 4 linhagens: estreptomicina resistente, eritromicina resistente, penicilina resistente e original. O crescimento bacteriano foi medido utilizando-se o método de contagem de células, feito indiretamente através de contagem de colônias em placas, conforme AZEVEDO e NEDER (1968). Culturas de 5 - 6 dias da linhagem original e dos mutantes resistentes eram diluídas de modo a permitir que um número determinado de células fosse inoculado em tubos com 10 ml de líquido nutriente, os quais eram incubados a 28° C. Amostras de 0,1 ml foram retiradas nos tempos 0; 3; 24; 48; 72 e 96 horas e, em seguida, semeadas em placas com nutriente agar. As placas foram incubadas a 28° C e, depois de 3 dias, foram contadas as colônias.

3.5. Análise dos Ensaios

3.5.1. O conceito de droga forte, droga fraca e droga neutra

Se a proporção de genótipos de uma população altera-se em resposta a uma pressão seletiva introduzida, essa proporção, quando a pressão seletiva for removida, poderá permanecer inalterada ou reverter à proporção da população original ou cada vez mais se distanciar da proporção da população original.

Desta maneira, se for adicionado um antibiótico a um meio, onde cresce uma linhagem bacteriana sensível a esse antibiótico, apenas as células mu-

tantes resistentes poderão crescer. Se essas células voltarem a ser cultivadas em meio sem o antibiótico, com o correr do tempo, poderá haver predominância da linhagem sensível original ou da linhagem mutante resistente ou a proporção manter-se-á inalterada.

A seleção em direção à resistência, que ocorreu na passagem da população sensível à população resistente ao antibiótico é chamada de seleção direcional (VAN DER PLANK, 1968). A seleção em direção à população original, que pode ocorrer quando a pressão seletiva é removida, é chamada de seleção estabilizadora (VAN DER PLANK, 1968). A seleção em direção à população mutante resistente, que pode ocorrer quando a pressão seletiva é removida, é, aqui, chamada de seleção estabilizadora negativa. E, finalmente, se não houver alteração na proporção de células sensíveis e resistentes, na ausência da pressão seletiva, diz-se que não houve nenhum tipo de seleção estabilizadora.

São essas 3 situações que são usadas na conceituação de droga forte, droga fraca e droga neutra. Em outras palavras, uma droga é forte quando, num meio sem a droga, a seleção estabilizadora age sobre o mutante resistente a essa droga. É fraca quando, num meio sem a droga, a seleção estabilizadora negativa age sobre o mutante resistente a essa droga. E, é neutra quando, num meio sem a droga, nem a seleção estabilizadora nem a seleção estabilizadora negativa age sobre o mutante resistente.

3.5.2. Como determinar quantitativamente a força de uma droga

A medição quantitativa da força de uma droga se faz através do mutante resistente a essa droga. Existem dois métodos que permitem essa determinação, ambos baseados no conceito de meia-vida relativa (MV_r), que será apresentado a seguir.

3.5.2.1. Determinação através da mistura da linhagem original com cada uma das linhagens mutantes

O ensaio descrito em 3.4.5. permite a construção de uma tabela com as seguintes 4 colunas: colunas A e B onde são colocadas as porcentagens das linhagens sensível e mutante, respectivamente, obtidas nos diversos tempos ensaiados. Coluna C onde são colocadas as porcentagens, também nos diversos tempos, da linhagem resistente recalculadas supondo-se o valor 100 para as porcentagens encontradas para a linhagem selvagem. E, finalmente, a coluna D onde são colocados os logaritmos dos números da coluna C, que será chamada de $X = \log_{10} C$.

De posse desses dados, pode-se calcular o coeficiente de regressão linear r de X sobre t , sendo t uma unidade de tempo, de acordo com a equação:

$$X = X_0 + rt$$

A força da droga é expressa pelo cociente $\frac{\log 1/2}{r}$ e que será chamado de meia-vida relativa (MV_r) da linhagem mutante resistente em relação à linhagem selvagem. O significado da MV_r pode ser analisado através da figura 1, que representa o caso típico de uma droga forte, onde:

$$r = \frac{-(\log C - \log C/2)}{MV_r} = \frac{\log C/2 - \log C}{MV_r} = \frac{\log \frac{C/2}{C}}{MV_r} \quad \text{ou}$$

$$r = \frac{\log 1/2}{MV_r} \quad \text{e, portanto}$$

$$MV_r = \frac{\log 1/2}{r}$$

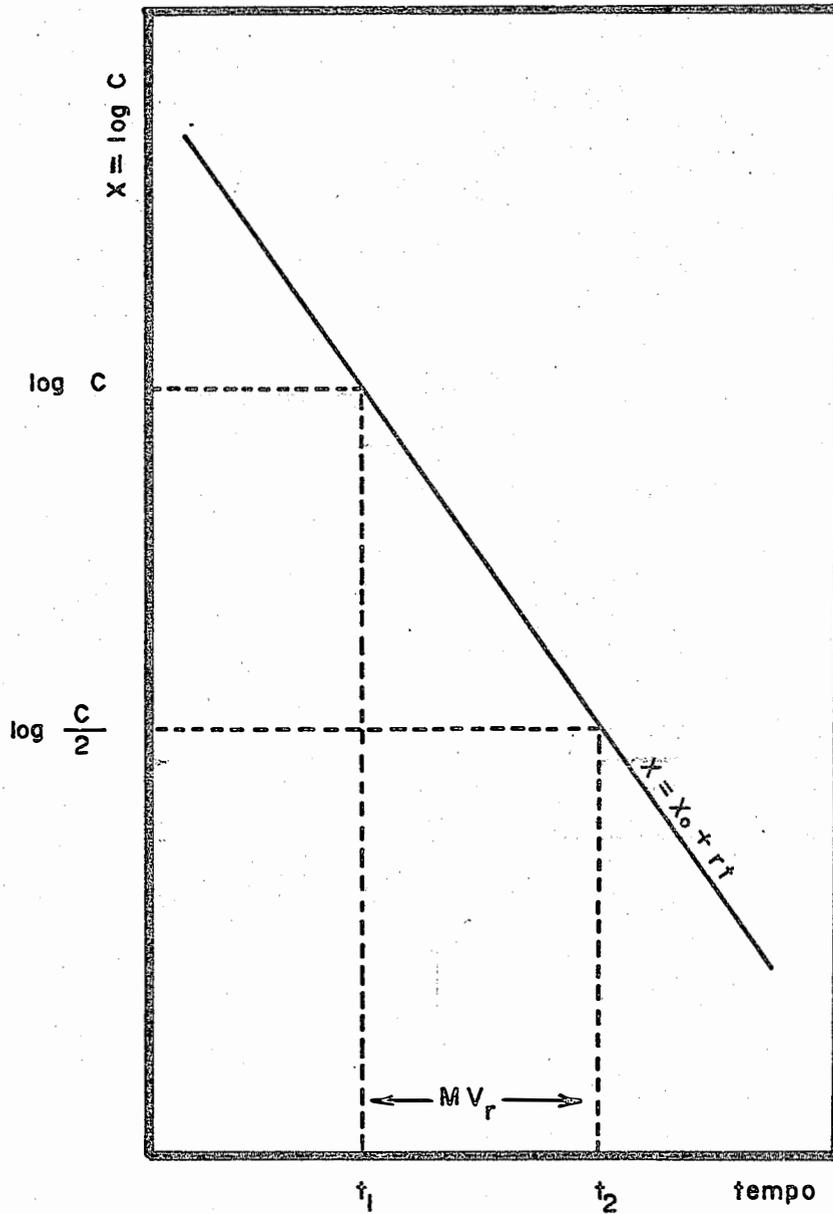


Figura 1 - O significado da MV_r é o tempo necessário para uma população de uma dada linhagem de um microorganismo cair até a metade ou dobrar em relação a uma outra linhagem considerada.

Pela dedução apresentada torna-se fácil entender o significado biológico da MV_r : é o tempo necessário para a população de uma dada linhagem de um microrganismo cair até a metade ou dobrar em relação a uma outra linhagem considerada. Desta maneira, valores positivos do coeficiente de regressão linear r indicam droga fraca, valores negativos indicam droga forte e, finalmente, r nulo indica droga neutra.

