

## RESISTÊNCIA A DROGAS EM ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE ANIMAIS SILVESTRES (1)

DRUG RESISTANCE AMONG ENTERIC BACTERIA STRAINS ISOLATED FROM  
MAMMALIANS ENCOUNTERED IN WOODEN REGIONS OF BOTUCATU, BRAZIL

GILBERTI MORENO<sup>(2)</sup>  
DARCI S. AOKI WATANABE<sup>(2)</sup>  
NORMA GERUSA S. SILVA<sup>(2)</sup>  
CARLOS ALBERTO DE MAGALHAES LOPES<sup>(2)</sup>  
EUNICE SEABRA<sup>(2)</sup>  
CLAUDINE GRANADO<sup>(2)</sup>

### SUMMARY

MORENO, G.; WATANABE, D.S.A.; SILVA, N.G.S.; LOPES, C.A.M.; SEABRA, E. & GRANADO, C. — Drug resistance among enteric bacteria strains isolated from mammals encountered in wooden regions of Botucatu, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 57-61, 1972.

82 strains of enteric bacteria isolated from several species of Brazilian mammals encountered in most wooden regions of Botucatu, were screened for drug resistance. The selection of the strains was carried out by its levels resistance to sulphadiazine, to Kanamycine sulphate, to chloramphenicol, to cephalotin, to hetacylin, to tetracycline, and to streptomycin sulphate. At various concentrations employed, it was possible to check distinctives strains populations, one drug resistant and other drug sensitive.

Relatively to streptomycin sulphate it was founded only one sensitive strain population.

Finally, it was observed that 29 *E. coli* strains, 27 *Proteus* sp. strains, and 2 *Salmonella* sp. strains appeared to be only sulphadiazine resistant.

### INTRODUÇÃO

Mesmo considerando o grande número de trabalhos existentes no campo da resistência a drogas em bactérias, poucas são as comunicações mais diretamente ligadas a medicina veterinária, particularmente aquelas relacionadas ao estudo de amostras de enterobactérias obtidas de animais domésticos<sup>5</sup>. Tratando-se de animais silvestres, não encontramos na literatura nacional nenhuma contribuição científica relativa ao problema da resistência à droga, sendo a finalidade do presente trabalho a apresentação de resultados preliminares, relativos ao encontro de amostras resistentes de entero-

bactérias isoladas de animais silvestres, no Município de Botucatu.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### 1. Origem das amostras

Foram estudadas 82 amostras de enterobactérias isoladas de animais silvestres da região de Botucatu. Segundo a procedência, essas amostras, foram assim distribuídas: 29 gambás, 62 amostras; 16 ratos, 17 amostras; um preá, uma amostra; e um ouriço, duas amostras.

(1) Realizado no Departamento de Patologia da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, S.P.

(2) Do Departamento de Patologia da F.C.M.B.B.

## 2. Isolamento e caracterização bioquímica

As coproculturas tiveram como seqüência a semeadura do material em tetracionato adicionado de verde brilhante na concentração final de 1:100.000. Decorridas 24 horas de estufa a 37°C, semearam-se placas de Petri contendo o meio de ágar verde brilhante, o de Mac Conkey e o de ágar sulfito de bismuto, e selecionaram-se, em tríplice açúcar com ferro, colônias fermentadoras e não fermentadoras da lactose.

A caracterização bioquímica dos microrganismos foi feita segundo normas estabelecidas por EDWARDS & EWING<sup>1</sup> e pesquisaram-se as seguintes provas: indol, V.M., V.P., urease, citrato de Simmons, KCN, motilidade, redução de nitrato a nitrito, descarboxilação da lisina, arginina e ornitina, desaminação da fenil alanina e gás em glicose.

## 3. Identificação sorológica

A partir de cultura de ágar simples determinou-se a leitura antigênica dos microrganismos isolados, empregando-se, para tanto, soro preparado<sup>(1)</sup>, quando se tratava de cultura suspeita de salmonella. Para as amostras de *Escherichia coli*, a subdivisão de enteropatógenicas e não enteropatógenicas teve por base os resultados das provas de aglutinação com os soros: 026:B6, 055:B5, 086:B7, 0127:B8, 0111:B4 e 0119:B14.

