

RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE FEZES DE LEITÕES COM DIARRÉIA

M.R. Baccaro, A.M. Moreno, A. Corrêa, A.J.P. Ferreira, F.F. Calderaro

¹Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-000, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: baccaro@usp.br

RESUMO

Escherichia coli é um importante agente causador de enterite em leitões, sendo a infecção de difícil controle devido a elevada capacidade deste agente em desenvolver e disseminar mecanismos de resistência aos antimicrobianos utilizados para o tratamento da doença. Estabeleceu-se o perfil de resistência de 600 amostras de *E.coli* isoladas de fezes de 100 leitões lactentes com diarreia e procedeu-se a determinação da concentração inibitória mínima para os seguintes antimicrobianos: ampicilina, ceftiofur, estreptomicina, kanamicina, oxitetraciclina, cloranfenicol, flumequina, penicilina, sulfadiazina-trimetoprima, gentamicina, neomicina, enrofloxacina, norfloxacina. Os resultados obtidos mostraram a ocorrência freqüente de resistência múltipla aos principais antimicrobianos utilizados na terapia da diarreia em leitões lactentes.

PALAVRAS-CHAVE: Enterite, suínos, antimicrobianos, *Escherichia coli*, resistência, diarreia.

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *ESCHERICHIA COLI* STRAINS ISOLATED IN FECAL SAMPLES FROM PIGLETS WITH DIARRHEA. *Escherichia coli* is an important causative agent of piglets diarrhea, that control in pig production is complicated by high ability of this agent in develop and spread resistance mechanisms for commonly used antibiotics. This study has as goal determine the resistance pattern of 600 *E. coli* strains isolated from fecal samples of 100 piglets with diarrhea, against the antibiotics often used in swine production. The determination of minimal inhibitory concentration was done under international standards to the following antibiotics: ampicilin, ceftiofur, streptomycin, kanamicin, oxitetracycline, cloranfenicol, flumequin, penicilin, sulfadiazin-trimetoprim, gentamicin, neomicin, enrofloxacin and norfloxacin. The results observed shown that multiple resistance is frequent against the antibiotics often used in piglets diarrhea therapy.

KEY WORDS: Piglets diarrhea, pigs, antimicrobial, *Escherichia coli*, resistance, diarrhea.

INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado e constante de antibióticos em medicina humana e veterinária tem determinado o aumento de resistência bacteriana, interferindo no tratamento efetivo das infecções por estes agentes.

A resistência bacteriana pode ser transferida por mecanismos diversos, podendo estabelecer-se entre microrganismos de uma mesma população ou de diferentes populações, como da microbiota animal para humana e vice-versa (NIJSTEN *et al.* 1993). O desenvolvimento de resistência bacteriana, além de determinar uma menor eficácia da droga, também representa um potencial de risco à saúde pública, uma vez que o contato dos homens com os animais pode aumentar a ocorrência de resistência da microbiota desta espécie (BONGERS *et al.* 1995).

Na espécie suína, *E. coli* é um dos agentes que apresenta alta capacidade para desenvolver resistência, destacando-se dentre as diversas amostras as *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC), como causa da diarreia neonatal. De modo geral, a infecção apresenta evolução aguda e sintomas caracterizados por diarreia severa, desidratação e algumas vezes morte (SOJKA, 1971).

No Brasil, estima-se que a média de leitões nascidos vivos e que morrem antes do desmame esteja em torno de 15 a 20 %, atribuindo-se a diarreia uma das principais causas de morbidade e mortalidade de leitões nesta fase da vida. (MORES, 1993, ZEMAN, 1995, WITTUM *et al.* 1995).

A patogenia da doença, os métodos de controle e os fatores predisponentes são aspectos bem conhecidos, entretanto o fenômeno de resistência aos antimicrobianos dificulta a escolha do antibiótico adequado ao tratamento (HALL, 1989).

Com base, nos conhecimentos relatados, objetivou-se verificar o perfil de resistência da *E. coli* em amostras isoladas de fezes de leitões lactentes e com diarreia, através da determinação da concentração mínima inibitória dos principais antimicrobianos utilizados em suinocultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram estudadas 600 amostras de *E. coli* isoladas de fezes de 100 leitões lactentes, machos e fêmeas, com diarreia e idade variando entre 5 e 30 dias, provenientes de 12 granjas da região sudoeste do Estado de São Paulo (CALDERARO *et al.*, 2001). A padronização da prova foi realizada com a amostra *E. coli* ATCC 25922.

