

RESISTÊNCIA A DROGAS EM AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI*  
ISOLADAS DE ANIMAIS (1)

DRUG RESISTANCE IN *ESCHERICHIA COLI*  
STRAINS ISOLATED FROM ANIMALS

GILBERTI MORENO (2)

SUMMARY

MORENO, G. — Drug resistance in *Escherichia coli* strains isolated from animals. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 63-68, 1972.

It were screened for drug resistance 375 *E. coli* strains, isolated from animals. In relation to the origin, they were obtained from fowls, calves, horses, lambs and swine, corresponding a total of 75 strains to each of these related groups.

The bacterial lineage selection was dependant on a preliminary determination of its resistance levels to the sulphadiazine, to streptomycin, to chloramphenicol, to cephalotin, to hetacylin, to tetracycline, and to the kanamycin.

The concentration of each of these drugs varied from 1 to 1 000 mcg/ml, and it were considered as resistant, those strains that grew in 20 mcg/ml.

In these conditions, it were observed that 333 strains were resistant to sulphadiazine, 284 to tetracycline, 300 to chloramphenicol, 74 to streptomycin, 19 to cephalotyn, seven to hetacylin and two to the kanamycin. From all of these 375 above mentioned *E. coli* strains, were detected 20 resistance models, with the predominance of those integrated by three or four determinants for drug resistance. The S—C1—T resistance model showed higher incidence with a total of 132 strains coming in second place, 45 strains, characterized by the S—C1—T—E resistance determinants.

INTRODUÇÃO

A administração de um antibiótico não deve constituir um simples desempenho mecânico em virtude de ser um dos recursos mais poderosos com que conta o homem no combate aos agentes de infecção. Com o aperfeiçoamento dos métodos microbiológicos e após o advento dos antibióticos de largo espectro, novos horizontes foram abertos no campo da antibioticoterapia tornando possível, indubitavelmente, ampliar com maior segurança e êxito suas indicações. Todavia o problema da

antibioticoterapia em veterinária, a par do que ocorre em medicina humana, oferece ainda hoje sérios obstáculos a preocupar continuamente os que se responsabilizam pela sua prática. Daí compreenderem-se, perfeitamente, as razões pelo seu interesse e o volume considerável de investigações realizadas neste campo.

O presente trabalho analisa, "in vitro" a resistência a drogas em *Escherichia coli* isoladas de animais domésticos, constituindo-se em colaboração até o momento ainda não investigada entre nós.

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

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

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1 — Amostras

Foram estudadas 375 amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves, bovinos, suínos, eqüinos e ovinos, pertencendo a cada grupo de animais 75 amostras. A manutenção das amostras foi feita em duplicatas de tubos contendo Lab-Lemco Agar (\*), fechados com rolhas de cortiça parafinadas e conservados em geladeira a 4°C.

### 2 — Determinação do nível de resistência

#### 2.1 Amostras indicadoras

Foram utilizadas, como indicadoras, as seguintes linhagens:

2.1.1 *Escherichia coli* K 12, 712 R, não fermentadora da lactose, resistente a 1 000 µg/ml de estreptomicina e sensível a 1 µg/ml de cloranfenicol, sulfadiazina, tetraciclina, kanamicina, cefalotina e hetacilina

2.1.2 *Escherichia coli* 0111:B4, resistente a 1 000 µg/ml de kanamicina;

2.1.3 *Escherichia coli* 0111:B4, sensível a 5 µg/ml de sulfadiazina.

### 3 — Determinação do nível de resistência

#### 3.1 Preparo das soluções de antibióticos e da sulfadiazina

As soluções dos antibióticos e da sulfadiazina foram preparadas no dia do uso e continham 10 mg da base de cada droga por ml. Dissolveu-se a sulfadiazina em água destilada acrescida de hidróxido de sódio 1 normal; o sulfato de estreptomicina, o sulfato de kanamicina e o ácido nalidíxico, em água destilada; o cloranfenicol, em tampão fosfato pH 6 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,8g; água destilada 100 ml) e álcool metílico; o cloridrato de tetraciclina, em tampão fosfato pH 4,5 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,36g; água destilada 100 ml) e álcool metílico; a hetacilina, em tampão fosfato pH 8 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16,73g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,523g;

água destilada 100 ml) e álcool metílico; e cefalotina sódica, em água destilada e álcool metílico.