A conceituação biológica da MV_r foi primeiro desenvolvida por VAN DER PLANK (1968 e 1969) sendo, até aqui, aplicada somente ao estudo da capacidade de sobrevivência de raças virulentas de patógenos vegetais.

3.5.2.2. Determinação através das curvas de crescimento da linhagem original e das linhagens mutantes resistentes

A MV_r da linhagem mutante resistente em relação à linhagem selvagem também pode ser calculada a partir das curvas de crescimento de ambas as linhagens. As curvas que aparecem na figura 2 representam o crescimento de duas linhagens hipotéticas, A e B, cujas equações são, respectivamente:

$$X_A = X_0 e^{r_A t}$$

e

$$X_B = X_0 e^{r_B t}$$

onde X_A e X_B representam o número de indivíduos após um tempo t , X_0 o número inicial de indivíduos, r_A e r_B as taxas de crescimento de cada uma das linhagens, t o tempo considerado e, finalmente, e que é igual a 2,718.

Supondo ser este um caso de droga forte, B seria a linhagem mutante resistente e, portanto, sua MV_r em relação à linhagem A é o tempo necessário para que sua população caia até a metade em relação à da linhagem A. Supondo

igual o número inicial de indivíduos de ambas as linhagens, podemos também dizer que a MV_r é o tempo necessário para que o número de indivíduos de A torne-se o dobro do número de indivíduos de B. Em vista disso, podemos escrever o que segue, onde o tempo t representa a MV_r de B em relação a A.

$$\frac{X_A}{\frac{X_A}{2}} = \frac{X_0}{X_0}, \frac{e^{r_A t}}{e^{r_B t}} \text{ ou } 2 = e^{t(r_A - r_B)} \text{ ou}$$

$$\log_e 2 = t(r_A - r_B) \text{ ou}$$

$MV_r = t = \frac{0,693}{r_A - r_B}$

Os valores de r_A e r_B podem ser facilmente calculados a partir das curvas de crescimento das linhagens A e B por regressão linear. Esta abordagem para a determinação da MV_r também foi primeiro desenvolvida por VAN DER PLANK (1968) sendo empregada nos estudos de sobrevivência de raças virulentas de patógenos vegetais.

Se, na fórmula citada acima, r_A for sempre a taxa de crescimento da linhagem original, valores da diferença $r_A - r_B$ positivos indicam droga forte, negativos droga fraca e, quando essa diferença for nula, droga neutra.

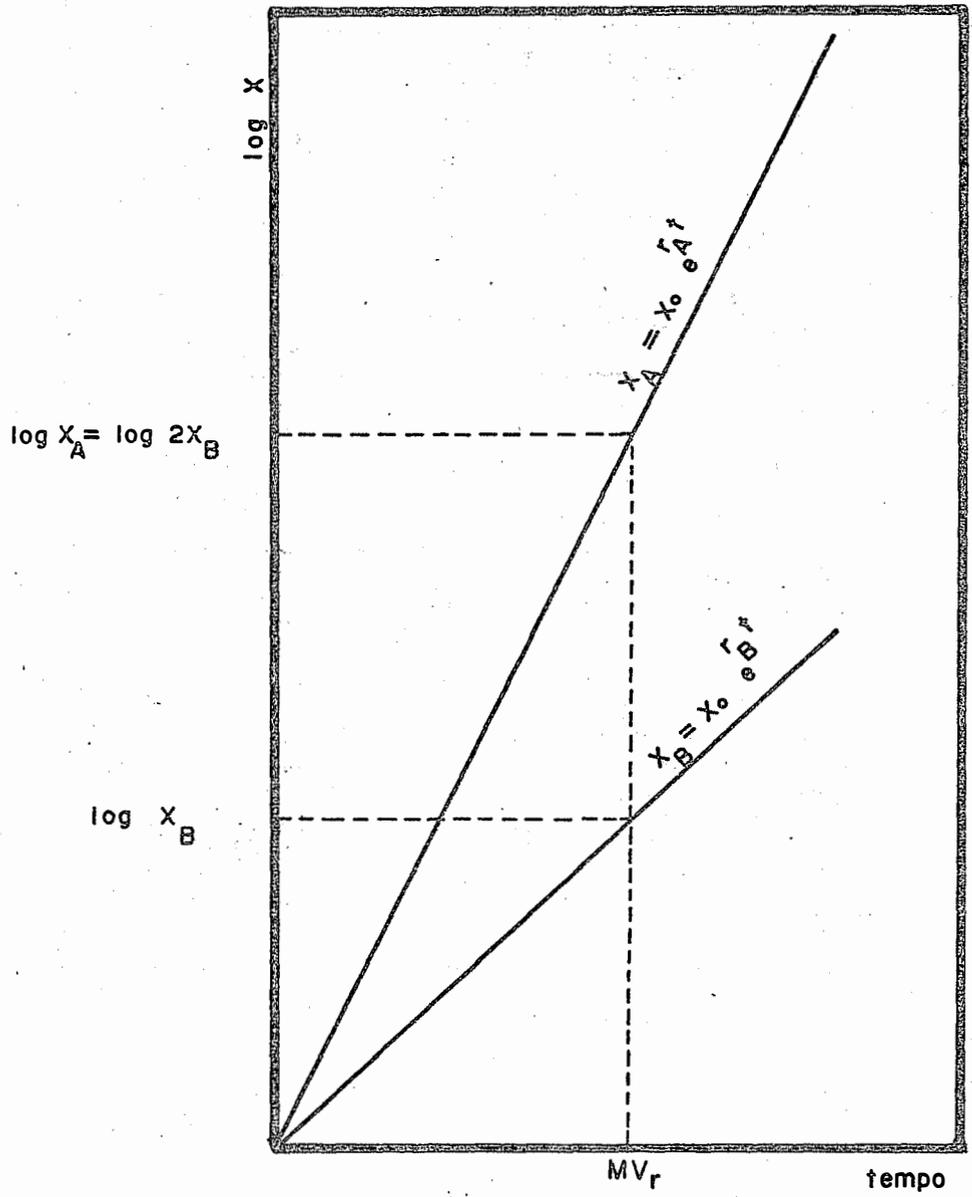


Figura 2 - A MV_r determinada pelas curvas de crescimento.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados dos Ensaios

4.1.1. Obtenção de mutantes resistentes à estreptomicina

Foram isoladas 6 colônias que cresceram em nutriente agar mais 100 mcg/ml de estreptomicina, conforme descrito em 3.4.1. A comparação quanto aos níveis de resistência ao antibiótico entre a linhagem original e os mutantes é mostrada na tabela 1.

Tabela 1 - Mutantes resistentes de C. michiganense à estreptomicina ensaiados em meio líquido + estreptomicina. Comparação com a linhagem original.

Colônias Testadas	Concentração de estreptomicina (mcg/ml)								
	0	1	10	20	50	100	200	500	1000
Mutante 1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Mutante 2	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Mutante 3	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Mutante 4	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Mutante 5	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Mutante 6	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Linhagem original	+	+	-	-	-	-	-	-	-

+ = turvação

- = sem turvação

Nos ensaios seguintes usou-se o mutante 1

4.1.2. Obtenção de mutantes resistentes à eritromicina

Foram isoladas 3 colônias que cresceram em nutriente agar mais 50 mcg/ml de eritromicina, conforme descrito em 3.4.2. A comparação quanto aos níveis de resistência ao antibiótico entre a linhagem original e os mutantes é mostrada na tabela 2.

Tabela 2 - Mutantes resistentes de C. michiganense à eritromicina ensaiados em meio líquido + eritromicina. Comparação com a linhagem original

Colônias Testadas	Concentração de eritromicina (mcg/ml)								
	0	1	10	20	50	100	200	500	1000
Mutante 1	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Mutante 2	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Mutante 3	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Linhagem original	+	+	+	+	-	-	-	-	-

+ = turvação

- = sem turvação

Nos ensaios seguintes usou-se o mutante 1.

