

Eliminação de resistência a drogas por fluorquinolonas em *Staphylococcus aureus* de origem bovina¹

Maria S.V. Pereira^{2,3}, José P. Siqueira Júnior² e Galba M. Campos Takaki^{3,4}

ABSTRACT.- Pereira M.S.V., Siqueira Júnior J.P. & Campos Takaki G.M. 2004. [Elimination of resistance to drugs by fluoroquinolones in bovine strains of *Staphylococcus aureus*.] Eliminação de resistência a drogas por fluorquinolonas em *Staphylococcus aureus* de origem bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 24(1):11-14. Depto Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 58059-900, Brazil. E-mail: svieira@dbm.ufpb.br

Bovine strains of *Staphylococcus aureus* were submitted to treatment with four fluoroquinolones in subinhibitory concentrations (1/2 x MICs) to evaluate their influence on the curing of plasmids. Ciprofloxacin showed to be the most efficient by eliminating resistance to streptomycin, tetracyclin, penicillin, and cadmium nitrate. Norfloxacin and pefloxacin eliminated penicillin- and tetracyclin-resistance respectively. Otherwise, plasmids elimination by ofloxacin was not evidenced. The results obtained in this study confirm the potential of fluoroquinolones to eliminate antibiotic-resistant plasmids, and showed to be a valuable contribution for the prevention of multi-resistant strains, and may even enhance their sensitivity to other chemotherapeutic agents.

INDEX TERMS: *Staphylococcus aureus*, fluoroquinolones, elimination of resistance to drugs.

RESUMO.- Cepas de *Staphylococcus aureus* de origem bovina foram submetidas ao tratamento com quatro fluoroquinolonas na concentração subinibitória (1/2 x CMI), para avaliar a influência desses agentes sobre plasmídios. A ciprofloxacina mostrou ser a fluorquinolona mais eficiente, eliminando marcas de resistência para estreptomicina, tetraciclina, penicilina e cádmio. A norfloxacin e a pefloxacin eliminaram resistência para penicilina e tetraciclina, respectivamente; no entanto, não foi evidenciada a eliminação de plasmídeo com ofloxacin. Os resultados confirmam a eficácia das fluorquinolonas em eliminar plasmídios de resistência mostrando a importância desses estudos como contribuição para o entendimento da prevenção de linhagens multiresistentes, uma

vez que as quinolonas em concentrações subinibitórias podem aumentar a sensibilidade das linhagens a outros agentes antimicrobianos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Staphylococcus aureus*, fluorquinolonas, eliminação de resistência a drogas.

INTRODUÇÃO

As fluorquinolonas representam uma das melhores classes de agentes antimicrobianos que são utilizados em medicina humana e veterinária, no tratamento de uma variedade de infecções bacterianas. O considerável sucesso desses produtos sintéticos pode ser atribuído ao seu amplo espectro de atividade, toxicidade mínima sobre eucariotos, fácil penetração na maioria das células bacterianas e boas propriedades farmacocinéticas (Brown 1996, Couturier et al. 1998, Blondeau 1999).

Todas as quinolonas agem por inibição da atividade da enzima alvo, DNA girase, uma topoisomerase tipo II, responsável primariamente pela introdução da superhelicoidização negativa do DNA, na presença de ATP; essas alterações no estado topológico do DNA desempenham funções nos processos de replicação, transcrição, recombinação e reparação celular (Takenouchi et al. 1995, Zhanel et al. 1995).

Além da vasta resistência aos mais diversos antibióticos, o

¹Recebido em 20 de julho de 2003.

Aceito para publicação em 11 de outubro de 2003.

²Depto Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 58059-900. E-mail: svieira@dbm.ufpb.br

³Laboratório de Imunopatologia "Keizo Asami", Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

⁴Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Departamento de Química, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE.

