

## VII-018 - SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *Escherichia coli* ISOLADAS DA ÁGUA DO AÇUDE FORQUILHA-CE, BRASIL

**Edirsana Maria Ribeiro de Carvalho** <sup>(1)</sup>

Dra. Ciências Marinhas Tropicais -UFC

Professora Fanor-DeVry Brasil

**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

**Gerlane de Siqueira Rodrigues**

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

**Endereço** <sup>(1)</sup>: 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](mailto:edirsana@yahoo.com.br)

### RESUMO

Águas utilizadas para fins recreacionais devem estar isentas de micro-organismos. As bactérias do grupo coliforme são utilizadas com indicador de qualidade de água. Sua presença em corpos hídricos pode acarretar risco para a saúde humana. Uma forma de atestar a qualidade dos mananciais é através de um monitoramento da qualidade microbiológica da água, que consiste no exame de indicadores de contaminação fecal, sendo que a bactéria *Escherichia coli*, quando presente na água ou alimentos atende há requisitos de um bom indicador de contaminação de origem fecal pois está relacionada com uma contaminação fecal recente. Além disso, algumas estirpes podem abrigar genes de resistência a antimicrobianos tornando assim, a profilaxia médica comprometida. Assim, presente estudo teve como objetivo principal estabelecer a susceptibilidade e os perfis de resistência a diferentes antimicrobianos em estirpes de *Escherichia coli*, 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 31 estirpes de *Escherichia coli*. Os antimicrobianos EST, CFL, NAL, NIT, FLF, IMP, GEN, ATM E CLO mostraram-se entre 80,6% a 100% eficientes contra as estirpes testadas. No que concerne à resistência dos isolados, observou-se que os maiores índices de resistência foram relacionados aos seguintes agentes antimicrobianos: AMP, TET e SUT (48,4%, 38,7% e 32,3%, respectivamente). Verificou-se multirresistência em 41,9% (13) das estirpes e foram detectados 7 perfis. De acordo com os resultados, a presença de resíduos fármacos no ambiente pode estar relacionado com o lançamento esgotos nos corpos hídricos. Esse fato resulta na modificação da microbiota aquática, selecionado estirpes resistentes. 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:** Antibióticos, contaminação, coliformes, resistência múltipla.

### INTRODUÇÃO

A presença de coliformes fecais, na água é um problema de saúde pública, pois este indicador de poluição é facilmente carreado para o ambiente hídrico (COLLIN *et al.*, 2008). Dentre as principais bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes, a *Escherichia coli* é a principal representante, pois quando presente no ambiente aquático indica uma contaminação fecal recente (BRASIL, 2000).

Além da qualidade microbiológica das águas uma preocupação no mundo científico é a resistência crescente das bactérias patogênicas aos antimicrobianos (WEGENER *et al.*, 1997). Nesse sentido, a permanência desses agentes no ambiente gera alterações no ecossistema, levando à deterioração das condições ambientais e principalmente a seleção de bactérias resistentes (ZANETTI *et al.*, 2001). Além disso, a presença desses compostos pode afetar negativamente a microbiota e os organismos aquáticos e terrestres (KEMPER, 2008).

No que concerne sobre a *E. coli*, é considerada como uma fonte prevalente para a disseminação de genes de resistência (CARDONHA *et al.*, 2004). Portanto, a presença de linhagens desse micro-organismo no ambiente é

um fator preocupante por dificultar o tratamento clínico humano e veterinário, agravando os quadros curáveis (MOTA et al., 2005).

Por fim, bactérias resistentes a antimicrobianos podem ser encontradas em diferentes nichos ecológicos, sendo o ambiente hídrico considerado como o mais eficaz para seleção de populações bacterianas resistentes, bem como para recombinação de genes de resistência (CARDONHA et al., 2004). Neste contexto, deve ficar claro que o antimicrobiano não induz a resistência, e sim, atua como um selecionador dos indivíduos mais resistentes no meio de uma população (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Além disso, os efeitos da resistência antimicrobiana para o ecossistema aquático permanecem desconhecidos, mas a implicação da resistência generalizada para a saúde humana é preocupante (CRANE; WATTS; BOUCARD, 2006).