#### 3.2 Preparo das placas

As placas de Petri, contendo as substâncias necessárias à determinação do nível de resistência, foram preparadas no dia do uso. Utilizou-se o Lab-Lemco Agar (\*) como meio de cultura, quando do emprego dos antibióticos. Relativamente à sulfadiazina, lançou-se mão do Lab-Lemco Agar (\*) sem cloreto de sódio, acrescido de sangue de cavalo a 5%. Após a colocação nas placas de Petri, de quantidades variáveis das soluções de antibióticos e da sulfadiazina, necessárias para se atingirem as concentrações desejadas, adicionaram-se às placas o meio de cultura previamente resfriado a 45°C.

No quadro I sumarizam-se as quantidades dos componentes empregados na obtenção da concentração desejada de cada droga.

QUADRO I

Concentração final da droga,  
segundo a diluição empregada

Solução da droga (10 mg/ml)	Diluição	Meio de cultura (ml)	Concentração final da droga (µg/ml)
2	—	18,0	1000
1	—	19,0	500
0,4	—	19,6	200
2	1/10	18,0	100
1	1/10	19,0	50
0,4	1/10	19,6	20
2	1/100	18,0	10
1	1/100	19,0	5
0,2	1/100	19,8	1

#### 3.3 Técnica de determinação do nível de resistência

As culturas de *Escherichia coli* a serem usadas em cada ensaio foram preparadas de véspera, semeando-se tubos contendo Brain-Heart Infusion (\*), com os microrganismos provenientes das culturas de manutenção. A inoculação das amostras em estudo foi o conteúdo de alça de platina, de 2 mm de diâmetro,

(\*) Oxoid

retirado de cultura de 20 horas a 37°C em Brain-Heart Infusion (\*) e diluída a 1/1 000 no mesmo meio.

Em cada placa semearam-se 15 amostras de *Escherichia coli* e empregou-se, como controle da atividade das drogas, uma linhagem indicadora, cujos níveis de resistência foram previamente determinados. Assim, a linhagem descrita em 2.1.1, como controle de tetraciclina, cefalotina, hetacilina, cloranfenicol e estreptomicina; a descrita em 2.1.2, como controle de Kanamicina; e a descrita em 2.1.3, como controle de sulfadiazina. Usou-se ainda uma placa testemunha da viabilidade das culturas, contendo somente o meio de cultivo. Os resultados foram registrados após 20 horas de incubação a 37°C e considerou-se como concentração inibitória aquela que impedia o

desenvolvimento do microrganismo. A concentração imediatamente inferior, que permitia o crescimento das culturas em estudo, indicava o nível de resistência. Todas as amostras estudadas foram conservadas em geladeira a 4°C e em duplicatas de tubos contendo Lab-Lemco Agar (\*) fechados com rolinhas de cortiça parafinadas.

## RESULTADOS

### Frequência de amostras resistentes

No quadro II encontram-se os níveis de resistência das diferentes amostras de *Escherichia coli* à sulfadiazina, ao cloridrato de tetraciclina, ao cloranfenicol, ao sulfato de estreptomicina, à cefalotina sódica, à hetaci-

QUADRO II

Resistência às concentrações das drogas empregadas para 375 amostras de *Escherichia coli* isoladas das espécies animais, Botucatu, 1972

