

COMPARAÇÃO DA RESISTÊNCIA ANTIBACTERIANA ENTRE CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE GATOS DIARRÉICOS OU SAUDÁVEIS, EM ITUVERAVA, SÃO PAULO, BRASIL

COMPARISON OF ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *Escherichia coli* STRAINS ISOLATED FROM DIARRHEIC OR HEALTHY CATS IN ITUVERAVA, SP, BRAZIL.

M. C. W. CALIMAN¹, J. M. MARIN^{2*}

RESUMO

O número de animais de estimação tem aumentado substancialmente na sociedade moderna e uma atenção cada vez maior tem sido devotada ao bem estar destes animais. O objetivo deste estudo foi investigar a ocorrência de resistência antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* da microbiota intestinal de gatos. De Janeiro a dezembro de 2009, 190 cepas de *Escherichia coli* isoladas de gatos diarréicos (n=19) e gatos saudáveis (n=21) foram examinadas para a detecção de resistência a 20 agentes antimicrobianos. As resistências predominantemente observadas foram para a cefalotina (42,1%), tetraciclina (20,0%) e ampicilina (15,8%) entre as cepas isoladas de gatos diarréicos e para tetraciclina (30,5%), cotrimoxazole (17,9%) e ampicilina (20,0%) entre as cepas isoladas de gatos saudáveis. A resistência a três ou mais agente antimicrobianos foi encontrada em 8,4% e 17,8% das cepas isoladas de gatos diarréicos e saudáveis respectivamente. É óbvio que as linhagens de *E. coli* provenientes dos gatos podem atuar como um reservatório de genes de resistência. Assim, para permitir o uso correto dos antimicrobianos é fundamental uma constante atualização do nível de resistência apresentado pelos antimicrobianos utilizados em medicina veterinária.

PALAVRAS-CHAVE: Pet. Animal de companhia. Agente antimicrobiano. Resistência a múltiplas drogas.

SUMMARY

Pet animal numbers have substantially increased in modern society and attention is increasingly devoted to pet welfare. The aim of this study was to investigate the occurrence of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains of cat's intestinal microbiota. From January to December of 2009, 190 *E. coli* isolates from diarrheic (n=19) and healthy (n=21) cats from Ituverava, were examined for resistance to 20 antimicrobial agents. The predominantly observed resistance was to cephalothin (42,1%), tetracycline (20,0%), and ampicillin (15,8%) among the isolates from diarrheic cats and to tetracycline (30,5%), cotrimoxazole (17,9%), and ampicillin (20,0%) among the isolates from healthy cats. Multidrug-resistance to three or more antimicrobial agents was found among 8.4% and 17,8% of the isolates from diarrheic and healthy cats, respectively. It is obvious that the *E. coli* strains from cats may act as a reservoir of resistance genes. To support the development of antimicrobial usage policies, regular updates on the status of resistance to antimicrobials used in veterinary medicine are needed.

KEY-WORDS: Pet. Companion animals. Antimicrobial agents. Multidrug resistance.

¹ Programa de Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP-Campus Jaboticabal, SP, Brasil,

² Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia, FORP, USP-Campus Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Corresponding Author: José Moacir Marin- Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia, FORP, Av. do Café s/n, Campus USP, Ribeirão Preto, Brasil, 14040-904. Email: jmmarin@forp.usp.br

INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos tem havido uma preocupação crescente com o aumento da prevalência da resistência antimicrobiana tanto na medicina humana quanto na veterinária. É geralmente aceito que a principal causa do problema seja o aumento do uso de agentes antimicrobianos, que tem levado ao surgimento e à disseminação de bactérias resistentes e/ou de seus genes de resistência. Muitos estudos mostram que antibióticos e quimioterápicos exercem uma pressão seletiva tanto em bactérias patogênicas como nas comensais da microbiota (NORMAND et al., 2000; MOYAERT et al., 2006). O surgimento da resistência em bactérias patogênicas pode reduzir a eficácia de terapias antimicrobianas anteriormente eficazes. Bactérias comensais resistentes constituem reservatórios de determinantes de resistência para bactérias potencialmente patogênicas (van den BOGAARD & STOBBERINGH, 2000).

Escherichia coli é comumente encontrada no trato intestinal de homens e animais (SORUM & SUNDE, 2001), e pode também ser causadora de doenças infecciosas em ambos (ROSAS et al., 2006). Por esta razão *E. coli* fecal é considerada um bom indicador para a pressão de seleção pelo uso de antibióticos e para problemas de resistência esperados em patógenos (van den BOGAARD & STOBBERINGH, 2000).