## 4. Determinação da sensibilidade a antibióticos e à sulfadiazina

Empregou-se o método da diluição em placa. As soluções de cloridrato de tetraciclina (T), hetacilina potássica (H), sulfato de kanamicina (K), sulfato de estreptomicina (E), cloranfenicol (Cl), cefalotina sódica (C) e sulfadiazina (S), foram preparadas no dia do uso e continham 10 mg da base de cada droga por ml. Utilizou-se Agar Lab Lemco<sup>(2)</sup> como meio de cultura a fim de testar a atividade dos antibióticos e o Agar Lab Lemco<sup>(2)</sup> sem cloreto de sódio acrescido de sangue de cavalo a

5%, quando do emprego da sulfadiazina<sup>4</sup>. A concentração final das drogas, nas placas, variou de 1 µg/ml a 1 000 µg/ml.

A semeaduras das amostras em estudo foi conteúdo de uma alça de platina de 2 mm de diâmetro retirado de cultura de 24 horas a 37°C em Brain-Hearth Infusion<sup>(2)</sup> e diluída a 1/1 000 no mesmo meio. Em cada placa foram estudadas 15 amostras e empregou-se, como controle da atividade das drogas, uma linhagem de *Escherichia coli*, cujos níveis de resistência foram previamente determinados. Usou-se ainda placa testemunha da viabilidade das culturas, contendo somente o meio de cultura. Os resultados foram anotados após 24 horas de incubação a 37°C. Considerou-se como concentração inibitória aquela que impedia o desenvolvimento do microrganismo. A concentração imediatamente inferior, que permitia o crescimento das culturas, indicava o nível de resistência.

## RESULTADOS

Através de provas bioquímicas e sorológicas foi possível caracterizar-se 82 amostras de enterobactérias assim distribuídas: 40 de *Escherichia coli*; 27 de *Proteus* sp.; 13 de *Aerobacter* e 2 de *Salmonella* sp.

Nos quadros I, II e III estão representados os níveis de resistência de *E. coli*, *Proteus* sp. e *Aerobacter* sp. à sulfadiazina, ao cloranfenicol, ao cloridrato de tetraciclina, ao sulfato de estreptomicina, ao sulfato de kanamicina, à hetacilina potássica e à cefalotina sódica, no que diz respeito às concentrações das drogas empregadas. A análise dos quadros demonstra que, com exceção das amostras de *Aerobacter* sp., *Escherichia coli* e *Proteus* sp. apresentaram resistência exclusiva à sulfadiazina.

Relativamente aos modelos de resistência encontrados, verificou-se a presença de amostras com multiresistência, predominando aquelas com marcadores para S-C, S-C-H, C-H, Cl-H, quando se tratava de *Aerobacter* sp.; C-T, C-T-H, C-Cl-T-H, C-T-K-H, para *Proteus*, e S-C, S-C-T, em *Escherichia*

(1) Difco Laboratories

(2) Oxoid

QUADRO I

*Número de amostras resistentes de E. coli, isoladas de animais silvestres, segundo a droga e concentrações empregadas, Botucatu, 1972*

Drogas µg/ml	Sulfadiazina		Cefalotina		Cloranfenicol		Tetraciclina		Kanamicina		Estreptomicina		Hetacilina	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1000	23	57,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
500	4	10,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
200	4	10,0	1	2,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
100	1	2,5	1	2,5	0	0,0	1	2,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0
50	1	2,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
20	1	2,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
10	4	10,0	1	2,5	0	0,0	3	7,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0
5	1	2,5	37	92,5	0	0,0	28	70,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
1	1	2,5	0	0,0	38	95,0	8	20,0	0	0,0	1	2,5	37	92,5
< 1	0	0,0	0	0,0	2	5,0	0	0,0	40	100,0	39	97,5	3	7,5
Total	40	100,0	40	100,0	40	100,0	40	100,0	40	100,0	40	100,0	40	100,0