O trabalho foi executado em duas etapas. A primeira conduzida em laboratório com o intuito de caracterizar fenotipicamente dos isolados de *Escherichia coli* 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 estirpes de *Escherichia coli*, isolados de amostra de água do açude Forquilha, Ceará, Brasil.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Bactérias ambientais que carregam genes de resistência gera um grave problema para ecossistema aquático. Isso é resultado da pressão seletiva que esses micro-organismos passam para sobreviver em ambientes que podem estar poluídos com resíduos fármacos. Estes podem atingir um corpo hídrico através de ligações clandestina de esgoto e também da prática veterinária. A presença de micro-organismos multirresistentes no ambiente aquático estabelece um problema para a terapia antimicrobiana.

Uma forma de monitorar estirpes ambientais resistentes a antimicrobianos é através de testes realizados em laboratório, pois representa uma etapa preliminar na detecção da susceptibilidade antimicrobiana desses patógenos no ambiente e além disso, pode-se estabelecer leis que limitem a concentração dessas drogas no ecossistema aquático.

Baseado nas informações supracitadas, as duas etapas de trabalho serão descritas a seguir:

### PRIMEIRA ETAPA: ESTUDOS EM LABORATÓRIO

#### Origem e preparação das estirpes

Trinta e uma estirpes de *Escherichia coli* utilizadas no presente estudo foram isoladas e identificadas de amostras de água do açude Forquilha. Uma vez identificadas como pertencentes ao gênero *Escherichia coli* (MEHLMAN; ANDREWS; WENTZ, 1984) 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 Agar Eosina Azul de Metileno Levine (EMB-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)  $\beta$ -lactâmicos: Ampicilina-AMP (10µg), Aztreonam-ATM (30µg), Cefoxitina-CFO (30µg), Cefalotina-CFL

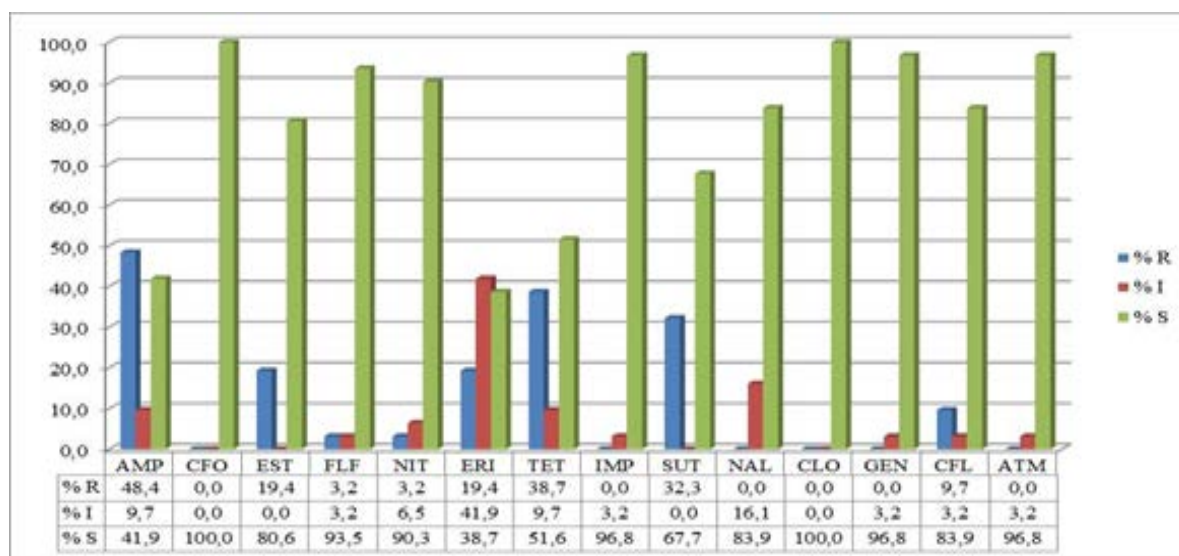
(30µg); b) Tetraciclina: Tetraciclina-TET (30µg); c) Aminoglicosídeos: Gentamicina-GEN (10µg); Estreptomicina-EST (10µg); d) Cloranfenicol: Cloranfenicol-CLO (30µg); Flofenicol-FLF (30µg); e) Macrolídeos: Eritromicina-ERI (15µg); f) Nitrofurano: g) Nitrofurantoina-NIT (300µg); h) Carbapenêmicos: Imipenem-IMP (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 *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle dos resultados (CLSI, 2010).