Staphylococcus aureus pode ainda apresentar resistência a íons metálicos (arsenato, cádmio, mercúrio) e a biocidas tais como acriflavina, cloreto de benzalcônio, cetrimida e clorexidina. A seleção e manutenção dessas marcas de resistência se explica pela presença destes agentes, como poluentes urbanos ou industriais, ou mesmo de uso hospitalar como antisséptico (Foster 1983, Russel 1997).

A multiresistência em *S. aureus* resulta da presença de plasmídios, geralmente em múltiplas cópias, o que garante não somente a sua distribuição durante a divisão celular, mas principalmente permite a transferência em frequência mais elevada (Lacey & Chopra 1974), sem causar na maioria das vezes um custo biológico para a célula bacteriana. Embora em amostras bovinas a resistência múltipla não seja muito freqüente, o envolvimento de plasmídios de resistência a antibióticos e íons metálicos tem sido demonstrado (Pereira & Siqueira 1995).

Uma variedade de compostos tais como corantes de acridina, brometo de etídio, rifampicina, sal de bis-amônio e mais recentemente a tioridazina, uma fenotiazina, assim como antibióticos inibidores da subunidade B da DNA girase, novobiocina e coumermicina tem sido reportada para eliminar plasmídios (Weisser & Wiedmann 1985, Fu et al. 1988, Radhakrishnan et al. 1999). No entanto, são raros os relatos da cura de plasmídios por inibidores da subunidade A da DNA girase, particularmente em linhagens de *S. aureus* de origem animal.

O presente estudo compara a influência de quatro fluorquinolonas, ciprofloxacina, norfloxacina, ofloxacina e pefloxacina na eliminação de plasmídios de resistência a antibióticos e ao cádmio, em amostras de *S. aureus* de origem bovina.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas bacterianas. As três cepas de *Staphylococcus aureus* utilizadas nesse estudo foram provenientes de bovinos em fase de lactação, apresentaram plasmídios de resistência a antibióticos e íons cádmio, demonstrados anteriormente por brometo de etídio e confirmadas por eletroforese em gel de agarose (Pereira & Siqueira 1995).

Tratamento por fluorquinolonas. Todas as cepas foram cultivadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Difco), a 37°C por 18 a 24 horas e diluídas 100 vezes no mesmo meio adicionado da concentração subinibitória (1/2 x concentração inibitória mínima) de cada fluorquinolona ensaiada. Após incubação a 37°C por 24 horas, sob agitação, as culturas foram convenientemente diluídas em solução salina esterilizada (cloreto de sódio 0,85%) e alíquotas de 0,1mL foram semeadas em BAB (Blood Agar Base, Difco) para a determinação do título. A perda de resistência a drogas foi determinada por réplica (Ledeberg & Ledeberg 1952) em BAB acrescido de cada droga em estudo, numa concentração que permitia o desenvolvimento de colônias resistentes. A frequência da eliminação foi calculada como a porcentagem de colônias sensíveis a drogas sobre o total de colônias ensaiadas (no mínimo 450 colônias ensaiadas em cada experimento; as cepas sensíveis aos antibióticos e íons cádmio obtidas foram selecionadas e a concentração inibitória mínima foi determinada. Experimentos controles para a determinação de eliminação espontânea de plasmídios foram realizados simultaneamente; as cepas foram cultivadas em caldo BHI (Brain Heart

Infusion, Difco), a 37°C por 18 a 24 horas e diluídas 100 vezes no mesmo meio, na ausência de cada uma das fluorquinolonas ensaiadas.

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), uma série de placas foram preparadas, usando-se concentrações crescentes e dobradas das drogas que variaram de 0,015625 a 512mg da droga por ml em um volume final de 20mL de meio de cultivo (BAB). As cepas foram cultivadas em BHI a 37°C, por 18 a 24 horas, diluídas (10^{-2}) em solução salina e assim inoculadas (10^4 UFC/ml) nas placas com auxílio de uma multialça. As placas foram incubadas a 37°C por 18 a 24 horas e foi considerada como CIM a menor concentração da droga que inibiu completamente o crescimento bacteriano. A linhagem ATCC 29213 (National Committee for Clinical Laboratory Standard 1988), foi utilizada como controle de referência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em estudos preliminares evidenciou-se a presença de plasmídios de resistência a penicilina, cádmio, estreptomicina e tetraciclina, em 18 amostras de *Staphylococcus aureus* de origem bovina (Pereira & Siqueira 1995); destas, três cepas representativas portadoras de plasmídios com marcas de resistência para antibióticos e cádmio foram selecionadas para o presente estudo (Quadro 1).

