

RESISTÊNCIA A DROGAS EM AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE AVES EM LONDRINA - PR

MARILDA CARLOS VIDOTTO
ERNST E. MULLER
IVENS GOMES GUIMARÃES

RESUMO

Vinte e nove amostras de *E. coli* isoladas de aves em Londrina, foram testadas para resistência a drogas antimicrobianas e distribuição dos plasmídios R. Foi determinado o nível de resistência das amostras e 93,1% mostraram-se resistentes, sendo que, 79,3% apresentaram resistência múltipla. A maioria foi resistente para tetraciclina e sulfadiazina (79,3% e 68,1% respectivamente). A resistência ao cloranfenicol, ampíicilina e canamicina, foi mais baixa. Em estudos genéticos envolvendo transferência dos marcadores de resistência por conjugação, verificou-se que a resistência múltipla é por plasmídios R conjugativos, e foram encontrados em 33,3% das amostras. Uma vez que as bactérias resistentes, transportando plasmídios R, chegam até ao homem através dos produtos animais, estes resultados indicam riscos para a saúde pública.

Palavras-chave: Resistência a drogas, plasmídios R, *Escherichia coli*, aves.

1. INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana a drogas antimicrobianas tem-se constituído, nos dias atuais, em grave problema para a Saúde Pública. Apesar das medidas sugeridas por diversos autores que visam minimizar este problema^{10, 18}, vê-se, à medida que o tempo passa, um agravamento da situação, em decorrência de vários fatores destacando-se o uso indiscriminado de antimicrobianos em rações animais e a falta de um controle mais rigoroso na utilização destas drogas na Terapêutica Veterinária. Isto, aliado ao consumo de carne e outros produtos de origem animal colonizados por germes multiresistentes, tem despertado o interesse de diversos pesquisadores.

SATO et alii⁴, no Japão, isolaram 287 amostras de *E. coli* resistentes a drogas de 150 amostras de carne de frango tomadas no comércio, constatando que amostras resistentes à sulfá e tetraciclina foram isoladas mais freqüentemente (97,8% e 87,5% respectivamente), seguida pela estreptomicina (68,6%) e kanamicina (41,8%). As freqüências de isolamento de amostras resistentes ao cloranfenicol e ampíicilina foram mais baixas, sendo 22,0% e 22,3% respectivamente. A freqüência de plasmídios R encontrada nestas amostras foi de 73%. POLÁKOVA et alii³, na Checoslováquia, verificaram a ocorrência de *E. coli* multiresistentes em produtos cárneos, constatando em algumas, plasmídios R capazes de transferir seus determinantes de resistência para amostras receptoras. KUMAR et alii⁵, na Índia, estudaram a resistência a drogas em 133

amostras de *E. coli* isoladas de galinha e pintos, revelando uma alta porcentagem de plasmídios R: 68,7% em pintos de 1 semana, 40% em pintos de 1 dia e 39,2% em galinhas.

ADESTOSOYE¹, na Nigéria, encontrou alta freqüência de resistência a drogas transferível entre amostras de *E. coli* isoladas de aves e de outros animais doentes e saudáveis. VERMA¹⁶, na Índia, verificou a ocorrência de amostras de *E. coli* resistentes às drogas antimicrobianas isoladas de colisepticemia e de outras fontes de aves. SMITH et alii¹⁵, na Inglaterra, verificaram que 9 anos após o uso de tetraciclina como aditivos nas rações, os frangos e suínos eram ainda reservatórios de *E. coli* resistente a este antibiótico. A incidência de resistência a tetraciclina foi mais alta em frangos (68%) do que em suínos (20%). Ainda, na Inglaterra, LINTON⁹, encontrou sorotipos O de *E. coli* sensíveis e resistentes a drogas, no intestino e na carcassa de frangos, concluindo que é impossível evitar a contaminação da carcassa de aves abatidas e embaladas sob condições comerciais. Nos Estados Unidos, LEVY et alii⁶ demonstraram a transferência dos plasmídios R, marcados por mutação, de frango para frango e de frango para o homem. MORENO¹¹, investigou a presença de resistência a drogas transferível em amostras de *E. coli* isoladas de mamíferos e aves em São Paulo.

MORENO et alii¹², constataram a presença de plasmídios R em enterobactérias isoladas de mamíferos e aves de parques zoológicos de São Paulo.

Dentre os vários mecanismos genéticos através dos quais as bactérias podem transferir resistência a drogas, destaca-

se o da conjugação. Considerando a importância dos plasmídios R na transferência de resistência a drogas para enterobactérias humanas, foi realizado o presente trabalho com o objetivo de verificar os padrões de resistência a vários antimicrobianos utilizados na veterinária e a frequência dos plasmídios R de amostras de *E. coli* isoladas de aves em Londrina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras bacterianas

As amostras de *E. coli* utilizadas no presente trabalho foram isoladas de necrópsia de frangos, no Laboratório de Microbiologia da Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Londrina. As 29 amostras foram identificadas através de técnicas padronizadas por EDWARDS & EWING³.