Gatos e cachorros representam uma fonte potencial de disseminação de resistência a antibióticos devido ao uso intensivo de agentes antimicrobianos nestes animais e ao seu contato muito próximo com os humanos (GUARDABASSI et al., 2004). Vários estudos sugerem a possibilidade de troca de organismos resistentes e/ou de seus genes entre animais e seres humanos (SIMJEE et al., 2002; GUARDABASSI et al., 2004). As classes de antibióticos frequentemente utilizadas na medicina veterinária de pequenos animais incluem penicilinas, cefalosporinas, macrolídeos, lincosaminas, tetraciclina, sulfonamidas potencializadas, aminoglicosídeos e fluorquinolonas, as mesmas drogas normalmente utilizadas em seres humanos. As causas mais frequentes de tratamentos antimicrobianos em gatos são pele e feridas contaminadas, otite externa, infecções respiratórias e infecções do trato urinário. Infecções gastrointestinais também são comuns, mas a terapia antimicrobiana não é indicada na maioria destas síndromes (GUARDABASSI et al., 2004). As infecções mais comuns em gatos são aquelas envolvendo a pele, particularmente ocasionadas por mordidas ou arranhões de outros gatos ou cães (LOVE et al., 2000).

Vários autores têm estudado a resistência antimicrobiana em isolados de *E. coli* provenientes de animais de estimação e estes estudos têm sido conduzidos tanto na Europa (NORMAND et al., 2000; GUARDABASSI et al., 2004; MOYAERT et al., 2006) como em outros países (AUTHIER et al., 2006; FÉRIA et al., 2002), entretanto, pelo que se sabe, não existe um estudo prévio realizado em gatos no Brasil.

O objetivo deste estudo foi verificar a resistência antimicrobiana entre cepas de *E. coli* isoladas de gatos diarreicos e saudáveis.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e cultura das amostras

Com o propósito de estudar as suscetibilidades antimicrobianas de cepas de *E. coli* frente a 20 agentes antimicrobianos, dezenove gatos diarreicos e vinte e um saudáveis, todos adultos, foram examinados após chegarem para consulta em uma clínica veterinária particular na cidade de Ituverava, São Paulo, entre janeiro e dezembro de 2009. Infelizmente, informações sobre tratamento prévio com antibióticos foram raramente fornecidas pelos proprietários e este trabalho não permite comparação significativa em relação a esse dado. As amostras foram coletadas sob a supervisão de um médico veterinário com *swab* retal com algodão estéril, foram colocadas em meio de transporte de Stuart, e levadas ao laboratório para o processamento imediato, sendo então transferidas para o meio ágar MacConkey (Mac-Difco Laboratories, Detroit, USA) e incubadas por 24 h a 37°C. Ao menos 5 colônias, isoladas de cada placa, foram submetidas a métodos padrões para identificação de *E. coli* (KONEMAN et al., 1997).

Testes de Suscetibilidade

O teste de suscetibilidade em discos com antimicrobianos foi realizado usando o método de difusão em disco como recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007) e um total de 20 agentes antimicrobianos (Cefar, São Paulo, Brasil) foram testados: ácido nalidíxico (30µg), ácido pipemídico (20µg), amicacina (30µg), ampicilina (10µg), amoxicilina-ácido clavulânico (30µg), aztreonam (30µg), cefalotina (30 µg), cefepime (30µg), cefoxetina (30µg), ceftazidima (30µg), ceftriaxona (30µg), cefuroxima (30µg), ciprofloxacina (5µg), clotrimoxazol (25µg), gentamicina (10µg), imipenem (10µg), nitrofurantoína (300 µg), norfloxacina (10µg), tetraciclina (30µg) e tobramicina (10µg).

As cepas de referência *E. coli* ATCC 25922 e ATCC 35218 foram usadas como controle.

Análise Estatística

Diferenças significantes nas frequências de resistência às drogas antimicrobianas testadas foram determinadas pelo teste do qui quadrado (χ^2). Um valor de $P \leq 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

Um total de 190 cepas de *E. coli* foi isolado a partir de 19 amostras fecais de gatos diarreicos (95 cepas) e 21 amostras fecais de gatos saudáveis (95 cepas). A suscetibilidade das cepas aos 20 agentes antimicrobianos testados é mostrada na Tabela 1. Entre as cepas dos gatos diarreicos a maior resistência

Tabela 1 - Porcentagem de resistência antimicrobiana entre as 190 cepas de *Escherichia coli* de amostras fecais de gatos diarreicos a saudáveis.