Concentração inibitória mínima (CIM)

As amostras de *E. coli* foram inoculadas em caldo Muller Hinton (Difco) e incubadas à 37 °C por 3 horas. Após, este período a cultura foi diluída em solução salina até uma concentração de aproximadamente 10⁶ UFC/mL de caldo, utilizando-se como referência a escala de turbidez 0,5 da escala de McFarland (0,5 mL de 0,48M BaCl₂ para 99,5 mL de 0,36 N H₂SO₄). Aliquotas de 50 µl desta cultura foram depositadas em poços de microplacas de fundo redondo (NUNC). Um volume igual do antimicrobiano (50 µL) foi adicionado no primeiro poço de cada linha e diluído no fator 1:2 até a concentração mínima desejada. As microplacas foram incubadas à 37 °C por 16 a 20 horas (JONES *et al.*, 1985). Foi observado o crescimento

bacteriano nas diferentes concentrações da droga e considerou-se a concentração inibitória mínima a maior diluição de antimicrobiano que inibiu o crescimento bacteriano. *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle a cada lote de amostras examinadas. O Quadro 1 apresenta as concentrações dos antimicrobianos testados.

A amostra foi considerada sensível quando a CIM obtida mostrou-se pelo menos 4 vezes menor que a média das concentrações plasmáticas máximas da droga, moderadamente sensível quando a média das concentrações plasmáticas máximas excederam a CIM pelo menos 4 vezes e resistente, quando a CIM revelou-se superior aos valores das médias das concentrações plasmáticas máximas e/ou concentrações teciduais máximas para droga (JONES *et al.*, 1985). Os critérios de classificação das amostras como sensível, moderadamente sensível ou resistente são apresentados no Quadro 2.

RESULTADOS

Todas as amostras estudadas apresentaram resistência a pelo menos 5 dos 13 antimicrobianos testados e para todas as drogas observou-se a ocorrência de resistência em menor ou maior frequência. A Tabela 1 apresenta a variação da concentração inibitória observada para cada droga e as concentrações capazes de inibir o crescimento de 50% e 90% das amostras.

A frequência de amostras resistentes e o comportamento destas em relação aos antimicrobianos testados encontram-se representadas na Tabela 2.

Quadro 1- Concentrações de antimicrobianos utilizadas na determinação da concentração inibitória mínima.

Antimicrobiano	Conc. (µg/mL)	Antimicrobiano	Conc. (µg/mL)
Ampicilina	0,25-32	Cloranfenicol	0,25-16
Ceftiofur	0,25-8	Enrofloxacina	0,008-16
Estreptomicina	0,25-16	Norfloxacina	0,008-16
Gentamicina	0,5-4	Flumequina	0,008-16
Kanamicina	0,5-4	Penicilina	0,03-8
Neomicina	4-32	Sulfadiazina-trimetoprima	0,5/9,5-4/76
Oxitetraciclina	1-32		

Quadro 2- Critério de análise para os resultados obtidos através da CIM.

Antimicrobiano	S ¹	MS	² R ³	Antimicrobiano	S ¹	MS ²	R ³
Ampicilina	≤2	4	≥8	Cloranfenicol	<8	8-16	>16
Ceftiofur	≤4	—	>4	Enrofloxacina	≤1	2-4	>4
Estreptomicina	≤1	2-4	≥8	Norfloxacina	≤0,5	1	>1
Gentamicina	<16	—	≥16	Flumequina	≤0,5	1>	1
Kanamicina	≤4	—	>4	Penicilina	≤1	2-4	>4
Neomicina	≤16	32	>32	Sulfadiazina-trimetoprima	<1	1	≥2
Oxitetraciclina	≤4	8	>8				

Tabela 1- Variação da CIM e CIM capaz de inibir 50% e 90% das amostras analisadas, SP, 2001.

Antimicrobiano	Varição da CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM 50 ¹	CIM90 ²
Ampicilina	1-32	>32	>32
Canamicin	1-4	>4	>4
Ceftiofur	0,25-8	1	2
Cloranfenicol	4-16	>16	>16
Enrofloxacina	0,008-16	0,25	16
Estreptomina	4-16	>16	>16
Flumequina	0,008-16	8	>16
Gentamicina	4	>4	>4
Neomicina	8-32	>32	>32
Norfloxacina	0,008-16	>16	>16
Oxitetraciclina	1-32	>32	>32
Penicilina	1-8	>8	>8
Sulfadiazina-trimetoprima	0,5/4-9,5/76	>9,5/76	>9,5/76

1-CIM necessária para inibir o crescimento de 50% das amostras testadas. 2- CIM necessária para inibir o crescimento de 90% das amostras testadas.