QUADRO II

*Número de amostras resistentes de Proteus sp., isoladas de animais silvestres, segundo a droga e concentrações empregadas, Botucatu, 1972*

Drogas µg/ml	Sulfadiazina		Cefalotina		Cloranfenicol		Tetraciclina		Kanamicina		Estreptomicina		Hetacilina	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1000	27	100,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
500	0	0,0	1	3,7	0	0,0	3	11,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0
200	0	0,0	4	14,8	0	0,0	3	11,1	0	0,0	0	0,0	3	11,1
100	0	0,0	8	29,6	0	0,0	9	33,3	0	0,0	0	0,0	6	22,2
50	0	0,0	3	11,1	6	22,2	3	11,1	0	0,0	0	0,0	1	3,7
20	0	0,0	3	11,1	0	0,0	6	22,2	1	3,7	1	3,7	8	29,6
10	0	0,0	0	0,0	5	18,5	0	0,0	0	0,0	1	3,7	0	0,0
5	0	0,0	3	11,1	10	37,0	2	7,4	2	7,4	4	14,8	4	14,8
1	0	0,0	2	7,4	6	22,2	1	3,7	13	48,1	19	70,4	2	7,4
< 1	0	0,0	3	11,1	0	0,0	0	0,0	11	40,7	2	7,4	3	11,1
Total	27	100,0	27	100,0	27	100,0	27	100,0	27	100,0	27	100,0	27	100,0

QUADRO III

*Número de amostras resistentes de Aerobacter sp., isoladas de animais silvestres, segundo a droga e concentrações empregadas, Botucatu, 1972*

Drogas µg/ml	Sulfadiazina		Cefalotina		Cloranfenicol		Tetraciclina		Kanamicina		Estreptomicina		Hetacilina	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1000	10	76,9	4	30,8	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
500	2	15,4	1	7,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	7,7
200	0	0,0	2	15,4	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	7,7
100	0	0,0	0	0,0	1	7,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	7,7
50	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	7,7	0	0,0	0	0,0	2	15,4
20	1	7,7	1	7,7	4	30,8	5	38,5	1	7,7	0	0,0	4	30,8
10	0	0,0	2	15,4	1	7,7	5	38,5	1	7,7	2	15,4	2	15,4
5	0	0,0	1	7,7	5	38,5	2	15,4	1	7,7	1	7,7	0	0,0
1	0	0,0	2	15,4	2	15,4	0	0,0	3	23,1	7	53,8	2	15,4
< 1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	7	53,8	3	23,1	0	0,0
Total	13	100,0	13	100,0	13	100,0	13	100,0	13	100,0	13	100,0	13	100,0

*coli*. Foram isoladas duas amostras de *Salmonella* sp., com resistência exclusiva a 1 000 µg/ml de sulfadiazina.

No quadro IV, reuniram-se duas populações de enterobactérias, uma constituída por amostras sensíveis e outra por amostras resistentes, relativamente aos antibacterianos empregados. Nota-se que 76 amostras apresentaram resistência à sulfadiazina, 28 à cefalotina, 25 à tetraciclina, 29 à hetaciclina, sete ao cloranfenicol e uma à kanamicina. Com relação à estreptomomicina, somente a população sensível foi encontrada.

#### QUADRO IV

*Populações resistente e sensível, segundo a droga, em 82 amostras de enterobactérias isoladas de animais silvestres, Botucatu, 1972*

Drogas	Resistente		Sensível	
	Nº	%	Nº	%
Sulfadiazina	76	92,68	6	7,32
Cefalotina	28	34,14	54	65,86
Cloranfenicol	7	8,54	75	91,46
Tetraciclina	25	30,49	57	69,51
Kanamicina	1	1,22	81	98,78
Estreptomomicina	0	0,00	82	100,00
Hetaciclina	29	35,37	53	64,63

Não foram assinaladas amostras de *Escherichia coli* enteropatogênicas relativamente aos soros utilizados.