Drogas μ g/ml	Sulfadiazina		Cloranfenicol		Tetraciclina		Estreptomicina		Cefalotina		Hetacilina		Kanamicina	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<1	4	1,1	2	0,5	1	0,3	215	57,5	9	2,4	34	9,1	344	91,7
1	7	1,8	41	10,9	5	1,3	47	12,5	184	49,1	239	63,7	24	6,4
5	18	4,8	27	7,2	32	8,5	17	4,5	89	23,7	91	24,3	3	0,8
10	13	3,5	5	1,3	53	14,0	22	5,9	74	19,7	4	1,1	2	0,5
20	21	5,6	1	0,3	69	18,4	36	9,6	14	3,8	2	0,5	0	0,0
50	16	4,2	22	5,9	32	8,5	25	6,7	3	0,8	2	0,5	0	0,0
100	15	4,0	83	22,1	71	18,9	11	2,9	0	0,0	0	0,0	1	0,3
200	18	4,8	120	32,0	110	29,3	2	0,5	0	0,0	0	0,0	1	0,3
500	25	6,7	58	15,5	2	0,5	0	0,0	0	0,0	1	0,3	0	0,0
1000	238	63,5	16	4,2	0	0,0	0	0,0	2	0,5	2	0,5	0	0,0
Total	375	100,0	375	100,0	375	100,0	375	100,0	375	100,0	375	100,0	375	100,0

QUADRO III

Número de amostras resistentes de *Escherichia coli* a cada uma das drogas, entre 375 linhagens estudadas, Botucatu, 1972

Drogas	Numero de amostras	%
Sulfadiazina	333	88,8
Cloranfenicol	300	80,0
Tetraciclina	284	75,7
Estreptomicina	74	19,7
Cefalotina	19	5,1
Hetacilina	7	1,9
Kanamicina	2	0,5

lina potássica e ao sulfato de kanamicina, no que diz respeito às concentrações empregadas. Nota-se que os níveis para a sulfadiazina, o cloranfenicol, a cefalotina e a hetacilina variaram entre 1 000 μg/ml e menos do que 1 μg/ml; entre 500 μg/ml e menos do que 1 μg/ml para a tetraciclina; entre 200 μg/ml e menos do que 1 μg/ml para estreptomicina e a kanamicina.

Considerando-se como resistentes as amostras que cresceram em 20 μg/ml ou mais das drogas empregadas verificou-se que 333 amostras apresentaram resistência à sulfadiazina,

(\*) Oxoid

284 à tetraciclina, 300 ao cloranfenicol, 74 à estreptomina, 19 à cefalotina, 7 à hetacilina e 2 à kanamicina (quadro III).

No quadro IV reuniu-se o número de amostras resistentes de *Escherichia coli* segundo a droga utilizada e a espécie animal. Observa-se

que a resistência variou, conforme a espécie animal, nos casos em que empregamos o cloranfenicol ou a estreptomina. Para as demais drogas não notamos diferenças estatisticamente significantes ao nível de rejeição adotado, isto é  $\alpha = 0,05$ . O teste utilizado foi o do qui-quadrado, com quatro graus de liberdade.

#### QUADRO IV

Número de amostras resistentes de *Escherichia coli*, segundo a droga considerada e a espécie animal, Botucatu, 1972

Drogas	Ave		Bovino		Eqüino		Suíno		Ovino		X <sup>2</sup>
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Sulfadiazina	64	85,3	58	77,3	72	96,0	73	97,3	66	88,0	2,27
Cloranfenicol	65	86,7	74	98,7	33	44,0	74	98,7	54	72,0	19,70
Tetraciclina	55	73,3	43	57,3	68	90,7	52	69,3	66	88,0	7,51
Estreptomina	11	14,7	2	2,7	27	36,0	27	36,0	7	9,3	36,27
Cefalotina	4	5,3	6	8,0	2	2,7	5	6,7	2	2,7	3,37
Hetacilina	0	0,0	4	5,3	0	0,0	2	2,7	1	1,3	8,00
Kanamicina	0	0,0	0	0,0	2	2,7	0	0,0	0	0,0	8,00

#### Modelos de Resistência

No quadro V organizaram-se os diferentes modelos de resistência encontrados nas 375 amostras de *Escherichia coli* obtidas de animais. A análise do quadro oferece dados suficientes para salientar a predominância de amostras com três e quatro marcadores de resistência. O modelo S-C1-T predominou com 132 amostras, vindo logo a seguir 45 amostras caracterizadas como S-C1-T-E, respectivamente 35,2% e 12,0%. Apenas três linhagens apresentaram pentarresistência, duas S-C1-T-C-E e uma S-C1-T-C-H. Houve uma hexarresistente S-C1-T-E-C-H, isolada de suíno. O modelo com dois marcadores que prevaleceu foi o S-T com 52 amostras (13,9%), seguido do S-C1, com 50 amostras (13,3%). O modelo S-C1-T-K somente foi encontrado em duas amostras isoladas de eqüinos. Resistência exclusiva à sulfadiazina foi encontrada em três amostras; à tetraciclina, também em três, e ao cloranfenicol, em 20.