Agentes antimicrobianos	Resistência a antimicrobianos de cepas de <i>E. coli</i> isoladas de			
	Gatos diarreicos (n=95)		Gatos saudáveis (n=95)	
	Número	Porcentagem	Número	Porcentagem
Amicacina	1	1,0	0	0
Ampicilina	15	15,8	19	20,0
Amoxicilina-ácido clav	0	0	0	0
Aztreonam	0	0	0	0
Cefepime	0	0	0	0
Cefoxitina	0	0	0	0
Ceftazidima	0	0	0	0
Ceftriaxona	0	0	0	0
Cefuroxima	1	1,0	01	1,0
Cefalotina	40	42,1	0	0
Ciprofloxacina	1	1,0	0	0
Clotrimoxazol	3	3,1	17	17,9
Gentamicina	0	0	2	2,0
Imipenem	0	0	0	0
Ácido Nalidíxico	5	5,3	2	2,0
Nitrofurantoína	2	2,0	0	0
Norfloxacina	0	0	2	2,0
Ácido pipemídico	0	0	03	3,1
Tetraciclina	19	20,0	30	30,5
Tobramicina	0	0	0	0
Susceptíveis	42	44,2	62	65,2

observada foi para cefalotina (42,1%), seguida pela tetraciclina (20,0%) e ampicilina (15,8%), enquanto entre os gatos saudáveis as maiores frequências foram para tetraciclina (30,5%), clotrimoxazol (17,9%), e ampicilina (20,0%). A porcentagem de resistência aos outros agentes antimicrobianos foi, em quase todos os casos, ao redor de 6,0%. O teste de avaliação confirmou que a diferença entre os gatos diarreicos e saudáveis é estatisticamente significativa para o clotrimoxazol ($X^2 = 9,44$; $\alpha = 0,01$) e para a tetraciclina ($X^2 = 2,75$; $\alpha = 0,05$) em relação à resistência aos antimicrobianos. A Tabela 1 também permite verificar que o número de isolados susceptíveis a todas as drogas antimicrobianas testadas foi estatisticamente significativo para os gatos diarreicos ($X^2 = 7,67$; $\alpha = 0,01$).

Multiresistência a drogas (MDR), caracterizada como a resistência a três ou mais agentes antimicrobianos, foi encontrada em ambos os grupos, mas entre as cepas dos gatos saudáveis foi maior. Os fenótipos de resistência exibidos pelas 190 cepas são apresentados na Tabela 2. O fenótipo mais frequente de MDR foi o da resistência a ácido nalidíxico-tetraciclina-ampicilina que foi encontrado entre 5,3% das cepas dos animais diarreicos e para os saudáveis foi tetraciclina-clotrimoxazol-ampicilina, encontrada entre 15,8% das bactérias. A Tabela 2 permite verificar que a proporção de isolados resistentes a múltiplas

drogas foi significativamente menor entre os gatos diarreicos ($X^2 = 2,95$; $\alpha = 0,05$).

Um fenótipo de susceptibilidade aos 20 antimicrobianos testados foi encontrado em mais de quarenta por cento das cepas isoladas tanto dos gatos diarreicos com dos saudáveis.

DISCUSSÃO

Na clínica de pequenos animais, a escolha de um tratamento antimicrobiano é muitas vezes feita empiricamente quando um tratamento precisa ser iniciado antes que os resultados dos exames sejam conhecidos. Para o médico veterinário, o conhecimento das espécies bacterianas mais frequentemente envolvidas nas condições infecciosas e suas possíveis resistências aos antimicrobianos é importante.

O relacionamento entre os seres humanos e os animais de companhia tem mudado radicalmente através dos anos, evidenciado pelo contato mais estreito destes com gatos e cachorros. Contato físico muito próximo (através de toque, carícias e lambidas), decorrente da atual percepção do animal de companhia como membro da família, aumenta consideravelmente o risco de transmissão de bactérias resistentes a antimicrobianos entre animais de estimação e seres humanos (van den BOGAARD & STOBBERINGH., 2000; GUARDABASSI et al., 2004).

Tabela 2 Fenótipos de resistência entre as 190 cepas de *E. coli* isoladas de gatos saudáveis e com diarreia, em Ituverava, S.P., Brasil, 2009.