## RESULTADOS DA PRIMEIRA ETAPA

Foram utilizadas 31 estirpes com características de *Escherichia coli*. Primeiramente foi realizado a coloração de Gram, para verificação da pureza das culturas e em seguida, a confirmação do gênero só foi possível através provas bioquímicas convencionais, como: motilidade, citrato de simmons, produção de indol, voges proskauer e vermelho de metila.

Após a identificação fenotípica dos isolados, estes foram submetidos ao teste de susceptibilidade antimicrobiana. Os resultados da susceptibilidade das estirpes de *E. coli* aos antimicrobianos testados 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



**Figura 1- Percentuais de susceptibilidade antimicrobiana das 31 estirpes de *Escherichia coli* isoladas de amostra de água do açude Forquilha, Ceará, Brasil.**

Cerca de 29% (9) das estirpes de *E. coli*, oriundas de amostra de água do açude Forquilha apresentaram resistência a pelo menos um dos fármacos testados. Os antimicrobianos EST, CFL, NAL, NIT, FLF, IMP, GEN, ATM E CLO mostraram-se entre 80,6% a 100% eficientes contra as estirpes testadas (Figura 1). Uma discreta resistência variando de 3,2% a 9,7% foi observada aos seguintes fármacos: FLF, NIT e CFL. Porém, a constatação deste fato é preocupante uma vez que essas drogas são utilizadas na prática médica.

No que concerne à resistência dos isolados, observou-se que os maiores índices de resistência foram relacionados aos seguintes agentes antimicrobianos: AMP, TET e SUT (48,4%, 38,7% e 32,3%, respectivamente). (Figura 1).

Na pesquisa, foi observada a presença de estirpes com resistência intermediária para os agentes: NAL, NIT, TET, AMP, FLF, IMP, CFL, ATM e GEN (16,1%, 6,5%, 9,7%, 9,7%, 3,2%, 3,2%, 3,2%, 3,2% e 3,2%, respectivamente). A presença desses micro-organismos com esse perfil pode estar relacionada a alguma mutação que os isolados estejam sofrendo para 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.

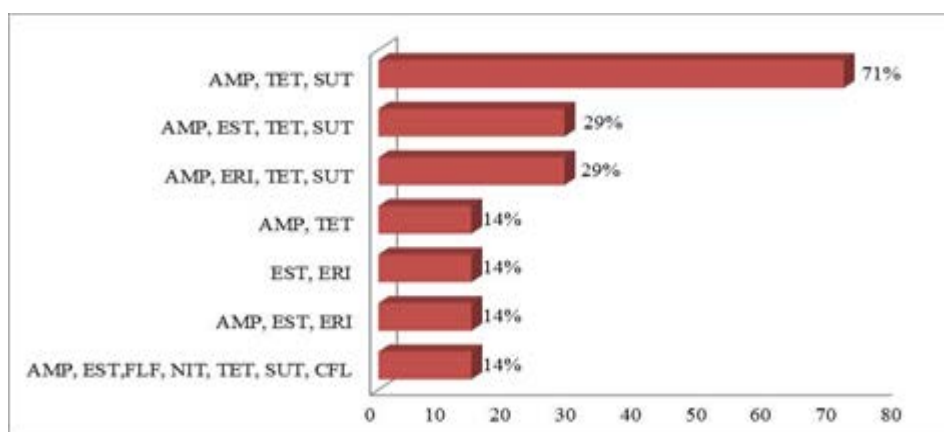
### **Determinação do Índice de Múltipla Resistência a Antimicrobianos (MAR)**

