

**VII-017 - SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *Pseudomonas* spp.
ISOLADAS DA ÁGUA DO AÇUDE FORQUILHA-CE, BRASIL**

Gerlane de Siqueira Rodrigues

Tecnóloga em Saneamento Ambiental pelo Instituto Federal do Ceará – IFCE, Campus Sobral

Laís Sales Silva

Técnica em meio ambiente pelo Instituto Federal do Ceará – IFCE, Campus Sobral

Maria Nara Elviany Pereira Lima

Graduanda em Tecnologia em Saneamento Ambiental pelo Instituto Federal do Ceará – IFCE, Campus Sobral

Edirsana Maria Ribeiro de Carvalho ⁽¹⁾

Dra. Ciências Marinhas Tropicais -UFC

Professora Fanor-DeVry Brasil

Endereço⁽¹⁾: Fanor-DeVry Brasil -Campus Dunas - Av. Santos Dumont, 7800 - Dunas - 60191-156 - Fortaleza – Ceará - Fone/Fax: (85) 3052.4848 - e-mail: edirsana@yahoo.com.br

RESUMO

A poluição da água doce é um problema ambiental e de saúde pública. Os corpos d'água quando poluídos podem trazer vários problemas à saúde humana. De acordo com dados do Sistema Único de Saúde (SUS), 80% das internações hospitalares no Brasil, estão relacionadas com a má qualidade da água dos mananciais. Dentre os micro-organismos que podem fazer parte da microbiota do ecossistema aquático, destacamos a *Pseudomonas* spp. Essa bactéria apresenta-se vastamente distribuída no ambiente e possui características peculiares, tais como: tolerância por longos períodos em ambientes adversos e capacidade de desenvolver resistência a diferentes tipos de agentes antimicrobianos. Assim, o presente estudo teve como objetivo principal estabelecer a susceptibilidade e os perfis de resistência a diferentes antimicrobianos em *Pseudomonas* spp., isolados de amostra de água do açude Forquilha, Ceará, Brasil. A determinação da susceptibilidade antimicrobiana foi realizada através teste de disco-difusão em ágar. Para a pesquisa foram utilizadas 51 estipes de *Pseudomonas* spp. Os antimicrobianos IMP, GEN e ATM mostraram-se entre 96,1% a 100% eficientes contra as estirpes testadas. Em relação a resistência, os maiores percentuais foram para os seguintes fármacos: AMP, CFO, CFL, NAL, SUL e ERI (96,1%, 80,4%, 66,7%, 58,8%, 56,9% e 54,9%, respectivamente). Verificou-se multirresistência em 92% (47) das estirpes e foram detectados 21 perfis. De acordo com os resultados, a resistência apresentada pelas estirpes pode estar relacionada com a presença de resíduos fármacos dentro do ambiente. Portanto, o monitoramento de substâncias antimicrobianas em afluentes urbanos é de extrema importância para se estabelecer leis que limitem a concentração dessas drogas.

PALAVRAS-CHAVE: Antimicrobianos, resistência bacteriana, resistência múltipla, micro-organismo.

INTRODUÇÃO

A poluição hídrica é um problema muito comum nos dias de hoje e isso causa inúmeros problemas na sociedade atual, principalmente nos locais onde não existe saneamento básico. Em cidades com certo grau de desenvolvimento, a falta de fiscalização adequada sobre a correta disposição dos esgotos domésticos, vem prejudicando a qualidade dos corpos hídricos (BON, 2013).

Os dejetos de esgoto hospitalar, doméstico e águas de rios contaminados podem conter micro-organismos que podem carrear genes de resistência. Dentre os micro-organismos que podem ser isolados nesses ambientes, a presença de *Pseudomonas* spp. em corpos hídricos vem chamando a atenção da comunidade científica. Essa bactéria é ubiqüitária da água e do sedimento, podendo formar biofilmes em algumas superfícies ou substratos. Este micro-organismo é pertencente à microbiota normal da superfície de plantas, pele do homem e animais, porém sua significância está relacionada ao seu papel como patógeno oportunista, ocasionando infecções e reduzindo os mecanismos de defesa do hospedeiro (MAIA *et al.*, 2009).

Por ser uma bactéria que está associada a frequentes infecções no homem, representa um sério problema de saúde pública, pois apresentam elevada morbidade e mortalidade e estão no centro das preocupações da comunidade médica (MOLINA-CABRILLANA *et al.*, 2006).