Foram utilizadas como receptoras, nos experimentos de conjugação, as seguintes amostras derivadas de *E. coli* K₁₂; *E. coli* 711 F⁻, resistente ao ácido nalidixico por mutação cromossômica (Na1^R), auxotrófica para vários aminoácidos (phe, his, pro, trp) e não fermentadora da lactose (lac⁻); *E. coli* J53 F⁻, Na1^R, pro⁻, met⁻ e *E. coli* C600 F⁻, Na1^R, thr⁻, leu⁻, th⁻, lac⁻.

2.2. Drogas antimicrobianas

As seguintes drogas (INLAB) foram utilizadas: ácido nalidixico (An), ampicilina (Ap), colimicina (C1), cefalotina (Ce), cloranfenicol (Cm), estreptomina (Sm), gentamicina (Gm), kanamicina (Km), sulfadiazina (Su), oxitetraciclina (Tc), tobramicina (To), polimixina B (Pb) e nitrofurantoína (Fu).

2.3. Antibiograma

O antibiograma foi realizado pelo método de BAUER & KIRBY² sendo adicionado 0,2 ml de cultura bacteriana em crescimento exponencial a 2 ml de Tryptic Soy-Broth, contendo 0,75% de agar, mantido à temperatura de 48°C. A mistura foi vertida imediatamente nas placas de Mueller Hinton e após 10 minutos foram colocados os discos de papel de filtro impregnados com as drogas antimicrobianas (DIFCO). As placas foram incubadas a 37°C por 17 a 24 horas e a leitura foi realizada tendo por base a presença ou não do halo de inibição de crescimento em torno do disco.

2.4. Determinação dos níveis de resistência

O método foi o da diluição seriada em meio sólido, que consistiu em adicionar soluções recentes das drogas antimicrobianas no meio sólido (Tryptic Soy Agar para os antibióticos e ágar mínimo para sulfadiazina) nas seguintes concentrações: 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 350, 500 e 1.000 µg/ml. As amostras bacterianas, na fase exponencial, foram inoculadas com alça de platino-paládio de 1,5 mm de diâmetro por esgotamento. Em cada placa foram semeadas, 6 amostras e como controle, uma amostra de *E. coli* K₁₂ sensível às drogas estudadas. Para controle de viabilidade da amostra, foi utilizada uma placa do meio de cultura sem drogas. Todas placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Considerou-se como nível de resistência, a concentração mais alta da droga que inibiu acima de 50% do crescimento da amostra, quando comparada ao crescimento na placa controle de viabilidade.

2.5. Transferência da resistência a drogas por conjugação

A conjugação¹⁷ foi realizada misturando-se 1,2 ml de cultura doadora na fase exponencial e 0,4 ml da receptora na fase estacionária, num Erlenmeyer de 125 ml.

Após a incubação, na maioria das vezes de 2 horas, a 37°C, foram realizadas diluições na proporção de 1/10, em salina estéril e 0,1 ml desta diluição foram então plaqueadas em ágar mínimo contendo os aminoácidos e as drogas antimicrobianas requeridas para a seleção dos transconjugantes. As placas foram incubadas por 24 a 48 horas a 37°C.

3. RESULTADOS

Todas as amostras foram sensíveis às seguintes drogas: ácido nalidixico, polimixina B, colimicina, gentamicina e nitrofuratoína. Quanto aos outros antimicrobianos utilizados, houve número variável de amostras resistentes. Na Tabela I estão discriminados os altos níveis de resistência das amostras. Foi encontrada uma maior percentagem de resistência para tetraciclina (79,3%), sulfa (68,1%) e estreptomina (58,6%). A frequência de isolamento de amostras resistentes ao cloranfenicol (24,1%), kanamicina

TABELA II – Espectro de sensibilidade e resistência das amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves em Londrina-PR.