4.1.3. Obtenção de mutantes resistentes à penicilina

Foram isoladas 4 colônias que cresceram no gradiente de 0 a 1000 mcg/ml de penicilina. A comparação quanto aos níveis de resistência ao antibiótico entre a linhagem original e os mutantes é mostrada na tabela 3

Tabela 3 - Mutantes resistentes de C. michiganense à penicilina ensaiados em meio líquido + penicilina. Comparação com a linhagem original.

Colônias Testadas	Concentração de penicilina (mcg/ml)								
	0	1	10	20	50	100	200	500	1000
Mutante 1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Mutante 2	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Mutante 3	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Mutante 4	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Linhagem original	+	+	-	-	-	-	-	-	-

+ = turvação

- = sem turvação

Nos ensaios seguintes usou-se o mutante 2.

4.1.4. Resistência cruzada

Os resultados para a estreptomicina, eritromicina e penicilina frente a cada um dos mutantes e linhagem original são mostrados nas tabelas 4, 5 e 6 respectivamente.

Tabela 4 - Teste de inibição de linhagens, original e mutantes, de C. michiganense à estreptomicina

Linhagens Testadas	Concentração de estreptomicina (mcg/ml)									
	0	1	10	20	50	100	200	500	1000	
Mutante resistente à estreptomicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Mutante resistente à eritromicina	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Mutante resistente à penicilina	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Linhagem original	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

+ = turvação

- = sem turvação

Tabela 5 - Teste de inibição de linhagens, original e mutantes, de C. michiganense à eritromicina

Linhagens Testadas	Concentração de eritromicina (mcg/ml)								
	0	1	10	20	50	100	200	500	1000
Mutantes resistentes à estreptomicina	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Mutante resistente à eritromicina	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Mutante resistente à penicilina	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Linhagem original	+	+	+	+	-	-	-	-	-

+ = turvação

- = sem turvação

Tabela 6 - Teste de inibição de linhagens, original e mutantes, de C. michiganense à penicilina

Linhagens Testadas	Concentração de penicilina (mcg/ml)								
	0	1	10	20	50	100	200	500	1000
Mutante resistente à estreptomicina	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Mutante resistente à eritromicina	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Mutante resistente à penicilina	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Linhagem original	+	+	-	-	-	-	-	-	-

+ = turvação

- = sem turvação

4.1.5. Determinação do crescimento da linhagem original em relação a cada uma das linhagens mutantes através de misturas de linhagens

Os resultados dos ensaios descritos em 3.4.5. estão nas tabelas 7, 8 e 9 respectivamente para as misturas da linhagem original com o mutante estreptomicina resistente, eritromicina resistente e penicilina resistente.

Tabela 7 - Efeito do período de cultivo em líquido nutriente sobre a percentagem de linhagens, original e resistente à estreptomicina, de C. mi-chiganense em mistura. (Resultados de 3 experimentos)

Tempo (horas)	Número de Bactérias Ensaçadas*	Número de Bactérias Resistentes	% de Bactérias Resistentes	Médias %
0	101	51	50,50	61,51
	72	31	43,06	
	155	141	90,97	
24	55	28	50,91	59,47
	110	44	40,00	
	48	42	87,50	
48	22	10	45,45	54,53
	35	13	37,14	
	121	98	80,99	
96	86	38	44,19	51,96
	80	29	36,25	
	171	129	75,44	

$$\chi^2 = 17,685^{***}$$

$$p = 0,1$$

* 3 a 5 placas

Tabela 8 - Efeito do período de cultivo em líquido nutriente sobre a porcentagem de linhagens, original e resistente à eritromicina, de C. mi-chiganense em mistura. (Resultados de 3 experimentos)

Tempo (horas)	Número de Bactérias Ensaaiadas*	Número de Bactérias Resistentes	% de Bactérias Resistentes	Médias %
0	116	103	88,79	64,86
	53	22	41,51	
	98	63	64,29	
24	42	35	83,33	58,98
	91	34	37,36	
	112	63	56,25	
48	24	19	79,17	57,93
	113	45	39,82	
	427	234	54,80	
96	33	23	69,70	48,58
	132	36	27,27	
	82	40	48,78	

$\chi^2 = 48,10^{***}$ $p = 0,1$

* 3 a 5 placas

Tabela 9 - Efeito do período de cultivo em líquido nutriente sobre a porcentagem de linhagens, original e resistente à penicilina, de C. michiganense em mistura. (Resultados de 3 experimentos)

Tempo (horas)	Número de Bactérias Ensaaiadas*	Número de Bactérias Resistentes	% de Bactérias Resistentes	Médias %
0	37	17	45,95	53,74
	41	33	80,49	
	115	40	34,78	
24	90	37	41,11	45,96
	122	89	72,95	
	42	10	23,81	
48	45	14	31,11	42,30
	89	63	70,79	
	28	7	25,00	
96	71	13	18,31	26,52
	81	44	54,32	
	447	31	6,94	

$\chi^2 = 183,16^{***}$ $p = 0,1$

* 3 a 5 placas

4.1.6. Curvas de crescimento

Os resultados dos ensaios descritos em 3.4.6. estão nas tabelas 10, 11, 12 e 13 respectivamente para a linhagem original, linhagem estreptomicina resistente, linhagem eritromicina resistente e linhagem penicilina resistente. A representação gráfica dos dados para as 4 linhagens está na figura 3.

Tabela 10 - Número médio de células viáveis por ml da linhagem original em diversos tempos

Horas	Diluições*	Nº Médio de Colônias por placa**	Nº de Bactérias viáveis por ml	Redução a uma Bactéria	Médias
0	sem diluir	6	60	1	
		10,4	104	1	1
		127,5	1275	1	
3	sem diluir	10,2	102	1,7	
		15	150	1,44	1,57
		-	-	-	
24	10^{-2}	42	$4,20 \cdot 10^4$	$7,00 \cdot 10^2$	
		64	$6,40 \cdot 10^4$	$6,15 \cdot 10^2$	$4,91 \cdot 10^2$
		204	$2,04 \cdot 10^5$	$1,60 \cdot 10^2$	
48	10^{-7}	2	$2,00 \cdot 10^8$	$3,33 \cdot 10^6$	
		-	-	-	$4,85 \cdot 10^6$
		81,4	$8,14 \cdot 10^9$	$6,38 \cdot 10^6$	
72	10^{-9}	-	-	-	
		91,5	$9,15 \cdot 10^{11}$	$8,79 \cdot 10^9$	$7,37 \cdot 10^9$
		761	$7,61 \cdot 10^{12}$	$5,96 \cdot 10^9$	
96	10^{-10}	35	$3,50 \cdot 10^{12}$	$5,83 \cdot 10^{10}$	
		82	$8,20 \cdot 10^{12}$	$7,88 \cdot 10^{10}$	$6,86 \cdot 10^{10}$
		-	-	-	

* 0,1 ml plaqueados

** 3 a 5 placas

Tabela 11 - Número médio de células viáveis por ml da linhagem estreptomicina resistente em diversos tempos. (Resultados de 3 experimentos)

Horas	Diluições*	Nº Médio de Colônias por placa**	Nº de Bactérias viáveis por ml	Redução a uma Bactéria	Médias
0	sem diluir	3	30	1	1
		12,5	125	1	
		51,3	513	1	
3	sem diluir	5,2	52	1,73	1,43
		13	130	1,04	
		79	790	1,53	
24	10^{-2}	31	$3,10 \cdot 10^4$	$1,03 \cdot 10^3$	$7,09 \cdot 10^2$
		48,5	$4,85 \cdot 10^4$	$3,88 \cdot 10^2$	
		-	-	-	
48	10^{-6}	-	-	-	$4,33 \cdot 10^6$
		6	$6,00 \cdot 10^7$	$4,80 \cdot 10^5$	
		420,3	$4,20 \cdot 10^9$	$8,18 \cdot 10^6$	
72	10^{-8}	96	$9,50 \cdot 10^{10}$	$3,16 \cdot 10^9$	$2,36 \cdot 10^9$
		-	-	-	
		802	$8,02 \cdot 10^{11}$	$1,56 \cdot 10^9$	
96	10^{-9}	-	-	-	$3,26 \cdot 10^{10}$
		520	$5,20 \cdot 10^{12}$	$4,16 \cdot 10^{10}$	
		1220	$1,22 \cdot 10^{13}$	$2,37 \cdot 10^{10}$	