Quando presente no ambiente aquático, essa bactéria é capaz de persistir por longos períodos em ambientes adversos e desenvolver resistência a agentes antimicrobianos, podendo carrear plasmídios de resistência e genes que lhe conferem multirresistência. Por tal razão, se constitui em um dos paradigmas da resistência bacteriana, pois é um micro-organismo para a qual facilmente podem confluir todos os mecanismos de resistência (GALES; REIS; JONES, 2001; CRESPO, 2002).

O trabalho foi executado em duas etapas. A primeira conduzida em laboratório com o intuito de caracterizar fenotipicamente dos isolados no gênero *Pseudomonas* spp. e verificar através do teste de susceptibilidade antimicrobiana se as estirpes isoladas apresentariam resistência e/ou sensibilidade aos antimicrobianos testados. Na segunda etapa, baseando-se nos resultados obtidos na primeira, verificou-se os perfis de resistência dos isolados, assim como, calculado o índice de múltipla resistência a antimicrobianos (MAR).

Considerando as informações supracitadas, o presente estudo teve como objetivo principal estabelecer a susceptibilidade e os perfis de resistência a diferentes antimicrobianos em *Pseudomonas* spp., isolados de amostra de água do açude Forquilha, Ceará, Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

As bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* spp. apresentam um amplo espectro de resistência, podendo conter resistência a diferentes grupos de antimicrobianos, tais quais: cefalosporinas de terceira e quarta gerações e carbapenêmicos (como imipenem e meropenem). A presença de micro-organismos multirresistentes no ambiente aquático estabelece um desafio substancial para a terapia antimicrobiana, trazendo ao cenário atual a inevitável necessidade de identificar essas bactérias multirresistentes no afluente urbano e avaliar sua contribuição para a disseminação da resistência em amostras ambientais.

O monitoramento de resíduos fármacos no ambiente aquático realizado através de testes em laboratório são de extrema importância, pois representa uma etapa preliminar na detecção de mudanças na susceptibilidade a antimicrobianos desses patógenos no ambiente e além disso, pode-se estabelecer leis que limitem a concentração dessas drogas no ecossistema aquático.

As duas etapas de trabalho serão descritas a seguir:

PRIMEIRA ETAPA: ESTUDOS EM LABORATÓRIO

Origem e preparação das estirpes

Cinquenta e uma estirpes de *Pseudomonas* spp. utilizadas no presente estudo foram isoladas e identificadas de amostras de água do açude Forquilha. Uma vez identificadas como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (FUENTEFRÍA *et al.*, 2008) foram armazenadas em tubos com Agar Tripton de Soja (TSA) e incubadas em estufa B.O.D. a 23°C. Para a identificação até espécie. Para a realização do antibiograma, foi checada, inicialmente, a pureza das culturas em meio Ágar cetrimide (DIFCO) e logo após, procedeu-se a observação em microscópio do inóculo corado, pelo método de Gram (SOARES; CASIMIRO; ALBUQUERQUE, 1991).

Antibiograma

Para o teste de susceptibilidade antimicrobiana foi utilizado o Ágar Mueller-Hinton (Difco) indicado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010). Os discos de antimicrobianos (LABCLIN, PR, Brasil) foram mantidos sob refrigeração numa temperatura de aproximadamente 20°C a 8°C e utilizados dentro do prazo de validade. Antes de serem testados, foram deixados à temperatura ambiente por aproximadamente duas horas. Foram utilizados discos de sensibilidade a antimicrobianos pertencentes às seguintes famílias: a) β -lactâmicos: Ampicilina-AMP (10 μ g), Aztreonam-ATM (30 μ g), Cefoxitina-CFO (30 μ g), Cefalotina-CFL (30 μ g); b) Tetraciclina: Tetraciclina-TET (30 μ g); c) Aminoglicosídeos: Gentamicina-GEN (10 μ g);

Estreptomicina-EST (10µg); d) Cloranfenicol: Cloranfenicol-CLO (30µg); Flofenicol-FLF (30µg); e) Macrolídeos: Eritromicina-ERI (15µg); f) Nitrofurano: g) Nitrofurantoina-NIT (300µg); h) Carbapenêmicos: Imipenem-IMP (10µg); i) Sulfonamidas: Sulfazotrim -SUT (30µg); j) Quilononas: Ácido Nalidíxico-NAL (30µg), seguindo a orientação técnica ditada pelo CLSI (2010). O inóculo inicial foi padronizado por espectrometria (Micronal modelo B542) em 625 nm e então inoculado sobre a superfície do Agar Mueller - Hinton formando um tapete sobre o qual eram colocados os discos de antibióticos. O resultado foi visualizado após 24h de incubação a 35°C. Quando presentes, os halos de inibição foram medidos com paquímetro. A estirpe *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785 foi utilizada como controle dos resultados (CLSI, 2010).