	Modelo de Resistência						Frequência de isolamento (%)	
	Su	Tc	Sm	Ap	Cm	Km		
Sêxtupla	Su	Tc	Sm	Ap	Cm	Km	1	(3,5)
Quíntupla	Su	Tc	Sm	Ap	Cm		2	(6,9)
Quádrupla	Su	Tc	Sm	Ap			1	(3,5)
	Tc	Sm	Cm	Km			2	(6,9)
	Su	Tc	Sm	Cm			1	(3,5)
Tripla	Su	Tc	Sm				5	(17,2)
	Su	Tc	To				1	(3,5)
Dupla	Su	Tc					5	(17,2)
	Tc	Sm					2	(6,9)
	Su	Sm					1	(3,5)
	Tc	Km					1	(3,5)
	Tc	Cm					1	(3,5)
Simples	Su						2	(8,9)
	Tc						1	(3,5)
	Sm						1	(3,5)
Amostras sensíveis							2	(6,9)

TABELA III – Transferência de resistência a drogas antimicrobianas de amostras de *E. coli* isoladas de Aves em Londrina - Paraná

Modelo de Resistência						No. de amostras	Transferência					No.	%
Su	Tc	Sm	Ap	Cm	Km		Modelo Transferido						
Su	Tc	Sm	Ap	Cm	Km	1	Su	Tc	Sm	Ap		1	3,7
Su	Tc	Sm	Ap	Cm		2	Su	Tc	Sm	Cm	Ap	1	3,7
							Sm	Cm	Ap			1	3,7
Tc	Sm	Cm	Km			2	Tc	Sm	Cm	Km		1	3,7
Su	Tc	Sm	Ap			1	não transfere					0	0
Su	Tc	Sm	Cm			1	não transfere					0	0
Su	Tc	Sm				5	não transfere					0	0
Su	Tc	To				1	não transfere					0	0
Su	Tc					5	Su	Tc				1	3,7
Tc	Sm					2	Sm					2	7,4
Su	Sm					1	não transfere					0	0
Tc	Km					1	Tc					1	3,7
Tc	Cm					1	Tc	Cm				1	3,7
Su						2	não transfere					0	0
Tc						1	não transfere					0	0
Sm						1	não transfere					0	0
Total						27						9	33,3

TABELA IV – Principais dados de resistência antimicrobiana de amostras de *E. coli* isoladas de aves e freqüências de plasmídios R conjugativos.

Autor(es)	Ano	País	No. de amostras	% Plasmídios R Conj.	D r o g a s					
					Tc	Su	Sm	Km	Cm	Ap
MORENO	1972	Brasil (SP)	75	50,7	–	–	–	–	–	–
VERMA	1978	Índia	112	–	80,3	92,8	39,3	0,0	18,7	–
ADETOSOYE	1979	Nigéria	134	39,5	83,5	87,3	70,1	–	5,2	6,7
KUMAR	1980	Índia	133	43,5	62,4	58,6	2,2	0,0	0,0	0,8
SATO	1980	Japão	287	73,0	87,8	87,5	68,6	41,8	22,6	22,3

4. DISCUSSÃO

A veiculação de bactérias resistentes a drogas antimicrobianas, através de produtos animais até o homem, está relatada na literatura^{4, 6, 8, 18}. Em relação ao nosso meio, os estudos existentes, são insuficientes, não permitindo uma avaliação criteriosa do problema. Conforme pode ser verificado na Tabela II, observa-se que 93,1% das amostras isoladas são portadoras de resistência a drogas sendo que 79,3% apresentam resistência múltipla. Este dado se torna mais preocupante quando constatado que 33,3% das amostras resistentes transferem a resistência para outras bactérias sensíveis por conjugação, principalmente a resistência para tetraciclina.

A tetraciclina, sulfa e estreptomicina foram os antimicrobianos que apresentaram maior percentagem de amostras resistentes (79,3%, 68,1% e 58,6% respectivamente) resultados que se assemelham àqueles encontrados por outros autores^{1, 5, 11, 14, 16}, conforme mostra a Tabela IV.

O aumento da resistência de *E. coli* para Tc e Su pode ser atribuído à incorporação destas drogas nas rações das aves, para promover crescimento ou para fins profiláticos.

Os plasmídios R carregando os marcadores para Su, Tc, cm e Sm foram os mais detectados neste trabalho, con-

forme mostra a Tabela III. Os modelos de resistência transferidos foram semelhantes aos encontrados por MORENO¹¹ e SATO¹⁴. Nenhuma das amostras apresentando resistência simples para Su, Sm e Tc transferiu resistência, mesmo em 24 horas, ao contrário dos resultados obtidos por SATO¹⁵ quando notou que os plasmídeos R com simples resistência foram os mais freqüentemente demonstrados.

Segundo LINTO⁷ a *E. coli* resistente a drogas alcança o homem por caminhos da cadeia alimentar, e as principais fontes de infecção entre outras são aves, portanto, a alta freqüência de contaminação da carne de frango com *E. coli* transportando plasmídios R¹⁴, demonstra a necessidade de uma maior precaução em abatedouros animais.

Finalmente, os resultados obtidos neste trabalho indicam riscos para a saúde pública, uma vez que a alta freqüência de resistência a drogas encontrada em *E. coli* isoladas de aves pode ser transferida para outras bactérias da flora normal no trato intestinal do homem e também para bactérias patogênicas, dificultando assim a terapêutica das doenças causadas por estes microrganismos devido a múltipla resistência a drogas.