* 0,1 ml plaqueados

** 3 a 5 placas

Tabela 12 - Número médio de células viáveis por ml da linhagem eritromicina resistente em diversos tempos. (Resultados de 3 experimentos)

Tempo (horas)	Diluições*	Nº Médio de Colônias por placa**	Nº de Bactérias viáveis por ml	Redução a uma Bactéria	Médias
0	sem diluir	38,5	385	1	
		147,2	1472	1	1
		428	4280	1	
3	sem diluir	41,7	417	1,08	
		152	1520	1,03	1,15
		581,5	5815	1,35	
24	10^{-2}	-	-	-	
		427	$4,27 \cdot 10^5$	$2,90 \cdot 10^2$	$3,22 \cdot 10^2$
		1522	$1,52 \cdot 10^6$	$3,55 \cdot 10^2$	
48	10^{-6}	13,2	$1,32 \cdot 10^8$	$3,42 \cdot 10^5$	
		71,6	$7,16 \cdot 10^8$	$4,86 \cdot 10^5$	$2,25 \cdot 10^6$
		2540	$2,54 \cdot 10^{10}$	$5,93 \cdot 10^6$	
72	10^{-8}	81	$8,10 \cdot 10^{10}$	$2,10 \cdot 10^8$	
		413	$4,13 \cdot 10^{11}$	$2,80 \cdot 10^8$	$3,27 \cdot 10^8$
		2110	$2,11 \cdot 10^{12}$	$4,93 \cdot 10^8$	
96	10^{-9}	1021	$1,02 \cdot 10^{13}$	$2,64 \cdot 10^{10}$	
		-	-	-	$1,47 \cdot 10^{10}$
		1325	$1,32 \cdot 10^{13}$	$3,08 \cdot 10^9$	

* 0,1 ml plaqueados

** 3 a 5 placas

Tabela 13 - Número médio de células viáveis por ml da linhagem penicilina resistente em diversos tempos. (Resultados de 3 experimentos)

Tempo (horas)	Diluições*	Nº Médio de Colônias por placa**	Nº de Bactérias viáveis por ml	Redução a uma Bactéria	Médias
0	sem diluir	29	290	1	1
		372	3720	1	
		8,5	85	1	
3	sem diluir	33,2	332	1,14	1,07
		381	3810	1,02	
		9	90	1,05	
24	10^{-2}	167	$1,67 \cdot 10^5$	$5,75 \cdot 10^2$	$3,69 \cdot 10^2$
		914	$9,14 \cdot 10^5$	$2,45 \cdot 10^2$	
		24,4	$2,44 \cdot 10^4$	$2,87 \cdot 10^2$	
48	10^{-6}	9,2	$9,20 \cdot 10^7$	$3,17 \cdot 10^5$	$3,34 \cdot 10^5$
		-	-	-	
		3	$3,00 \cdot 10^7$	$3,52 \cdot 10^5$	
72	10^{-8}	52	$5,20 \cdot 10^{10}$	$1,79 \cdot 10^8$	$1,46 \cdot 10^8$
		421	$4,21 \cdot 10^{11}$	$1,13 \cdot 10^8$	
		-	-	-	
96	10^{-9}	21,2	$2,12 \cdot 10^{11}$	$7,31 \cdot 10^8$	$6,00 \cdot 10^8$
		-	-	-	
		4	$4,00 \cdot 10^{10}$	$4,70 \cdot 10^8$	

* 0,1 ml plaqueados

** 3 a 5 placas

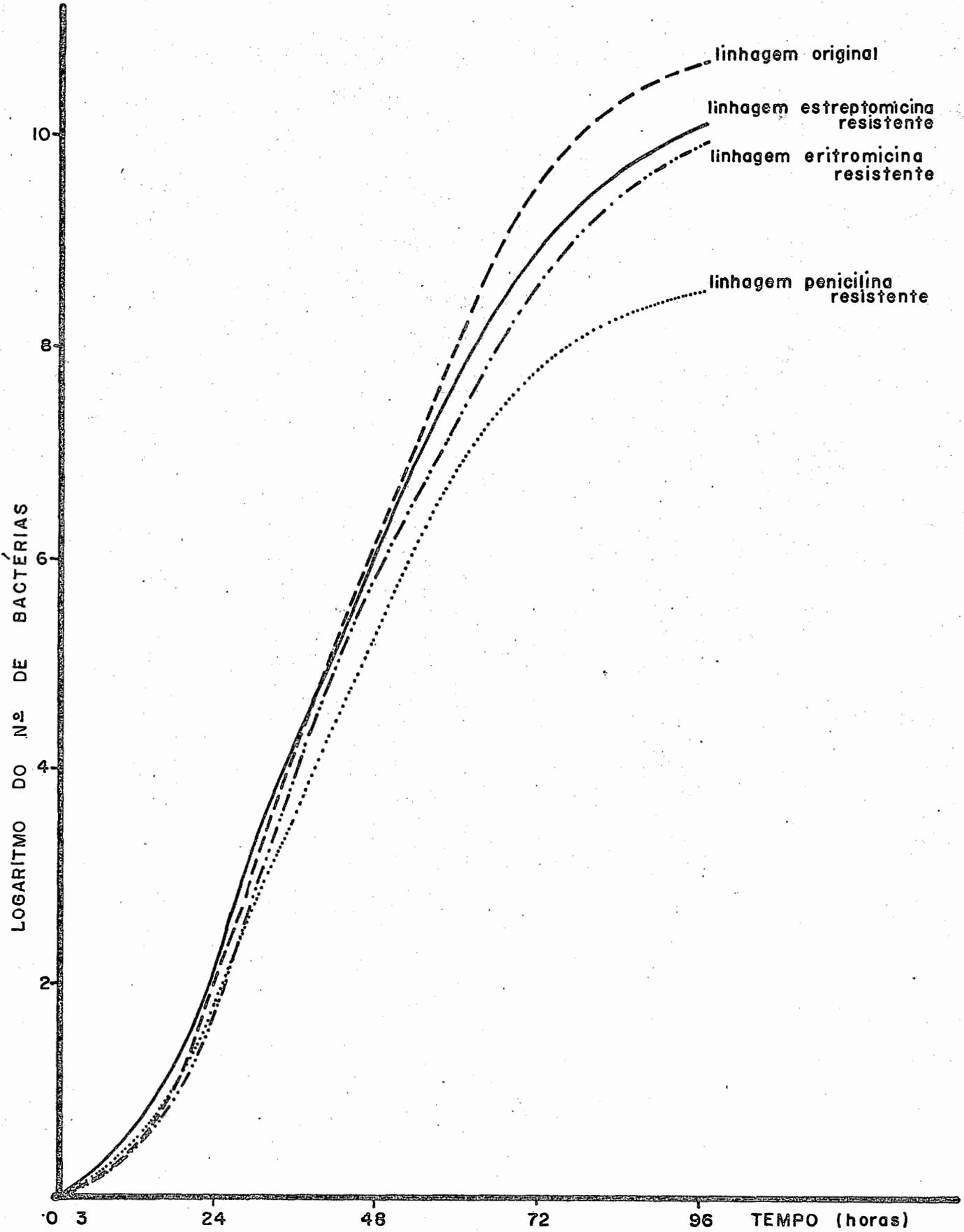


Figura 3 - As curvas de crescimento das linhagens, original, estreptomicina resistente, eritromicina resistente e penicilina resistente, de C. michiganense.

4.2. Resultados da Análise dos Ensaios

4.2.1. Determinação das forças das drogas através da mistura da linhagem original com cada uma das linhagens mutantes

Os resultados da análise dos ensaios que aparecem em 4.1.5., feita de acordo com 3.5.2.1., estão nas tabelas 14, 15 e 16 respectivamente para a linhagem estreptomocina resistente, eritromicina resistente e penicilina resistente. Os valores do coeficiente de regressão linear (r), com seus respectivos erros, calculados segundo STEEL e TORRIE (1960) e da meia-vida relativa (MV_r) para cada um dos 3 mutantes, calculados a partir dos dados das tabelas 14, 15 e 16, também de acordo com 3.5.2.1., estão na tabela 17.