RESULTADOS DA PRIMEIRA ETAPA

Das 126 estirpes isoladas no presente estudo, foram escolhidas aleatoriamente 51 estirpes com características de *Pseudomonas* spp. A confirmação do gênero só foi possível através provas bioquímicas convencionais, como: coloração de Gram, citocromo-oxidase, e, crescimento em caldo simples a 42°C, motilidade, produção de H₂S, prova do citrato de simmons, hidrólise da caseína, teste de hemólise, voges proskauer, produção de pioverdina.

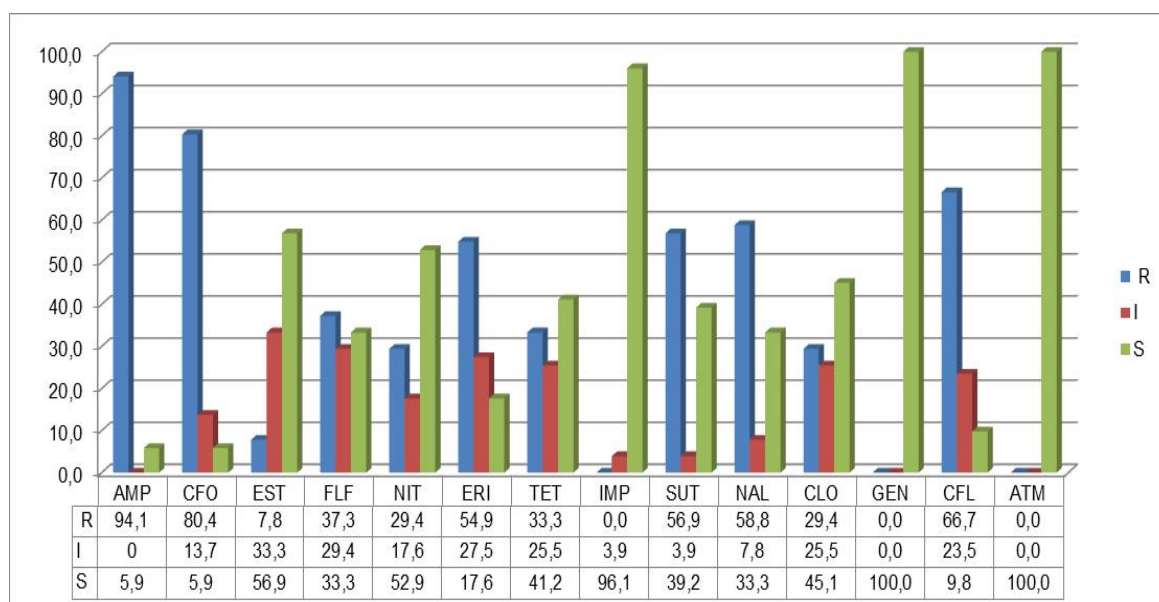


Figura 1- Percentuais de susceptibilidade antimicrobiana das 51 estirpes de *Pseudomonas* spp. isoladas da amostra de água do açude Forquilha, Ceará, Brasil

Após a identificação fenotípica dos isolados, estes foram submetidos ao teste de susceptibilidade antimicrobiana. Os resultados da susceptibilidade das estirpes de *Pseudomonas* spp. aos antimicrobianos empregados estão dispostos na figura 1.

Ampicilina-AMP, Cefoxitina-CFO, Estreptomicina-EST, Flofenicol-FLF, Nitrofurantoina-NIT, Eritromicina-ERI, Tetraciclina-TET, Imipenem-IMP, Sulfazotrim-SUT, Ácido Nalidíxico-NAL, Cloranfenicol-CLO, Gentamicina-GEN, Cefalotina-CFL, Aztreonam-ATM. S- sensível, I –Intermediário, R – Resistente

Das 51 estirpes de *Pseudomonas* spp. testadas, 4 (7,8 %) apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos utilizados. Os antimicrobianos IMP, GEN e ATM mostraram-se entre 96,1% a 100% eficientes contra as estirpes testadas (Figura 1).