DISCUSSÃO

As amostras de *E. coli* analisadas revelaram elevado índice de resistência aos antimicrobianos testados. A amostra padrão ATCC 25922 apresentou CIM dentro das variações descritas na literatura (JONES *et al.*, 1985).

Os índices de resistência observados para ampicilina (87%), kanamicina (89%), cloranfenicol (97%), estreptomina (96%), gentamicina (86%), norfloxacina (92%), oxitetraciclina (97%), penicilina (80%), sulfadiazina/trimetoprima (87%), diferiram dos obtidos por BRITO & TAGLIARI (2000), em estudo realizado no Estado do Paraná. Estes autores verificaram que 96% das 224 amostras processadas foram sensíveis à gentamicina, 90,2% à neomicina, 85,7% à kanamicina, 67,4% à sulfametoxazole-trimetoprima, 56,7% ao cloranfenicol e 26,3% à tetraciclina. As diferenças observadas podem ser atribuídas as variações regionais ou ao método utilizado para a execução do estudo. Em relação às variações regionais, tem-se conhecimento que a ocorrência de resistência está intimamente relacionada a pressão de seleção do

agente às drogas utilizadas com maior frequência no tratamento da afecção e no que se refere, a metodologia aplicada por BRITO & TAGLIARI (2000), verificou-se que os autores apoiaram-se em outra técnica: a de difusão do antimicrobiano impregnado em discos de papel filtro (JONES *et al.*, 1985).

As amostras de *E. coli* testadas revelaram baixos níveis de resistência ao ceftiofur (0,16%) e a enrofloxacina (19%). A sensibilidade do agente a estes antimicrobianos pode estar associada ao custo elevado e ao fato de serem moléculas de uso, relativamente recente.

Os níveis elevados de resistência podem estar relacionados ao fenômeno de multiresistência, através do qual, antibióticos como a ampicilina podem induzir a seleção de amostras de *E. coli* resistentes às tetraciclina, sulfas, kanamicina e ampicilina na ausência da exposição do agente ao antimicrobiano (BONGERS *et al.*, 1995). A resistência múltipla, também pode ser observada na administração de sulfonamidas, neomicina, cloranfenicol, tetraciclina e sais de cobre quando utilizados para o tratamento de diarreia. Na maioria dos casos, o fenômeno é mediado por plasmídeos, razão pela qual deve-se evitar o uso de antimicrobianos utilizados como facilitadores do crescimento, no tratamento e na profilaxia de doenças (BONGERS *et al.*, 1995).

O estudo conduzido por BOROWSKI *et al.* (1994), em amostras de *E. coli* isoladas de fezes de leitões lactentes no Estado do Rio Grande do Sul, revelou alta frequência de multiresistência (60,8%). Este resultado, mostrou-se semelhante ao obtido neste trabalho, onde a exposição das amostras isoladas às drogas frequentemente utilizadas para o tratamento de diarreias, apresentou 85% de resistência múltipla.

No que diz respeito a concentração mínima inibitória, observou-se resultados superiores aos relatados por SALMON *et al.* (1995) que ao determinar a variação da CIM e da CIM 50 e 90 em amostras de *E. coli* isoladas de fezes de suínos provenientes dos Estados Unidos, Canadá e Dinamarca, verificaram uma menor CIM 50 para ceftiofur (0,5 $\mu\text{g/mL}$) e para enrofloxacina (0,03 a 0,06 $\mu\text{g/mL}$), assim como uma menor CIM 90, obtendo as respectivas concentrações: 0,5 a 1 $\mu\text{g/mL}$ e 0,06 a 0,03 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 2- Frequência de resistência das amostras de *E. coli* em relação aos antimicrobianos testados, SP, 2001.