Tabela 14 - Quantidade relativa de linhagens, estreptomocina resistente e original, de C. michiganense quando cultivadas em mistura

Tempo (horas)	<u>A</u> % Bactérias Sensíveis	<u>B</u> % Bactérias Resistentes	<u>C</u> % Bactérias Resistentes (Recalculado)	<u>D</u> $X = \log_{10} C$
0	38,49	61,51	159,81	2,201
24	40,53	59,47	146,73	2,164
48	45,47	54,53	119,93	2,075
96	48,04	51,96	108,16	2,033

Tabela 15 - Quantidade relativa de linhagens, eritromicina resistente e original, de C. michiganense quando cultivadas em mistura.

Tempo (Horas)	<u>A</u> % Bactérias Sensíveis	<u>B</u> % Bactérias Resistentes	<u>C</u> % Bactérias Resistentes (recalculado)	<u>D</u> $X = \log_{10} C$
0	35,14	64,86	184,58	2,264
24	41,02	58,98	143,78	2,155
48	42,07	57,93	137,70	2,136
96	51,42	48,58	94,48	1,974

Tabela 16 - Quantidade relativa de linhagens, penicilina resistente e original, de C. michiganense quando cultivadas em mistura

Tempo (horas)	<u>A</u> % Bactérias Sensíveis	<u>B</u> % Bactérias Resistentes	<u>C</u> % Bactérias Resistentes (recalculado)	<u>D</u> $X = \log_{10} C$
0	46,26	53,74	116,17	2,064
24	54,04	45,96	85,05	1,929
48	57,70	42,30	73,31	1,863
96	73,48	26,52	36,09	1,556

Tabela 17 - Valores do coeficiente de regressão linear (r) e da meia-vida relativa (MV_r) dos 3 mutantes calculados através da mistura de linhagens

Linhagem	r	MV_r (horas)	
Estreptomicina resistente	$-0,00179 \pm 0,0007681$	máximo	294,52
		médio	168,16
		mínimo	117,67
Eritromicina resistente	$-0,00288 \pm 0,0003850$	máximo	120,64
		médio	104,51
		mínimo	92,19
Penicilina resistente	$-0,00518 \pm 0,0005657$	máximo	65,24
		médio	58,11
		mínimo	52,38

4.2.2. Determinação das forças das drogas através das curvas de crescimento da linhagem original e das linhagens mutantes

Os valores do coeficiente de regressão linear (r), com seus respectivos erros, calculados segundo STEEL e TORRIE (1960), de cada uma das 4 linhagens e da meia-vida relativa (MV_r) da linhagem penicilina resistente apenas, já que os coeficientes dos outros dois mutantes confundem-se com o da linhagem original, calculados a partir dos dados das tabelas 10, 11, 12 e 13, de acordo com 3.5.2.2., estão na tabela 18.

Tabela 18 - Valores do coeficiente de regressão linear (r) das 4 linhagens e os valores da meia-vida relativa (MV_r) da linhagem penicilina resistente calculados através de curvas de crescimento

Linhagem	r	MV_r (horas)
Estreptomicina resistente	$0,11755 \pm 0,008843$	-
Eritromicina resistente	$0,11232 \pm 0,007281$	-
Penicilina resistente	$0,09968 \pm 0,008445$	máximo 144,98 médio 30,66 mínimo 17,14
Original	$0,12228 \pm 0,009375$	-

5. DISCUSSÃO

5.1. Aspectos Teóricos Gerais

O fato da aquisição de resistência a agentes inibidores por um microrganismo poder acarretar uma diminuição ou um aumento ou manter inalterada sua taxa de crescimento é um problema intrigante cujas causas, até hoje, não foram bem esclarecidas.

Considerando que o gene que confere resistência à droga não foi adicionado ao cromossomo do microrganismo e sim que provém de uma mutação num gene preexistente, o qual, a partir do momento em que se deu a mutação, deixou de executar sua antiga função, é possível apresentar uma explicação razoável para tal problema.

Assim, se aquele gene preexistente, que foi alterado pela mutação, controlasse uma importante função no metabolismo do microrganismo, o mutante, que não mais o possui, terá sua taxa de crescimento diminuída. Se, porém, esse gene controlasse uma função secundária para a célula como, por exemplo, sua morfologia, o mutante não terá alterada sua taxa de crescimento. Finalmente, pode-se imaginar o caso onde a mutação para resistência à droga traga, como efeito colateral, uma aceleração em algum processo importante para a célula com conseqüente aumento da taxa de crescimento. Os 3 casos estão esquematizados na figura 4.

Por definição, seriam consideradas drogas fortes aquelas que se enquadrassem na primeira situação descrita acima, fracas aquelas que acarretassem alterações que pudessem ser incluídas na última situação e neutras as que coubessem na situação intermediária.

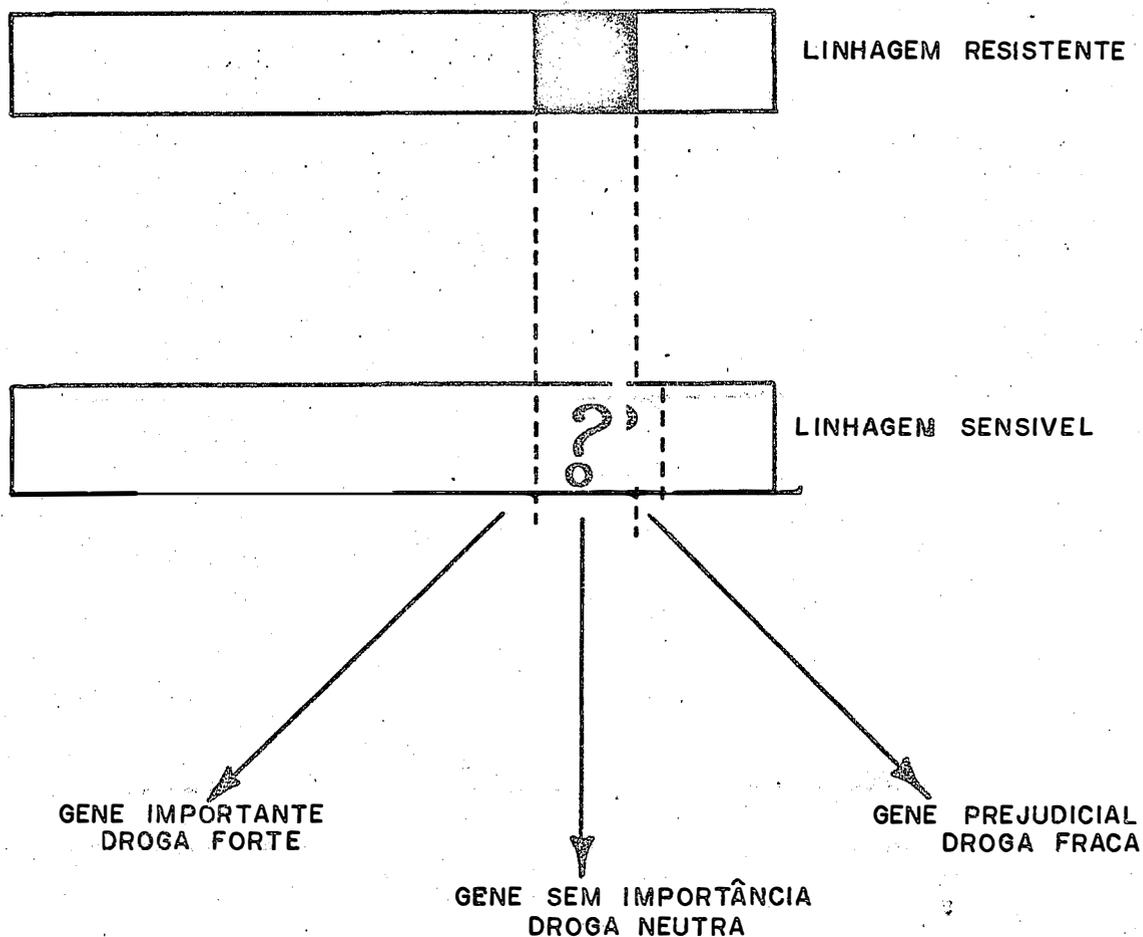


Figura 4 - Os 3 tipos de drogas. Na figura estão representados dois cromossomos: o superior pertence à linhagem resistente a uma droga qualquer e o inferior pertence à linhagem sensível. A região escura no cromossomo superior é o gene que confere a resistência e o ponto de interrogação, na sensível, representa o gene perdido quando da aquisição da resistência.