No que concerne à resistência dos isolados, os maiores percentuais foram para os seguintes fármacos: AMP, CFO, CFL, NAL, SUL e ERI (96,1%, 80,4%, 66,7%, 58,8%, 56,9% e 54,9%, respectivamente) (Figura 1). Na pesquisa, foi observada a presença de estirpes com resistência intermediária para os agentes: EST, FLF, ERI, CLO, TET, CFL, NIT, CFO, NAL, IMP e SUT (33,3%, 29, 4%, 27,5%, 25,5%, 25,5%, 23,5%, 17,6%,

13,7%, 7,8%, 3,9%, 3,9%, respectivamente). A presença desses micro-organismos com esse perfil pode estar relacionada a alguma mutação que pode favorece-los a sobreviver no ambiente.

Bactérias ambientais que apresentada resistência a diferentes tipos de fármacos gera um risco para a saúde pública, principalmente quando isoladas de águas que são destinadas para consumo e uso recreacional. É sabido que bactérias ambientais são filogeneticamente semelhantes as clínicas e isso torna a profilaxia terapêutica prejudicada, quando estas se tornam resistentes através da presença de resíduos fármacos no ambiente.

Assim, a resistência a agentes antimicrobianos é vista como um problema ecológico, devido a poucas informações sobre os efeitos que essas drogas podem gerar no ecossistema aquático.

SEGUNDA ETAPA: PERFIS DE MULTIRRESISTÊNCIA CÁLCULO DO MAR

Perfis de Multirresistência

Os resultados obtidos, em laboratório, permitiram estabelecer os perfis de multirresistência dos isolados. A multirresistência deve ser vista com atenção, pois uma bactéria pode carregar uma variedade de genes de resistência a antimicrobianos.

A aquisição da resistência por transferência de genes por conjugação, transdução e transformação constitui um grave problema de saúde pública, gerando restrições no tratamento terapêutico. No Brasil, ainda falta estudos mais aprofundados sobre a disseminação de bactérias multirresistentes no ambiente.

Determinação do Índice de Múltipla Resistência a Antimicrobianos (MAR)

As estirpes que apresentaram multirresistência a diferentes famílias de antimicrobiano, foi calculado o índice de múltipla resistência a antimicrobianos (MAR) de acordo com Krumperman (1983). O índice MAR acima de 0,2 é um sinal de que essas estirpes tiveram contato de alguma forma com os fármacos testados.

RESULTADOS DA SEGUNDA ETAPA

Na pesquisa, foi verificada multirresistência em 92% (47) das estirpes e foram detectados 21 perfis (Figura 2). Os perfis de multirresistência dos isolados foram diversificados, com a maior frequência para (AMP, CFO, FLF, ERI, TET, SUL, NAL, CLO, CFL), seguido de (AMP, CFO, FLF, ERI, TET, SUT, NAL, CLO); (AMP, CFO, NIT, SUT, NAL, CFL); (AMP, CFO, CFL); (AMP, CFO, EST, FLF, ERI, SUT, NAL, CLO, CFL); e (AMP, CFO, NIT, SUT, NAL) (Figura 2).

Os perfis das estirpes de *Pseudomonas* spp. frente aos antimicrobianos e a respectiva frequência de ocorrência de resistência estão contidos na Figura 2.