Em geral, todas as fluorquinolonas ensaiadas neste estudo foram ativas sobre as amostras de *S. aureus* (ciprofloxacina

Quadro 1. Cepas de *Staphylococcus aureus* bovinas portadoras de plasmídios de resistência a antibióticos e um íon metálico

Cepas	Marcadores de resistência	CIM (mg/ml)
223U	Penicilina	32
	Cádmio	64
233FN	Estreptomicina	512
	Tetraciclina	32
319U	Penicilina	16
	Cádmio	64
	Tetraciclina	32

Quadro 2. Eliminação de plasmídios por fluorquinolonas, em cepas de *Staphylococcus aureus* bovinas

Fluorquinolonas	% de colônias curadas/CIM (mg/ml)		
	223U	233FN	319U
Ciprofloxacina	Pen ^a 0	Est 4,22/8	Pen 0,88/0,062 ^b
	Cd 0	Tet 13,1/1 Est Tet 1,48	Cd 0,88/16 ^b Tet 0
Norfloxacina	Pen 0,49/0,125	Est 0	Pen 0
	Cd 0	Tet 0	Cd 0 Tet 0
Ofloxacina	Pen- ^c	Est 0	Pen 0
	Cd- ^c	Tet 0	Cd 0 Tet 0
Pefloxacina	Pen- ^c	Est 0	Pen 0
	Cd- ^c	Tet 0,68/1	Cd 0 Tet 0

^aPen = penicilina; Est = estreptomicina; Tet = tetraciclina; Cd = cádmio.

^bEliminação simultânea de resistência a penicilina e cádmio.

^c Não determinado.

Quadro 3. Frequência de eliminação (%) de resistência a drogas em cepas de *Staphylococcus aureus* após tratamento com brometo de etídio (Pereira & Siqueira Júnior 1995)

Cepas	Marcadores de resistência	Drogas ^a				
		BE	CIP	NOR	OFL	PEF
233FN	Est	0	4,22	0	0	0
	Tet	1,91	13,1	0	0	0,69
223U	Pen	0,41	0	0,49	.. ^c	.. ^c
	Cd	0	0	0	.. ^c	.. ^c
319U	Pen	0	0,88 ^b	0	0	0
	Cd	0	0,88 ^b	0	0	0
	Tet	0,83	0	0	0	0

^aBE = brometo de etídio; CIP = ciprofloxacina; NOR = norfloxacina; OFL = ofloxacina; PEF = pefloxacina.

^b Não determinado.

^cEliminação simultânea.

CMI <2mg/mL; norfloxacina <4mg/mL; ofloxacina <1mg/mL e pefloxacina <2mg/mL). Os resultados de eliminação de plasmídios por fluorquinolonas são apresentados no Quadro 2.

Ciprofloxacina mostrou ser a fluorquinolona mais eficiente, eliminando resistência para estreptomicina, tetraciclina, penicilina e cádmio nas amostras 233FN e 319U, respectivamente. Interessante observar que na cepa 233FN, foi evidenciada a eliminação de resistência à estreptomicina numa frequência de 4,22% e tetraciclina numa frequência de 13,1%; também foi observada eliminação simultânea numa frequência de 1,48%, o que indica que essas marcas de resistência se encontram em plasmídios diferentes. Na cepa 319U, foi evidenciada a eliminação simultânea de resistência à penicilina e cádmio, o que sugere a existência de um único plasmídio, codificando ambas propriedades fenotípicas.