O fato de se aceitar essa teoria como correta, para explicar os diferentes comportamentos dos mutantes resistentes às drogas, quanto às suas taxas de crescimento, implica em, pelo menos, 3 consequências:

a) ao contrário do que acontece com os modelos de resistência que são, de um modo geral, características dos agentes inibidores (GURGEL e AZEVEDO, 1969), a força das drogas não é característica nem delas mesmas somente e nem dos microrganismos, mas sim do complexo droga-microrganismo. E, ainda assim, com uma ressalva: para dois mutantes resistentes a uma mesma droga, mas cada um deles tendo um gene diferente conferindo essa resistência, a força da droga provavelmente não será a mesma para ambos os casos. Em situações como esta, para fins práticos, a droga deverá ser classificada de acordo com a seguinte prioridade: fraca, neutra, forte. Desta maneira, uma droga só poderá ser considerada forte em relação a um determinado microrganismo se, entre todos os mutantes resistentes desse microrganismo a ela, não houver nenhum que tenha sua taxa de crescimento aumentada, caso de droga fraca, ou inalterada, caso de droga neutra, em relação ao microrganismo original sensível.

b) considerando que o conjunto de genes de cada espécie de microrganismo, em virtude de séculos de seleção, esteja com um balanceamento muito próximo do ideal para um dado ambiente, é de se esperar que um mutante resistente a uma droga, na ausência da droga, na maioria das vezes, seja menos apto a sobreviver que a linhagem original. Daí esperar-se que a maioria das drogas comporte-se como forte, algumas como neutras e pouquíssimas como fracas.

c) espera-se que, na maioria dos casos, as drogas que apresentam modelos de resistência do tipo múltiplos passos sejam fortes e tanto mais fortes quanto maiores os níveis de resistência dos mutantes resistentes a elas. Isso devido ao maior número de genes que a linhagem mutante perde para

tornar-se resistente, com conseqüente aumento de probabilidade de um deles ser importante para a sobrevivência da linhagem, sem se considerar o efeito a ditivo prejudicial que os genes perdidos deverão acarretar. Por esse mesmo raciocínio, dentre as drogas que se comportarem como neutras ou fracas, que deverão ser minoria no total, a maioria deverá seguir o modelo de resistência de um só passo.

Um outro aspecto muito interessante, que por certo merecerá estudos posteriores, é a relação existente entre os valores de MV_r de 2 linhagens mutantes resistentes de um microrganismo, cada uma delas resistente a uma droga diferente e o valor da MV_r para o mutante resistente às duas drogas. O conhecimento exato do que acontece em casos como este traria novos subsídios à interpretação correta do efeito benéfico da terapia múltipla que, além de diminuir o número de indivíduos resistentes, pois eles teriam que ser resistentes a mais de uma droga ao mesmo tempo, provavelmente, desde que as drogas envolvidas sejam fortes, terá a vantagem de aumentar a seleção estabilizadora contra os indivíduos com resistência a diversas drogas. Por outro lado, o efeito de se juntar, numa mesma linhagem, resistência a uma droga forte com uma droga fraca ou com uma neutra, sobre sua MV_r , também seria interessante ser conhecido.

A hipótese formulada no início desta discussão, para explicar as frequentes alterações na taxa de crescimento de microrganismos, decorrente da aquisição de resistência a agentes inibidores, não é exclusiva para eles. Assim, é de se esperar que situações semelhantes ocorrem em outros grupos, se bem que, quanto mais evoluído o grupo, menor as possibilidades de que tal aconteça, em virtude do maior número de genes que tais grupos terão. Com isso será muito mais difícil que um único gene perdido possa acarretar alterações tão drásticas como as que ocorrem entre os microrganismos. Entre os insetos, GEORGHIOU (1972) ressalta a existência do fenômeno e, um dos casos citados por ele, referente à aquisição de resistência da mosca doméstica ("housefly") contra os inseticidas M.I.P. (metilcarbamato de m-isopropil-fenil) e

isolari (dimetilcarbamato de 1-isopropil-3-metil-5 pirazolil) é típico de droga neutra para o isolan e droga forte para o M.I.P.

GEORGHIOU (1972) assinala ainda que, de um modo geral, se a pressão seletiva do inseticida sobre a população de insetos for bastante prolongada, a desvantagem dos mutantes resistentes em relação aos originais sensíveis é anulada em virtude de, provavelmente, haver um balanceamento melhor entre os genes dos indivíduos resistentes. Tal fato não é conhecido entre os microrganismos, provavelmente devido ao menor número de genes que eles possuem, com conseqüente menor flexibilidade para eventuais adaptações.

Como se vê, a situação dos mutantes resistentes a drogas, na ausência das drogas, não é, de um modo geral, nada favorável. Em vista disso, seria interessante especular se a aquisição dos fatores R pelas bactérias não foi o caminho encontrado por elas para fugir da seleção estabilizadora pois, neste caso, as bactérias ganham os genes de resistência e não perdem aqueles outros genes que possibilitam a ação da seleção estabilizadora. Evidências de que bactérias portadoras de fator R não são menos aptas em sobreviver, quando comparadas com aquelas que não possuem tal fator, são apresentadas por WATANABE (1972) e incluem, entre outros, os 3 sugestivos trabalhos seguintes:

a) SMITH (1967) caracterizando 30 linhagens de Escherichia coli isolados em 1946, antes, portanto, da era dos antibióticos, mantidas por liofilização, encontrou uma que possuía fator R, o qual conferia resistência à estreptomicina, tetraciclina e bluensomicina.

b) GARDNER, SMITH, BEER e MOELLERING (1969) caracterizando 40 espécimens de bactérias gram-negativas, isoladas das Ilhas Salomão, no Pacífico Sul, região onde nunca se usou antibióticos, encontraram um espécimen com

fator R, o qual conferia resistência à estreptomicina e tetraciclina.

c) DAVIES e ANADAN (1970) caracterizando espécimens de bactérias isoladas das fezes de 128 nativos do Norte de Borneo, local onde nunca se usou antibióticos, encontraram 6 linhagens de Escherichia coli que possuíam fator R. Dois desses fatores conferiam resistência à estreptomicina, cloranfenicol, oxitetraciclina e sulfadiazina, outros 3 à ampicilina, estreptomicina, cloranfenicol, tetraciclina e sulfadiazina e um único à ampicilina, estreptomicina, cloranfenicol, tetraciclina e sulfadiazina.

5.2. O Conceito de Força de Drogas Ilustrado com Corynebacterium michiganense e os Antibióticos Estreptomicina, Eritromicina e Penicilina

5.2.1. Comportamento da bactéria frente a cada um dos antibióticos

O modelo de resistência tanto da estreptomicina como da eritromicina é, geralmente, do tipo um só passo (AZEVEDO, 1973) e o modelo da penicilina, segundo o mesmo autor (AZEVEDO, 1973) é, geralmente, o de múltiplos passos. Os resultados obtidos neste trabalho indicam, indiretamente, que também para a Corynebacterium michiganense os antibióticos citados comportam-se da mesma maneira pois, para os 2 primeiros, mutantes resistentes foram obtidos simplesmente semeando-se células sensíveis em alta concentração do antibiótico (100 mcg/ml para a estreptomicina e 50 mcg/ml para a eritromicina) ao passo que, para o terceiro, a placa gradiente (SZYBALSKY e BRYSON, 1952) precisou ser usada.

Como pode ser observado na tabela 2, para a eritromicina, dois mutan-

tes foram resistentes a 200 mcg/ml do antibiótico enquanto que, um terceiro, não atingiu esse nível de resistência. Tal comportamento pode ser explicado pela hipótese de que existem vários genes determinando a resistência, os quais apresentam diferentes potencialidades (DEMEREK, 1948 e AZEVEDO, 1961). Assim, o gene mutado nos mutantes 1 e 3 confere alta resistência à eritromicina (cerca de 200 mcg/ml) enquanto que para o mutante 2 o gene mutado tem menor potencialidade (cerca de 100 mcg/ml).