Fenótipo de resistência *	Gatos diarreicos		Gatos saudáveis	
	Número de cepas	Porcentagem das cepas	Número de cepas	Porcentagem de cepas
AMI	01	1,0	---	---
CEF	01	1,0	01	1,0
CEP	29	30,5		
TET	01	1,0	11	11,5
AMP	---	---	01	1,0
TET-AMP	05	5,3	01	1,0
TET-COT	---	---	01	1,0
CEP-TET	0,5	5,3	---	---
CEP-CIP	01	1,0	---	---
CEP-AMP	02	2,0	---	---
PIP-COT	---	---	01	1,0
NAL-TET-AMP	05	5,3	---	---
TET-COT-AMP	---	---	15	15,8
CEP-TET-AMP-COT	01	1,0	---	---
NIT-TET-AMI-COT-CEP-AMP	2	2,0	---	---
NAL-PIP-NOR-GEN-TET-AMP	---	---	02	2,1
Susceptível	42	44,2	62	65,2

AMI-Amicacina; AMP-Ampicilina; CEF-Cefuroxima; CEP-Cefalotina; CIP-Ciprofloxacina; COT-Clotrimoxazol; GEN-Gentamicina; NAL-Ácido Nalidíxico; NIT-Nitrofurantoina; NOR-Norfloxacina; TET-Tetraciclina.

Alguns autores defendem uma vigilância sistemática da resistência antimicrobiana tanto de bactérias patogênicas como das da microbiota dos animais de estimação (RANTALA et al., 2004; PEDERSEN et al., 2007).

Vários estudos longitudinais retrospectivos na Europa e América do Norte têm relatado um aumento na prevalência da resistência a antimicrobianos em diferentes espécies de bactérias isoladas de animais de estimação. Authier et al (2006) e Costa et al. (2008) do Canadá e Moyaert et al (2006) da Bélgica relataram uma porcentagem de resistência de cepas de *E. coli* isoladas de gatos saudáveis muito semelhante à relatada no presente estudo, especialmente para ampicilina, cefalotina, e tetraciclina. A única exceção foi a resistência ao clotrimoxazol, observada no presente estudo que mostrou uma porcentagem de resistência (17,9%) inesperadamente alta entre as cepas de gatos saudáveis que foi completamente diferente dos dados relatados pelos autores mencionados, o que poderia indicar um uso inapropriado da droga no Brasil.

É interessante ressaltar que as cepas de *E. coli* isoladas tanto dos gatos diarreicos quanto dos saudáveis neste estudo mostraram, em geral, baixas porcentagens de resistência a aminoglicosídeos, cefalosporinas e quinolonas, o que pode ser uma informação importante por permitir uma terapia empírica segura para o tratamento de animais de estimação com estes antibióticos no Brasil.

Para apoiar o desenvolvimento de políticas de uso de antimicrobianos, atualizações regulares sobre o estado de resistência aos antimicrobianos mais utilizados na medicina veterinária são necessárias. Relatos de infecções extra-intestinais em cães, devido à *Escherichia coli* multiresistente com resistência às cefalosporinas de terceira geração e fluoroquinolonas são uma preocupação para a saúde pública (WARREN et al., 2001, SANCHEZ et al., 2002). Cepas de *E. coli* MDR isoladas de cães apresentaram genes de resistência integron classe I que tinham sido anteriormente descritos em bactérias isoladas de infecções clínicas em humanos (KANG et al., 2005). Isto sugere a disseminação de mecanismos comuns de resistência entre cepas de cães e seres humanos, possivelmente através de co-seleção e transferência de plasmídeos de resistência à múltiplas drogas (TROT et al., 2004). Os genes de resistência integron de classe I já foram registrados em *E. coli* isoladas de gatos saudáveis (COSTA et al., 2008).

Pouco se sabe sobre a possível troca de bactérias comensais entre animais de companhia e seres humanos que vivem em contato. A monitoração eficaz e rotineira de organismos resistentes e o rastreamento do movimento de genes de resistência por meio de operações epidemiológicas de âmbito nacional e internacional são absolutamente essenciais para o controle da resistência e dos organismos resistentes.. Como conclusão percentuais moderados de resistência à ampicilina e tetraciclina e baixos percentuais aos

outros agentes antimicrobianos têm sido detectados em cepas fecais de *E. coli* de gatos diarreicos e saudáveis no Brasil. Multirresistência entre as cepas de *E. coli* foi detectada em ambos os grupos, gatos diarreicos e saudáveis, em uma porcentagem moderada que deve ser considerada antes de um tratamento empírico dos gatos com drogas antimicrobianas. Mais estudos deverão ser realizados no futuro, a fim de acompanhar a evolução deste tipo de resistência entre as cepas fecais de *E. coli* de animais de estimação.