Antimicrobiano	Frequência de resistência (%)	Antimicrobiano	Frequência de resistência (%)
Ampicilina	86,8	Gentamicina	86,3
Kanamicina	88,6	Neomicina	57,3
Ceftiofur	0,16	Norfloxacina	92,0
Cloranfenicol	96,8	Oxitetraciclina	96,7
Enrofloxacina	19,0	Penicilina	80,0
Estreptomina	96,4	Sulfadiazina-trimetoprima	87,4
Flumequina	59,3		

Os antimicrobianos são amplamente utilizados em Medicina Veterinária e nestes últimos anos, além de serem empregados no tratamento de doenças, também foram adotados para o controle das mesmas. O uso indiscriminado destas drogas vem colaborando para a ocorrência de resistência das bactérias. Entretanto, a profilaxia, o manejo e a higiene são fundamentos básicos para a prevenção de doenças, podendo contribuir efetivamente, para o aumento da produtividade e a redução da resistência bacteriana.

AGRADECIMENTOS

Trabalho realizado com apoio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BONGERS, J.H., FRANSSSEN, F.; ELBERS, A.R.W., TIELEN, M.J.M. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from the faecal flora of veterinarians with different professional specialities. *Vet. Quart.*, v.17, p.146-149, 1995.
- BOROWSKI, S.M., BARCELLOS, D.E.S.N., STEPAN, A.L., OLIVEIRA, S.J. Susceptibilidade de amostras de *Escherichia coli* isoladas de suínos apresentando diarreia no período pós-desmame. *Arq. Fac. Vet.*, v. 22, p.24-30, 1994.
- BRITO, B.G. & TAGLIARI, K.C. Sensibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de leitões lactentes com diarreia. *Rev. Bras. Cienc. Vet.*, v.7, n.2, p.117-119, 2000.
- CALDERARO, F.F.; BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; FERREIRA, A.J.P.; JEREZ, A.J.; PENA, H.J.F. Frequência de agentes causadores de enterites em leitões lactentes provenientes de sistemas de produção de suínos do Estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.68, n.1, p.29-34, 2001.
- JONES, R. N.; BARRY, A. L.; GAVAN, T.L.; WASHINGTON II, J.A. Susceptibility tests: microdilution and macrodilution broth procedures. In: LENNETTE, E. H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W.J.Jr., SHADOMY, H.J. (Eds). *Manual of clinical microbiology*. 4.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology. Washington, D.C. p.927-977, 1985.
- MOON, H.W.; SCHNEIDER, R.A.; MOSELEY, S.L. Comparative prevalence of four enterotoxin genes among *Escherichia coli* isolated from swine. *Am. J. Vet. Res.*, v.47, p.210-212, 1986.
- MORES, N. Fatores que limitam a produção de leitões na maternidade. *Suinocultura Dinâmica*, v.2, n.9, p.1-5, 1993.
- NIJSTEN, R.; LONDON, N.; BOGAARD, A.; STOBBERINGH, V.D. Antibiotic resistance of enterobacteriaceae isolated from the faecal flora of fattening pigs. *Vet. Quart.*, v.15, n.4, p.152-157, 1993.
- QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. (Eds.) *Clinical veterinary microbiology*, London: Wolfe Ed., 1994. 648p.
- SALMON, S.A.; WATTS, J.L.; CASE, C.A.; HOFFMAN, L.J.; WEGENER, H.C.; YANCEY, R.J.Jr. Comparison of MICs of Ceftiofur and other antimicrobial agents against bacterial pathogens of swine from the United States, Canada and Denmark. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, n.9, p.2435-2444, 1995.
- SOJKA, W.J. Enteric diseases in newborn piglets, calves and lambs due to *Escherichia coli* infection. *Vet. Bull.*, v. 41, p.509-522, 1971.
- WRAY, C. & WOODWARD, M.J. *Escherichia coli* infections on farm animals. In: SUSSMAN, M. (Ed.) *Escherichia coli: Mechanisms of virulence*. Cambridge: Cambridge University, 1997. p.49-84.
- WILSON, R.A. & FRANCIS, D.H. Fimbriae and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with colibacillosis. *Am. J. Vet. Res.*, v.47, p. 213-221, 1986.
- WITTUM, T.E.; DEWEY, C.E.; HURD, H.S.; DARGATZ, D.A.; HILL, G.W. Herd and litter level factors associated with the incidence of diarrhoea morbidity and mortality in piglets 1-3 days of age. *Swine Hlth. Prod.*, v.3, n.3, p.99-104, 1995.
- ZEMAN, D.H. Pitfalls of laboratory diagnosis of piglet enteritis. *Swine Hlth. Prod.*, v.3, n.4, p.79-80, 1995.

Recebido em 26/12/01

Aceito em 14/2/02