A norfloxacina eliminou resistência à penicilina somente na cepa 223U (0,49%), dados estes concordantes com os de Weisser & Wiedmann, (1985), que evidenciaram eliminação de plasmídios por norfloxacina; no entanto, esses dados são contrastantes com os relatos de Fu et al. (1988) que não observaram cura de plasmídio com norfloxacina e ácido nalidíxico. A pefloxacina eliminou somente resistência à tetraciclina na amostra 233FN.

No entanto, não foi evidenciada a eliminação de plasmídio com ofloxacina, dados estes contrastantes com os de Weisser & Wiedmann (1985) e Fu et al. (1988); essa flutuação das fluorquinolonas na eliminação de plasmídios pode refletir uma peculiaridade da linhagem em estudo (Lacey & Chopra 1974). Em culturas controles não foram observadas a perda espontânea de plasmídios nas linhagens ensaiadas, com exceção para a marca de resistência à estreptomicina na cepa 233FN, cuja frequência de eliminação foi de 0,83%, inferior à observada por ciprofloxacina (4,22%), única fluorquinolona que eliminou esta marca.

A resistência a íons metálicos em linhagens de *S. aureus* de origem animal apresenta um padrão de resistência diferente em relação aos isolados clínicos hospitalares (Lacey & Chopra 1974). Em nossa região, cepas de *S. aureus* exibiram baixa frequência de resistência ao mercúrio e alta frequência

de resistência ao arsenato, enquanto linhagens clínicas hospitalares demonstraram alta frequência de resistência ao mercúrio associada com resistência ao cádmio, e baixa frequência de resistência ao arsenato (Pereira & Siqueira 1995). A resistência ao cádmio em cepas bovinas tratadas anteriormente com brometo de etídio e nas três linhagens aqui selecionadas, indicam que essa resistência pode ou não estar localizada no plasmídio penicilinase ou mesmo ter localização cromossômica (Witte et al. 1986, Pereira & Siqueira 1995).

Para a confirmação da eliminação de plasmídios de resistência a antibióticos e íons cádmio, foi realizada a confirmação em placas com antibióticos e em seguida a determinação da concentração inibitória mínima (Quadro 2).

Em geral, a capacidade de compostos para eliminar plasmídios de *S. aureus*, tais como SDS (dodecil sulfato de sódio), acriflavina ou acridina laranja, são muito tóxicas para o uso terapêutico. No entanto, Cuevas (1988) demonstrou a eliminação de plasmídios penicilinase em *S. aureus*, após tratamento com ácido ascórbico, um composto não tóxico.

A eliminação de resistência a antibióticos *in vivo* em *S. aureus* tem sido observada a décadas, e pode desempenhar um papel importante na conduta de antibioticoterapia, uma vez que o efeito antiplasmidial é exercido não somente sobre a resistência a antibióticos, mas sobre plasmídios metabólicos e de virulência; a terapêutica com ciprofloxacina oral, por exemplo, induziu à cura de plasmídio *in vivo* em *Serratia marcescens* multiresistentes (Molnár et al. 1992). Em *Escherichia coli*, curas semelhantes têm sido também reportadas (Lewin et al. 1991). A eliminação de plasmídios de resistência *in vitro* e *in vivo*, por quinolonas, novobiocina e coumermicina foi relatada em linhagens de *E. coli*, *Bacillus subtilis* e *S. aureus* (Fu et al. 1988).

A atividade antiplasmidial foi estudada em compostos tricíclicos, tais como fenotiazinas e dibenzoazepinas sobre a *E. coli*, podendo ser devida ao aumento da permeabilidade da membrana. Um efeito sinérgico foi observado pela associação de novobiocina com esses compostos: a inibição da DNA girase e formação de um complexo com a forma superenovelada do DNA plasmidial, que pode levar à interrupção de replicação do plasmídio nas células bacterianas (Molnár et al. 1992).