Já no caso da penicilina (tabela 3) a explicação é outra, embora o fato seja o mesmo. Aqui, o mutante 1 foi resistente até 100 mcg/ml, o 4 até 50 mcg/ml e os mutantes 2 e 3 o foram até 200 mcg/ml. DEMEREC (1948) admite que, provavelmente, vários genes estejam envolvidos no processo que determina a resistência bacteriana à penicilina. Entretanto, ao contrário do que foi assumido para a eritromicina que, diga-se de passagem, cabe para todas as drogas que seguem o modelo de resistência de um só passo, tais genes seriam iguais em sua potencialidade. AZEVEDO (1961) supõe que, apenas para uma melhor compreensão do problema, cada gene aumenta a resistência da bactéria à droga de duas unidades. A mutação de um gene determinaria então resistência a duas unidades, um segundo gene que mutasse aumentaria para quatro essa resistência e assim por diante. Assim, a probabilidade de duas mutações ocorrerem simultaneamente seria tão pequena que poderia ser considerada nula e, devido a isso, resistência a altas doses de penicilina não poderia ser obtida num só passo. Então, voltando à tabela 3, pode-se afirmar que, provavelmente, o mutante 4 tem um número menor de genes mutados que o mutante 1 e que este tem um número menor que os mutantes 2 e 3.

Para a estreptomicina (tabela 1) pode-se especular, já que se trata do modelo de um só passo, que todos os mutantes sofreram mutação no mesmo gene ou em genes diferentes mas com iguais potencialidades.

5.2.2. Resistência cruzada

A análise das tabelas 4, 5 e 6 mostra que nenhum dos mutantes estudados apresentou resistência cruzada aos antibióticos usados. Esse resultado vem confirmar os dados existentes na literatura (SCHNITZER e GRUNBERG, 1957) que enfatizam a alta especificidade da resistência para a penicilina e estreptomicina, apesar de KLIMEK, CAVALLITO e BAILEY (1948) relatarem resistência cruzada entre esses antibióticos em Staphylococcus aureus. Já para a eritromicina tal especificidade é bem menor, sendo numerosos os casos de resistência cruzada, mas nenhum deles envolvendo a penicilina ou a estreptomicina (SCHNITZER e GRUNBERG, 1957).

Ainda pela análise dessas mesmas tabelas pode-se verificar que não ocorreu o fenômeno de sensibilidade colateral, ou seja, a resistência a um antibiótico não tornou o mutante mais sensível que a linhagem original a outro antibiótico.

5.2.3. A força de cada um dos antibióticos

A análise das tabelas 17 e 18, onde se encontram os valores do coeficiente de regressão linear com seus respectivos erros e os valores da meia-vida relativa (MV_r), dá a medida exata da força de cada um dos antibióticos estudados.

No caso da determinação pela mistura de linhagens (tabelas 7, 8 e 9) houve uma variação significativa entre o número de bactérias sensíveis e resistentes nos diversos tempos ensaiados tendo as porcentagens finais, portanto, diferido estatisticamente das porcentagens iniciais. Na tabela 17 nota-se que os 3 coeficientes de regressão têm valor negativo, isso indicando, con

forme estabelecido em 3.5.2.1., tratar-se, para os 3 antibióticos, de drogas fortes. O fato da penicilina ter-se revelado mais forte que a eritromicina e estreptomicina já era esperado em virtude de seu modelo de resistência ser do tipo múltiplos passos e, conseqüentemente, ser muito maior a probabilidade de um ou mais genes importantes para a sobrevivência da bactéria, na ausência da droga, terem sofrido mutação quando da aquisição da resistência. Já a eritromicina ter-se mostrado com uma leve tendência de ser mais forte que a estreptomicina é um fato que não poderia ter sido previsto de antemão. Levando-se em conta que ambos os antibióticos têm modelo de resistência do tipo um só passo, tal fato pode ser explicado considerando-se o gene perdido pela linhagem sensível, quando da aquisição da resistência à eritromicina, mais importante para sua sobrevivência que aquele perdido quando da aquisição de resistência à estreptomicina.

No caso da determinação pelas curvas de crescimento (tabela 18) nota-se que apenas o mutante penicilina resistente tem seu coeficiente de regressão linear realmente inferior ao da linhagem original, enquanto que para os dois outros mutantes seus coeficientes confundem-se com o da linhagem original, apesar de ser notada uma leve tendência para serem menores. Assim, por este método, a penicilina é uma droga forte e a eritromicina e a estreptomicina são drogas neutras.

Entretanto, considerando-se que as variações apresentadas nos valores da meia-vida relativa (MV_r), quando a determinação da força da droga é feita pelo método das curvas de crescimento, pela própria natureza do método, são muito grandes, e, considerando-se ainda ser o método da mistura de linhagens, além de mais preciso, o que mais se assemelha ao que ocorre em condições naturais, julgamos que este último é o método mais recomendado para se fazer estudos sobre a força de drogas.

Finalmente, deve-se ressaltar aqui, o perigo de, junto com a mutação que confere resistência a um determinado antibiótico, cuja força se quer de - terminar, ocorrer outra mutação qualquer que, não sendo possível de ser detec tada, venha a interferir com os resultados, aumentando ou diminuindo o valor da meia-vida relativa (MV_r) do mutante. Para diminuir tal perigo deve-se sem pre trabalhar com mutantes naturais.

6. CONCLUSÕES

Do presente trabalho podem ser tiradas as seguintes conclusões:

a) Toda droga pode ser classificada num dos 3 grupos seguintes, dependendo da modificação acarretada na taxa de crescimento do mutante resistente à droga em relação à taxa de crescimento da linhagem original sensível: drogas fortes quando a taxa diminui; drogas fracas quando aumenta e drogas neutras quando não há alteração. Dentro dos dois primeiros grupos as drogas são ordenadas em mais ou menos fortes e mais ou menos fracas através da meia vida relativa (MV_r) do mutante resistente à droga em relação à linhagem original sensível.

b) O método da mistura de linhagens, por ser mais preciso e por estar mais próximo das condições naturais, deve ser o preferido para estudos de força de drogas.

c) A proibição total de se usar, por um certo tempo, uma determinada droga, que já não apresenta a eficiência que tinha quando foi descoberta, fará com que ela volte a ter a mesma eficiência de antes somente para o caso de drogas fortes e, além disso, desde que a resistência contra ela não seja conferida por fatores R.

d) Para fins práticos, uma droga só será considerada forte em relação a um determinado microrganismo se, entre todos os mutantes resistentes desse microrganismo a ela, não houver nenhum que tenha sua taxa de crescimento aumentada ou inalterada.

e) O modelo de resistência da estreptomicina e eritromicina frente à Corvnebacterium michiganense é do tipo um só passo enquanto que o da penicilina é do tipo múltiplos passos. Não ocorreu, entre os mutantes resistentes

aos 3 antibióticos, o fenômeno de resistência cruzada e tampouco o da sensibilidade colateral.

f) Os 3 antibióticos, frente à Corynebacterium michiganense, classificam-se no grupo das drogas fortes, sendo a penicilina o mais forte dos três, a estreptomicina com uma tendência a ser o mais fraco e a eritromicina situando-se entre os dois.

7. RESUMO

Drogas que perdem sua eficiência rapidamente representam um enorme prejuízo para os laboratórios que as lançaram no mercado e, mais importante, representam também um sério perigo para aqueles que delas se utilizam. Os conceitos e técnicas desenvolvidos neste trabalho tratam da identificação de drogas, antes de sua comercialização, quanto ao seu possível tempo de eficiência. Para tal são definidos 3 grupos de drogas, dependendo da modificação acarretada na taxa de crescimento do mutante resistente à droga em relação à taxa de crescimento da linhagem original: drogas fortes quando a taxa diminui; drogas fracas quando aumenta e drogas neutras quando não há alteração. Dentro dos dois primeiros grupos as drogas são ordenadas em mais ou menos fortes e mais ou menos fracas através da meia-vida relativa (MV_r) do mutante resistente à droga em relação à linhagem original sensível. A MV_r é, por definição, o tempo necessário para a população de uma dada linhagem de um microrganismo cair até a metade ou dobrar em relação a uma outra linhagem considerada.