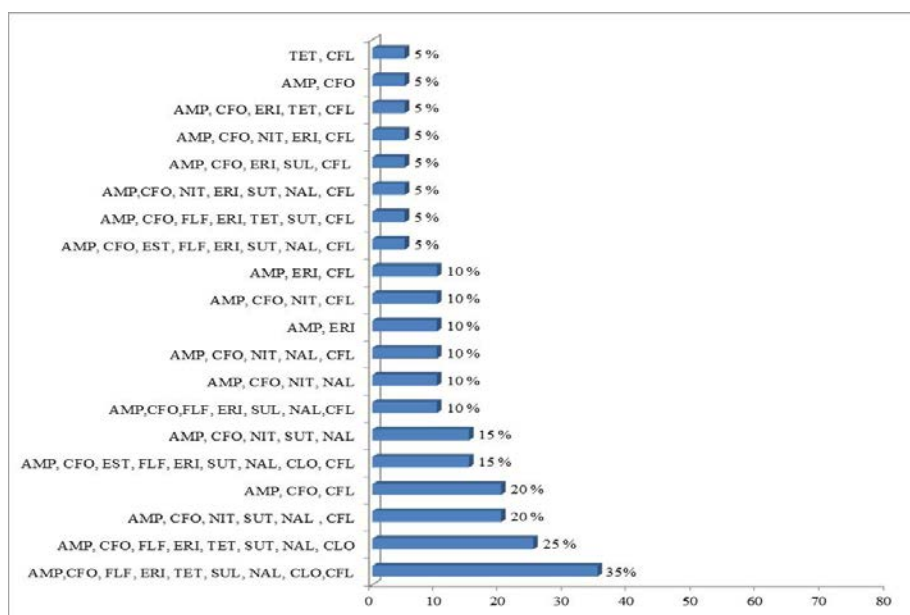


Figura 2- Perfis de multirresistência das estirpes de *Pseudomonas* spp. isoladas de amostra de água do açude Forquilha, Ceará, Brasil.

O índice MAR entre as estirpes resistentes, a pelo menos, dois antimicrobianos, variou de 0,14 a 0,64; o MAR acima de 0,2 caracteriza multirresistência.

As diferenças observadas nos perfis dos isolados podem ser atribuídas ao uso indiscriminado dos agentes antimicrobianos, o que tem favorecido o surgimento de estirpes de resistência múltipla.

CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, concluiu-se que:

A resistência apresentada pelas estirpes pode estar relacionada com a presença de resíduos fármacos dentro do ambiente aquático.

A presença de estirpes com perfil de resistência intermediária pode estar relacionado com algum processo mutagênicos que esses micro-organismos estejam passando para sobreviver no ambiente.

O perfil de multirresistência com mais prevalência nos isolados foi (AMP, CFO, FLF, ERI, TET, SUL, NAL, CLO, CFL). Sua presença em 35% das estirpes chama atenção, devido ao fato de conter antimicrobianos utilizados na prática médica humana e veterinária, dificultando assim a profilaxia

Portanto, faz-se necessário o monitoramento de substâncias antimicrobianas em afluentes urbanos a fim de estabelecer leis que limitem a concentração dessas drogas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BON, B. R. F. Resistência a antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* sp. isolados de ambiente marinho. 2013. 25f. Graduação (Ciências Biológicas: Ênfase em Biologia Marinha e Costeira)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.
2. CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 17th ed. CLSI/NCCLS M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2010.
3. CRESPO, M. P. La lectura interpretativa del antibiograma: Una herramienta para predecir la resistencia bacteriana en el laboratorio de microbiología de rutina. Col. Méd., v. 33, n. 4, p. 179-193, 2002.

4. FUENTEFRIA, D. B.; FERREIRA, A. E.; GRAF, T.; CORCAO, G. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.41, n.5, p. 470-473, 2008.
5. GALES, A. C.; REIS, A. O.; JONES, R.N. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines J Clin Microbiol., v.39, n.1, p. 183–190, 2001.
6. KRUMPERMAN, P.H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. Appl. Microbiol., v.46, n.1, p. 165-170, 1983.
7. MAIA, A.A.; CANTISANI, M. L.; ESPOSTO, E. M.; SILVA, W. C. P.; RODRIGUES E. C. P.; RODRIGUES, D.P.; LÁZARO, N. S. Resistência antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* isolados de pescado e de miúdos de frango. Ciênc. Tecnol. Aliment., v. 29, n.1, p.114-119, 2009.
8. MOLINA-CABRILLANA, J.; SANTANA-REYES, C.; HERNÁNDEZ, J.; LÓPEZ, I.; DORTA, E. Incidence of nosocomial infections at a neonatal intensive care unit: a six-year surveillance study. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin., v.24, n.5, p. 307-312, 2006.
9. SOARES, J.B.; CASSIMIRO, A.R.S.; ALBUQUERQUE, L.M.B. Microbiologia básica. 2ª edição, EUFC, Fortaleza, 1991.