Os resultados, quando comparados aos estudos anteriores utilizando um agente de cura clássico, o brometo de etídio, em amostras de *S. aureus* bovinas, sugerem a existência de um plasmídio para resistência à penicilina e cádmio na cepa 319U, o que não havia sido visto com o brometo de etídio. Na cepa 223U foi confirmado com norfloxacina um plasmídio para resistência a penicilina; no entanto, na amostra 233FN foi evidenciado um plasmídio de resistência para estreptomicina, o que não foi observado com o brometo de etídio (Quadro 3).

Os resultados obtidos mostram a importância do estudo de agentes antimicrobianos na eliminação de plasmídios, seja de resistência a drogas ou mesmo de virulência, o que poderá contribuir, quando associado a estudos *in vivo*, para a prevenção de linhagens multiresistentes. As quinolonas em concentrações subinibitórias, podem aumentar a sensibilidade das cepas bacterianas a outros agentes antimicrobianos.

Agradecimentos.- Os autores agradecem o suporte financeiro concedido pela CAPES, CNPq e PRONEX.

REFERÊNCIAS

- Blondeau J.M. 1999. Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: a review. *Clin. Ther.* 21(1):3-40.
- Brown S.A. 1996. Fluoroquinolones in animal health. *J. Pharmacol. Ther.* 19:1-14.
- Couturier M., Bahassi E.M. & Van Melderden L. 1998. Bacterial death by DNA gyrase poisoning. *Trends Microbiol.* 6(7):269-275.
- Foster T.J. 1983. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol. Rev.* 47:361-409.
- Fu K.P., Grace M.E., Hsiao C.L. & Hung P.P. 1988. Elimination of antibiotic-resistant plasmids by quinolone antibiotics. *Chemother.* 34:415-418.
- Lacey R.W. & Chopra I. 1974. Genetic studies of a multiresistant strain of *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 7:285-297.
- Ledeberg J. & Ledeborg E.M. 1952. Replicating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.* 63:399-406.
- Lewin C.S., Howard B.M.A. & Smith J.T. 1991. 4-quinolones interactions with gyrase subunit B inhibitors. *J. Med. Microbiol.* 35:358-362.
- Molnár J., Földeák S., Nakamura M.J., Rauseh H., Domonkos K. & Szabó M. 1992. Antiplasmid activity: loss of bacterial resistance to antibiotics. *ACTA Pathol. Microbiol. Immun. Scand.* 100(30):24-31.
- National Committee for Clinical Laboratory Standard 1988. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 2nd ed. Tentative Standard. NCCLS Document M7 T2, vol. 8, no. 8. Villa Nova PA.
- Pereira M.S.V. & Siqueira Júnior J.P. 1995. Antimicrobial drug resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from cattle in Brazil. *Letts. Appl. Microbiol.* 20:391-395.
- Radhakrishnan V., Ganguly K., Ganguly M., Datidar S.G. & Chakrabarty A.N. 1999. Potentiality of tricyclic compound thioridazine as an effective antibacterial and antiplasmid agent. *J. Exp. Biol.* 37:671-675.
- Russel A.D. 1997. Plasmids and bacterial resistance to biocides. *J. Appl. Microbiol.* 82:155-165.
- Thakenouchi T., Ishii C., Sugawara M., Tokue Y. & Ohya S. 1995. Incidence of various *gyr A* mutants in 451 *Staphylococcus aureus* strains isolated in Japan and their susceptibilities to 10 fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1414-1418.
- Weisser J. & Wiedemann B. 1985. Elimination of plasmids by new 4-quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28(5):700-702.
- Witte W., Green L., Misra T.K. & Silver S., 1986. Resistance to mercury and to cadmium in chromosomally resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29:663-669.
- Zhanel G.G., Karlowsky J.A., Saunders M.H., Davdson R.J., Hancock R.E.W., McLean I. & Nicolle L.E. 1995. Development of multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* after serial exposure to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:489-495.