A parte experimental deste trabalho foi conduzido com a bactéria fitopatogênica Corynebacterium michiganense e os antibióticos estreptomicina, eritromicina e penicilina. As 3 drogas, em virtude dos resultados obtidos, são classificadas como fortes sendo a mais forte a penicilina ($MV_r = 58,11$ horas), seguida da eritromicina ($MV_r = 104,51$ horas) e da estreptomicina ($MV_r = 168,16$ horas).

São ainda discutidos outros aspectos do conceito de força de drogas e, entre eles, a extensão do conceito para outros grupos além dos microrganismos, suas implicações na terapia múltipla e no valor evolutivo dos fatores R bacterianos.

8. SUMMARY

Pharmaceutical laboratories may experience great losses when producing certain antimicrobial drugs which lose their efficiency rapidly and, even more important, these drugs may represent a great health hazard to people using them. The concepts and techniques developed in this thesis refer to the study of the possible efficiency time of a drug, before its marketing. Therefore 3 groups of drugs are defined, according to the modification caused in the growth rate of drug resistant mutants as compared to the growth rate of the original strain: strong drugs, when the rate diminishes; weak drugs, when it increases and neutral drugs, when the growth rate remains constant. In the two first groups the drugs are classified as more or less strong or more less weak using the relative half-life (MV_r) of the drug resistant mutant relating to the original sensitive strain. The MV_r is defined as the time lapse necessary for a population of a certain strain of a microorganism to fall to one half or to double in relation to another strain.

The experimental part of this thesis was carried out with the plant pathogenic bacterium Corynebacterium michiganense and the antibiotics were streptomycin, erythromycin and penicillin. According to the results, these 3 drugs were classified as strong, the strongest being penicillin ($MV_r = 58,11$ hours), followed by erythromycin ($MV_r = 104,51$ hours), and finally by streptomycin ($MV_r = 168,16$ hours).

Other implications of the strength concept of drugs are also discussed, e.g. the extension of this concept to other groups besides microorganisms, and its implications on multiple therapy and on the evolutionary value of the R factors in bacteria.

9. LITERATURA CITADA

- AZEVEDO, J. L., 1961. Resistência e mutação de Xanthomonas campestris (Pammel) Dowson, em relação a alguns antibióticos. 48 pp., tese Doutorado, Piracicaba, ESALQ.
- AZEVEDO, J. L., 1973. Resistência aos antibióticos em bactérias fitopatogênicas. Ciência e Cultura 25:326-329.
- AZEVEDO, J. L. e R. N. NEDER, 1963. Comparação entre o crescimento de Xanthomonas campestris (Pammel) linhagens mutantes resistentes a antibióticos e linhagens não mutantes de Pammel Dowson. Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz" 20:160-173.
- AZEVEDO, J. L. e N. R. NEDER, 1968. Manual de Genética de Bactérias. II + 81 pp. Piracicaba, Instituto de Genética, E.S.A. "Luiz de Queiroz", U.S.P.
- BELJANSKI, M., 1952. Comparaison de souches bactériennes résistantes a des antibiotiques avec des souches sensibles de même espèce. I. Cas de la streptomycine. Ann. Inst. Pasteur 83:80-101.
- BELJANSKI, M., 1953a. Comparaison de souches bactériennes résistantes a des antibiotiques avec des souches sensibles de même espèce. II. Cas de la penicilline. Ann. Inst. Pasteur 84:402-409.
- BELJANSKI, M., 1953b. Comparaison de souches bactériennes résistantes a des antibiotiques avec des souches sensibles de même espèce. III. Cas du sulfamide. Ann. Inst. Pasteur 84:756-764.
- BRYSON, V. e W. SZYBALSKY, 1955. Microbial drug resistance. Adv. Genet. 7:1-47.
- CAVALLI, L. L. e G. A. MACCACARO, 1952. Polygenic inheritance of drug resistance in the bacterium Escherichia coli. Heredity 6:311-331.
- DAVIS, C. E. e J. ANANDAN, 1970. The evolution of R factor. A study of a pre antibiotic community in Borneo. The New England Journal of Medicine 282:117-122.
- DEMEREK, M. 1948. Origin of bacterial resistance to antibiotics. J. Bact. 56:63-74.
- DEMEREK, M., 1950. Reactions of populations of unicellular organisms to extreme changes in environment. Amer. Natur. 84:5-16.

DEMEREK, M., 1951. Studies of the streptomycin - resistance system of mutations in E. coli. Genetics 36:585-597.

ENGLISH, A. R. e E. McCOY, 1951. Growth comparisons of streptomycin-sensitive and streptomycin-resistant Micrococcus pyogenes var. aureus. J. Bact. 62:19-26.

GARDNER, P., D. H. SMITH, H. BEER e R. C. MOELLERING, JR., 1969. Recovery of resistance (R) factors from a drug-free community. The Lancet II 774-776.

GEORGHIOU, G. P., 1972. The evolution of resistance to pesticides. Ann. Rev. Entomol. 17:133-168.

GURGEL, J. T. A. e J. L. AZEVEDO, 1969. Resistência de microrganismos aos antibióticos. In Antibióticos, Cap. XIII, 322-347 (LACAZ, C. S., ed. São Paulo, Servier).

KLIMEK, J. W., C. J. CAVALLITO e J. H. BAILEY, 1948. Induced resistance of Staphylococcus aureus to various antibiotics. J. Bact. 55:139-145.

LEDERBERG, J. e E. M. LEDERBERG, 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bact. 63:399-406.

MITCHISON, D. A., 1951. The segregation of streptomycin-resistant variants of Mycobacterium tuberculosis into groups with characteristic levels of resistance. J. Gen. Microbiol. 5:596-604.

MITCHISON, D. A., 1953. The occurrence of independent mutations to different types of streptomycin resistance in Bacterium coli. J. Gen. Microbiol. 8:163-185.

NEWCOMBE, H. B. e M. H. NYHOLM, 1950. The inheritance of streptomycin resistance and dependence in crosses of E. coli. Genetics 35:603-611.

NEWTON, B. A. 1965. Mechanisms of antibiotic action. Ann. Rev. Microbiol. 19:209-240.

QUADLING, C., 1960. Mutation conferring streptomycin resistance in Xanthomonas phaseoli. Can. J. Microbiol. 6:387-396.

- RANGASWAMI, G., 1957. Development of resistance to streptomycin in Xanthomonas citri and X. malvacearum. *Current Science* 26:185-186.
- SCHNITZER, R. J. e E. GRUNBERG, 1957. Drug resistance of microorganisms. XIV+ 395 pp. New York, Academic Press.
- SMITH, D. H., 1967. R factor infection of Escherichia coli lyophilized in 1946. *J. Bact.* 94:2071-2072.
- STEEL, R. G. D. e J. H. TORRIE, 1960. Principles and procedures of Statistic with special reference to the biological sciences. XVI + 481 pp. New York, McGraw-Hill Book Company, Inc.
- SZYBALSKI, W. e V. BRYSON, 1952. Genetics studies on microbial cross resistance to toxic agents. I. Cross resistance of Escherichia coli to five antibiotics. *J. Bac.* 64:489-499.
- THIRUMALACHAR, M. J., 1968. Antibiotics in the control of plant pathogens. *Adv. Appl. Microbiol.* 10:313-337.
- VAN DER PLANK, J. E., 1968. Disease resistance in plants. X + 206 pp. New York and London, Academic Press.
- VAN DER PLANK, J. E., 1969. Pathogenic races, host resistance, and an analysis of pathogenicity. *Netherland Journal of Plant Pathology* 75:45-52
- WATANABE, T., 1972. Infections drug resistance in bacteria. *Current Topics in Microbiol. and Imunol.* 56:43-98.
- WITKIN, E. M., 1947. Genetics of resistance to radiation in Escherichia coli *Genetics* 32:221-248.