#### DISCUSSÃO

Como referimos na introdução deste trabalho, é pobre a literatura veterinária no que tange às pesquisas sobre resistência a drogas em bactérias<sup>5</sup>. Este fato vem dificultando o estudo comparativo de nossos resultados e impossibilitando, até certo ponto, chegarmos a novas conclusões no terreno da resistência aos antibacterianos.

Pela análise dos resultados estabelecidos no presente trabalho, demonstra-se que os animais silvestres, à semelhança do homem e dos animais domésticos, albergam duas populações bacterianas bem individualizadas em relação ao fenômeno da resistência a drogas — uma população resistente e outra sensível. Uma das

populações, a resistente, não é difícil de se caracterizar, uma vez que o encontro de microrganismos resistentes é consequência de mutações espontâneas e ao acaso. Difícil é explicar a seleção desses microrganismos em animais silvestres afastados do uso de drogas antibacterianas, seletoras de mutantes resistentes.

Quanto aos modelos de resistência dos microrganismos isolados, notamos diferenças qualitativas e quantitativas em relação àquelas apresentadas para enterobactérias isoladas do homem<sup>2,3,6</sup> e para as isoladas dos animais domésticos<sup>5</sup>.

Surpreende-nos, nos animais silvestres, o elevado número de amostras bacterianas com resistência à cefalotina e hetaciclina, visto que esta resistência é numericamente baixa naquelas amostras isoladas do homem<sup>2,3,6</sup> e de animais<sup>5</sup>.

Fato digno de registro foi o grande número de amostras com resistência exclusiva à sulfadiazina (29 de *Escherichia coli*, 27 de *Proteus* sp., e duas de *Salmonella* sp.).

Particularmente, em relação à baixa resistência à estreptomomicina e à kanamicina, nossos resultados concordam com os apresentados por MORENO<sup>5</sup> para suínos, bovinos, ovinos, aves e eqüinos.

#### RESUMO

MORENO, G.; WATANABE, D.S.A.; SILVA, N.G.S.; LOPES, C.A.M.; SEABRA, E. & GRANADO, C. — Resistência a drogas em enterobactérias isoladas de animais silvestres. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 57-61, 1972.

Os autores investigaram quantitativamente a resistência a drogas em 82 amostras de enterobactérias, isoladas de animais silvestres, no Município de Botucatu. A seleção das linhagens bacterianas ficou subordinada a uma determinação de seus níveis de resistência à sulfadiazina, ao sulfato de kanamicina, ao cloranfenicol, à cefalotina sódica, à hetaciclina potássica, ao cloridrato de tetraciclina e ao sulfato de estreptomomicina. Levando-se em consideração os níveis de resistência apresentados, foi possível caracterizar uma população resis-

tente e outra sensível, com relação às seis primeiras drogas. Relativamente ao sulfato de estreptomina, somente uma população sensível foi encontrada.

Resistência exclusiva à sulfadiazina foi observada em 29 amostras de *Escherichia coli* 27 amostras de *Proteus* sp. e duas amostras de *Salmonella* sp.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EDWARDS, P. R. & EWING, H. W. — *Identification of enterobacteriaceae*. Atlanta, Ga., Burgess Publ., 1967.
2. FERNANDES, M. R. F. & TRABULSI, L. R. — Infectious resistance in pathogenic enteric organisms isolated in São Paulo, Brasil. (Preliminary report). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 10: 52-53, 1968.
3. FERNANDES, M. R. F. & TRABULSI, L. R. — *Resistência infecciosa a drogas em culturas de Shigella*. São Paulo, 1968. [Tese — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].
4. HARPER, G. J. & CAWSTON, W. C. — The "in vitro" determination of the sulphona-mide sensitivity of bacteria. *J. Path. Bact.*, 57: 59-66, 1945.
5. MORENO, G. — *Resistência infecciosa a drogas em amostras de Escherichia coli isoladas de animais*. São Paulo, 1970. [Tese — Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo].
6. ZULIANI, M.E. & TRABULSI, L. R. — Sensibilidade "in vitro" à sulfadiazina e a 5 antibióticos de 166 amostras de *Shigella*, isoladas em São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 10: 70-77, 1968.

Recebido para publicação em 26 de maio de 1972.