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 41,9% (13) das estirpes e foram detectados 7 perfis (Figura 2). Os perfis de multirresistência dos isolados foram diversificados, com a maior frequência para (AMP, TET, SUT), seguido de (AMP, EST, TET, SUT); (AMP, ERI, TET, SUT); (AMP, TET); (EST, ERI); (AMP, EST, ERI) e (AMP, EST, FLF, NIT, TET, SUT, CFL) (Figura 2).

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



**Figura 2- perfis de multirresistência das estirpes de E.coli 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 0,50; 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.

## CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, concluiu-se que:

A presença de resíduos fármacos no ambiente pode estar relacionado com o lançamento esgotos nos corpos hídricos. Esse fato resulta na modificação da microbiota aquática, selecionando estirpes resistentes.

Micro-organismos com perfil de resistência no ambiente aquático é um motivo de preocupação, uma vez que dificulta o tratamento de infecções, trazendo prejuízos à saúde humana.

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, TET, SUL). Sua presença em 71% 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. BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria 1469, de 29 dez. 2000. **Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.** Brasília, 2000.
2. CARDONHA, A.M.; VIEIRA, R.H.; RODRIGUES, D.P.; MACRAE, A.; PERIANO, G.; TEOPHILO, G.N. Fecal pollution in water from storm sewers and adjacent seashores in Natal. *Int. Microbiol.*, v.7, n. 3, p.213-218, 2004.
3. 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.



4. COLLIN, B.; HOLM, A.R.; HERNROTH, B. Faecal contaminants in edible bivalves from Maputo Bay, Mozambique: seasonal distribution, pathogenesis and antibiotic resistance. **Open Nutrit. J.**, v.2, n. 1874-2882, p.86-93, 2008.
5. CRANE, M.; WATTS, C.; BOUCARD, T. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. **Sci. Total Environ.**, v. 367, n. 1, p. 23-41, 2006.
6. KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecol. Indic.**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2008.
7. 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.
8. MEHLMAN, I.J.; ANDREWS, W.H.; WENTZ, B.A. **Coliform bacteria**. In: Bacteriological Analytical Manual, 6th ed.; Association of Official Analytical Chemists; Arlington, 1984; p.5.01 – 5.07.
9. MOTA, R.A.; SILVA, K.P.C.; FREITAS, M.F.L.; PORTO, W.J.N.; SILVA, L.B.G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Braz. J. Vet. Research Anim. Sci.**, v.42, n. 6, p.465-470, 2005.
10. SOARES, J.B.; CASSIMIRO, A.R.S.; ALBUQUERQUE, L.M.B. **Microbiologia básica**. 2ª edição, EUFC, Fortaleza, 1991.
11. TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760 p.
12. VIEIRA, R.H.S.F.; VASCONCELOS, F.R.; REBOUÇAS, R.H.; EVANGELISTA-BARRETO, N.S. Perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas do açude Santo Anastácio, Ceará, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, v.77, n. 3, p.405-410, 2010.
13. WEGENER, H. C.; BAGER, F.; ARESTRUP, F. M. Vigilância da resistência aos antimicrobianos no homem, nos produtos alimentares e no gado da Dinamarca. **Surveil. Rep.**, v. 3, n. 2, p.17-19, 1997.
14. ZANETTI, S.; SPANU, T.; DERIU, A.; ROMANO, L.; SECHI, L. A.; FADDA, G. In vitro susceptibility of *Vibrio* spp. isolated from the environment. **Int. J. Antimicrob. Ag.**, v. 17, n.5, p.407-409, May. 2001.