Foi assinalado um total de 20 modelos de resistência para as 375 linhagens estudadas. Relativamente a cada espécie animal foram obtidos: 11 diferentes modelos para bovinos e ovinos, 10 para suínos e nove para aves e

eqüinos, respectivamente. O modelo de resistência predominante para aves, bovinos, ovinos e suínos, fez-se representar pelo S-C1-T. Para os eqüinos predominou o S-T. Seguiram-se-lhes o modelo S-C1, para aves e bovinos; o S-C1-T e T-E, para eqüinos; S-T, para ovinos, e S-C1-T-E, para suínos.

#### DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstram o encontro de 20 diferentes modelos de resistência nas 375 amostras de *Escherichia coli* isoladas das cinco espécies animais empregadas no presente trabalho. Realmente, a apreciação do quadro V oferece essas informações e torna evidente a alta porcentagem de amostras com resistência múltipla, predominando o modelo S-C1-T, com 132 amostras, vindo a seguir o S-C1-T-E, com 45 amostras. No quadro V notamos a ocorrência de modelos tetra, penta e hexarresistentes, nos quais é notória a constância dos marcadores para S-C1-T. Estes marcadores obtiveram a prevalência quase absoluta nos modelos com multirresistência, sendo tal fato, provavelmente, justificado pela eleição destas drogas em veterinária.

Não estranhamos o altíssimo número de

QUADRO V

*Escherichia coli* isoladas das espécies animais, de acordo com os modelos de resistência em 375 amostras, Botucatu, 1972

Modelos de Resistência	Aves	Bovino	Equino	Ovino	Suíno	Total de amostras
	Nº	Nº	Nº	Nº	Nº	
S-CI-T-E-C-H	—	—	—	—	1	1
S-CI-T-C-E	2	—	—	—	—	2
S-CI-T-C-H	—	—	—	—	1	1
S-CI-T-E	8	2	13	4	18	45
S-CI-T-C	2	2	1	2	2	9
S-CI-T-K	—	—	2	—	—	2
S-CI-T-H	—	1	—	1	—	2
S-CI-H-C	—	1	—	—	—	1
S-CI-T	27	28	14	34	29	132
S-CI-E	1	—	—	1	8	10
S-CI-C	—	3	—	—	1	4
S-T-E	—	—	14	2	—	16
S-CI-H	—	2	—	—	—	2
S-CI	14	19	—	5	12	50
S-T	10	—	24	17	1	52
CI-T	6	9	—	4	—	19
S-C	—	—	1	—	—	1
S	—	—	3	—	—	3
CI-	5	7	3	3	2	20
T	—	1	—	2	—	3

S =Sulfadiazina; CI =Cloranfenicol; T =Tetraciclina; E =Estreptomicina;  
C =Cefalotina; H =Hetacilina; K =Kanamicina.

amostras sensíveis à kanamicina, por considerarmos que a droga não encontrou, ainda, facilidade de prescrição na prática veterinária, e porque, infeliz ou felizmente, cabe ao criador analisar, do ponto de vista econômico, as vantagens ou desvantagens de sua aplicação. Todavia, acreditamos que o seu uso incorreto e desabusado acarretará, forçosamente, a seleção de linhagens bacterianas resistentes ao antibiótico. Este fato foi devidamente comprovado, em nosso meio, por TRABULSI & ZULIANI<sup>3</sup>, ao trabalharem com amostras de *Escherichia coli* 0111:B4:H2, de origem humana. Verificaram os autores um aumento significativo de amostras resistentes que variou, num período compreendido entre 1963 e 1968, de 29,26% a 88,63%, de 21,95% a 95,45%, e de 48,78% a 97,72%, no que diz respeito ao cloranfenicol, à kanamicina e a tetraciclina, respectivamente.