ABSTRACT

Twenty nine strains of *Escherichia coli* isolated from chicken in Londrina, were tested for drugs resistance and distribution of R plasmids. It was determined the resistance level of strains and 93,1% were resistant, 79,3% were multiple antibiotic resistance. Most was resistance to tetracycline and sulphadiazine (79,3% and 68,1% respectively). The resistance to chloramphenicol, ampicillin and kanamycin was lower. In genetic studies of transference of resistant determinant by conjugation, it was revealed 33,3% of conjugative R plasmids. These results would present a serious public health hazard whereas the antibiotic resistant *E. coli*, carrying R plasmids, reach man by animals feed.

Key-words: Drug resistance, R plasmids, *Escherichia coli*, chicken, fowls.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ADETOSOYE, A.I. Infectious drug resistance in *E. coli* isolated from livestock. *Zblt. Bakt. Mikrobiol. Hyg. I. Abt. Org.* 247A(1): 25-34, 1980.
02. BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45: 493-496, 1966.
03. EDWARDS, P.R. & EWING W.H. *Identification of Enterobacteriaceae*. 3 ed. Burgess Publication Company.
04. FALKOW, S. *Infections multiple drug resistance*. London, Pion Ltd, 1975. p. 231-251.
05. KUMAR, A.; MISRA, D.S.; SINGH, I.P. Drug resistant and R-factor-bearing *Escherichia coli* in poultry. *Ind. J. An. Sci.*, 51(9): 872-76, 1981.
06. LEVY, S.B.; FITZGERALD, G.B.; MACONE, A.B. Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. *Nature*, 260: 40-42, 1976.
07. LINTON, A.H. Antibiotic resistance; the present situation reviewed. *Vet. Tec.*, 100: 354-360, 1977.
08. LINTON, A.H.; HOWE, K.; BENNETT, P.M.; RICHMOND, M.H. and WHITASIDE, E.J. The colonization of the human gut by antibiotic resistant *E. coli* from chickens. *J. Appl. Bacteriol.*, 43: 465-69, 1977.
09. LINTON, A.H.; HOWE, K., HARTLEY, C.L. CLEMENTS, H.M., RICHMOND, M.H.; OSBORNE, A.D. Antibiotic resistant and sensitive *E. coli* O-serotypes in the gut and on the carcass of commercially slaughtered broiler chickens and the potential public health implications. *J. Appl. Bacteriol.*, 42: 365-378, 1977.
10. LINTON, A.H. HOWE, K.; RICHMOND, M.H.; CLEMENTS, H.M. Attempts to displace the indigenous antibiotic resistant gut flora of chicken by feeding sensitive strains of *Escherichia coli* prior to slaughter. *J. Appl. Bacteriol.*, 45(2): 239-47, 1978.
11. MORENO, G. Resistência infecciosa a drogas em amostras de *E. coli* isoladas de animais. *Rev. Adolfo Lutz*, 32: 47-55, 1972.
12. MORENO, G.; LOPES; C.A.M.; ANDRADE, J.C.R.; VIEIRA, M.F. Resistência a drogas em amostras de enterobactérias isoladas de animais confinados em parques zoológicos. *Arq. Inst. Biol. São Paulo*, 40: 11-16, 1973.
13. POLÁKOVÁ, O.; JANOUSKOVÁ, J.; HUSTAVOVÁ, H.; STANKOVSKY, I.; KROMÉRY, V. Occurrence of *E. coli* with strains multiresistance and transferable resistance to antibiotics in food-stuffs. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunolog.*, 16: 467-472, 1972.
14. SATO, A.; TAGAWA, K.; IKE, Y.; MITSUHASHI, S. Drug resistance of *Escherichia coli* strains isolated from chickens. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 33(3): 185-8, 1980.
15. SMITH, H.W.; LOVELL, M.A. *Scherichia coli* resistant to tetracyclines and to other antibiotics in the faeces of U.K. chickens and pigs in 1980. *J. Hyg.*, 87(3): 477-83, 1981.
16. VERMA, N.D. A note on drug resistance of *E. coli* isolated from chicken source from Manipur state. *Ind. J. An. Sci.*, 49(7): 598-90, 1979.
17. WATANABE, T. & FUKASAWA, T. Episome mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. I. Transfer of resistance factors by conjugation. *J. Bact.*, 81: 669-78, 1961.
18. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Surveillance for the prevention and control of health hazards due to antibiotic resistant enterobacteria*. 1978. (Technical Report Series, 624).

LUTALYSE

Prostaglandina Natural

Resultado de 20 anos de pioneirismo em pesquisa

Upjohn