REFERÊNCIAS

- AUTHIER, S.; PAQUETTE, D.; LABREQUE, O.; SERGE, M. Comparison of susceptibility to antimicrobials of bacteria isolates from companion animals in a veterinary diagnostic laboratory in Canada between 2 time points 10 years apart. **Canadian Veterinary Journal**, v.47, p.774-778, 2006.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement. CLSI document M100-S17**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2007.
- COSTA, D.; POETA, P.; SAENZ, Y.; COELHO, A.N.; MATOS, M.; VINUÉ, L.; RODRIGUES, J.; TORRES, C. Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. **Veterinary Microbiology**, v.127, p.97-105, 2008.
- FÉRIA, C.; FERREIRA, E.; CORREIA, J. D.; GONÇALVES, J.; GAASTRA, W. Patterns and mechanisms of resistance to B-lactams and B-lactamase inhibitors in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs in Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.49, p.77-85, 2002.
- GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D. H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.54, p.321-332, 2004.
- KANG, H. Y.; JEONG, Y. S.; OH, J. Y.; TAE, S. H.; CHOI, C. H.; MOON, D. C.; LEE, W. L.; LEE, Y. C.; SEOL, S. Y.; CHO, D. T.; LEE, J. C. Characterization of antimicrobial resistance and class I integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.55, p.639-644, 2005.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; SCHREKENBERGER, P.; JANDA, C.; WINN, W. C. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**, 5ed. Philadelphia, Lippincott Company, p.363-393, 1997.
- LOVE, D. N.; MALK, R.; NORRIS, J. M. Bacteriological warfare amongst cats: what have we learned about cat bite infections? **Veterinary Microbiology**, v.74, p.179-193, 2000.
- MOYAERT, H.; DE GRAEF, E. M.; HAESBROUCK, F.; DECOSTERE, A. Acquired antimicrobial resistance in the intestinal microbiota of diverse cat populations. **Research in Veterinary Microbiology**, v.81, p.1-7, 2006.
- NORMAND, E. H.; GIBSON, N. R.; REID, S. W. J.; CARMICHAEL, S.; TAYLOR, D. J. Antimicrobial-resistance trends in bacterial isolates from companion-animal community practice in the UK. **Preventive Veterinary Medicine**, v.46, p.267-278, 2000.
- PEDERSEN, K.; JENSEN, H.; FINSTER, K.; JENSEN, V. F.; HEUER, O. E. Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic samples from dogs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.60, p.775-781, 2007.
- RANTALA, M.; LAHTI, E.; PESONEN, S. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus spp.* in dogs given antibiotics for chronic dermatological disorders, compared with non-treated control dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.45, p.37-45, 2004.
- ROSAS, I.; SALINAS, E.; MARTINEZ, L.; CALVA, E.; CRAVIOTO, A.; ESLAVA, C.; AMABILE-CUEVAS, C. F. Urban dust faecal pollution in Mexico City: antibiotic resistance and virulence factors of *Escherichia coli*. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.209, p.461-470, 2006.
- SANCHEZ, S.; MCCRACKIN STEVENSON, M. A.; HUDSON, C. R.; MAYER, M.; BUFINGTON, T.; DAM, Q.; MAURER, J. J. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates associated with nosocomial infection in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.3586-3595, 2002.
- SIMJEE, S.; WHITE, D. G.; MCDERMOTT, P. F.; WAGNER, D. D.; ZERVOS, M. J.; DONABEDIAN, S. M.; ENGLISH, L. L.; HAYES, J. R.; WALKER, R. R. Characterization of Tn1546 in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from canine urinary tract infections: evidence of gene exchange between human and animal enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.4659-4665, 2002.
- SORUM, H.; SUNDE, M. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. **Veterinary Research**, v.32, p.227-241, 2001.
- TROTT, D. J.; FILLIPPICH, L. J.; BENSINK, J. C.; DOWNS, M. T. Canine model for investigating the impact of oral enrofloxacin on commensal coliform and colonization with multidrug-resistant *Escherichia coli*. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, p.439-443, 2004.

Van den BOGAARD, A. E. J. M.; STOBBERINGH, E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.14, p.327-335, 2000.

WARREN, A. L.; TOWNSEND, K. M.; KING, T.; MOSS, S.; O'BOYLE, D.; YATES, R. M.; TROTT, D. J. Multi-drug resistant *Escherichia coli* extended-spectrum B-lactamase activity and fluoroquinolone resistance isolated from clinical infections in dogs. **Australian Veterinary Journal**, v.79, p.621-623, 2001.