Particularmente, em relação à resistência à estreptomicina, nossos resultados divergiram percentualmente dos apresentados por SMITH<sup>2</sup> para suínos, bovinos, ovinos e aves. Enquanto este autor obtém valores equiva-

lentes a 40,0%, 52,0%, 8,0% e 2,9%, os nossos distribuíram-se em 36,0%, 2,7%, 9,3% e 14,7%, respectivamente. Embora a espécie equina não tenha sido incluída no trabalho acima citado, gostaríamos de deixar aqui registrada a percentagem de 36,0% por nós encontrada. TRABULSI & ZULIANI<sup>3</sup> registraram valores de até 100% de resistência à estreptomicina para amostras de *Escherichia coli* enteropatógena isoladas do homem.

Fato digno de registro foi a baixa frequência de amostras com resistência a apenas uma droga, comportando-se a maioria das linhagens com blocos contendo marcadores de resistência para três e quatro drogas, respectivamente S-CI-T e S-CI-T-E. Este fenômeno sugere que a resistência infecciosa à droga é quase sempre múltipla, isto é, quando uma bactéria se torna resistente a uma droga, ocorre geralmente resistência a outras. Entre nós esse fenômeno foi inicialmente estudado por FERNANDES<sup>1</sup>, ZULIANI & TRABULSI<sup>4</sup>, TRABULSI & ZULIANI<sup>3</sup>, ao trabalharem com linhagens de shigela e *Escherichia coli* isoladas do homem.

### RESUMO

MORENO, G. — Resistência a drogas em amostras de *Escherichia coli* isoladas de animais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 63-68, 1972.

Determinou-se a sensibilidade de 375 amostras de *Escherichia coli* isoladas de animais. De acordo com a origem, estas amostras foram rotuladas como aviárias, bovinas, eqüinas, ovinas e suínas, pertencendo a cada grupo de animais 75 amostras.

A seleção das linhagens bacterianas ficou subordinada a uma determinação preliminar de seus níveis de resistência à sulfadiazina, ao sulfato de estreptomina, ao cloranfenicol, à cefalotina sódica, à hetacilina potássica, ao cloridrato de tetraciclina, ao sulfato de kanamicina e ao sulfato de estreptomina, variando-se as concentrações das drogas de 1 a 1 000 µg/ml. Consideram-se como resistentes as amostras que proliferaram em 20 µg/ml ou mais das drogas empregadas. Nessas condições, verificou-se que 333 amostras apresentaram resistência à sulfadiazina, 284 à tetraciclina, 300 ao cloranfenicol, 74 à estreptomina, 19 à cefalotina, 7 à hetacilina e 2 à kanamicina.

Foi assinalado um total de 20 modelos de resistência nas 375 amostras estudadas, prevalecendo aquelas com três e quatro marcadores de resistência. O modelo S-C1-T predominou com 132 amostras, vindo logo a seguir 45 amostras rotuladas como S-C1-T-E.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FERNANDES, M.R.F. — *Resistência infecciosa a drogas em culturas de Shigella*. São Paulo, 1968. [Tese — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].
2. SMITH, D.H. — Veterinary implications of transfer activity. In: WOLSTENHOLME, G.E.W. & O'CONNOR, M., ed. — *Bacterial episodes and plasmids*. London, Churchill, 1969. p.213 — 226. [Ciba Foundation Symposium].
3. TRABULSI, L.R. & ZULIANI, M.E. — Estudos sobre a *E. coli* 0111:B4. III. Sensibilidade *in vitro* à sulfadiazina e a seis antibióticos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 11: 323-334, 1969.
4. ZULIANI, M.E. & TRABULSI, L.R. — Sensibilidade "in vitro" à sulfadiazina e a cinco 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.

### Endereço

Gilberti Moreno  
Faculdade Ciências Médicas  
e Biológicas de Botucatu  
Caixa Postal, 102  
18600 — Botucatu, S.P.