

RESISTÊNCIA A ANTIBACTERIANOS EM CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DO RIO SÃO FRANCISCO, REGIÃO DE PETROLINA-PE

Marina Tito Pereira Rocha; Olga Souza Abel Moura; Carlos Henrique Araujo Dias.

Universidade Federal do Vale do São Francisco. marinatitopr@gmail.com; olgasouzabio@gmail.com; carloshadias@gmail.com.

Introdução

A poluição dos recursos hídricos, causada principalmente pelo crescimento populacional e desenvolvimento industrial, configura um dos maiores problemas para as autoridades públicas (Sales, 2006; Barros *et al.*, 2014). Como consequência direta disto, temos o aumento da comunidade de microrganismos capazes de causar doenças (Morais *et al.*, 2011). Atualmente, os antibacterianos são os agentes mais bem-sucedidos no combate às doenças infecciosas, entretanto, à má forma de uso e o lançamento destes de forma massiva no ambiente favorece o surgimento de cepas resistentes (Cabello, 2004; Martinez, 2009).

No que diz respeito ao controle das infecções causadas por bactérias multirresistentes, este representa um grande desafio para o sistema de saúde, pois fazem com que a terapêutica não obtenha êxito, prolongando as internações hospitalares e as taxas de mortalidade (Ibrahim *et al.*, 2000). Desta forma, a vigilância sobre a presença destas bactérias no ambiente se apresenta como fundamental na prevenção e controle desses agentes (Silva; Werneck; Henriques, 2012). No ambiente aquático, o relato da presença de cepas bacterianas resistentes tem aumentado muito nos últimos anos (Harakeh; Yassine; El-Fadel, 2006).

Quando no ambiente aquático, os antibacterianos geram uma pressão seletiva sobre a comunidade microbiana, selecionando-as de forma a favorecer a multiplicação preferencial das cepas resistentes e, uma vez que são capazes de disseminar esta característica por meio de plasmídeos contendo os genes de resistência, aumentam ainda mais o número das espécies resistentes (Pallecchi *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2008). O aumento de cepas resistentes aos antibacterianos, além de ser um problema biológico, é um problema médico, social, econômico e ético, dado que as infecções produzidas pelas bactérias resistentes causam maiores taxas de morbidade e mortalidade no mundo (WHO, 2014).

A cidade de Petrolina, Pernambuco, está situada à margem do rio São Francisco, onde podem ser encontrados diversos locais utilizados para lazer pelos habitantes como também são pontos turísticos da região. Entretanto, ao longo do seu trajeto, por abastecer milhões de habitantes pelos diversos municípios e estados por onde passa, o Rio sofre antropização em seu percurso, com

(83) 3322.3222

contato@conidis.com.br

www.conidis.com.br

despejo de esgotos domésticos e industriais em seus leitos (Machado, 2008). O que também ocorre na cidade, a qual há várias décadas despeja esgoto no corpo hídrico, contribuindo com a contaminação das regiões em seu percurso, causando prejuízos ecológicos e colocando em risco a saúde da população.

Assim, este trabalho objetiva avaliar o perfil de resistência de cepas de *Escherichia coli* isoladas a partir de dois pontos do rio São Francisco com estados distintos de conservação. A fim de avaliar o risco à saúde dos banhistas que utilizam estes ambientes para lazer e avaliar se há variação do perfil de resistência microbiana frente às diferentes condições de conservação do Rio.

Metodologia

As amostras de água para o estudo foram coletadas em dois pontos distintos do rio São Francisco, na região de Petrolina-PE, ambos utilizados pela população da cidade para atividades recreativas relacionadas a água. Um em local próximo ao centro da cidade, antropizado e com a presença de despejo de esgoto no leito do Rio, e outro afastado do centro da cidade, com a predominância de chácaras e ausência de lançamento de resíduos (Ponto B). A amostragem foi realizada com a coleta de aproximadamente 100 mL de água com a utilização de garrafas âmbar escurecidas estéreis, as quais foram acondicionadas em caixas isotérmicas a 4°C e encaminhadas ao laboratório de microbiologia da Universidade Federal do Vale do São Francisco, onde as análises tiveram início em um período não excedente a 2 horas após a coleta. A amostragem ocorreu em junho de 2017.

Para o isolamento das linhagens de *Escherichia coli*, 2 mL de cada amostra de água foram transferidos para tubos de ensaio contendo caldo EC e um tubo Durham invertido, sendo estes incubados a 44,5°C por 48h. Para cada amostra foram confeccionados quinze tubos. Os tubos que apresentaram gás no interior do tubo Durham foram considerados positivos e repicados para placas de Petri contendo o meio ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e incubadas a 36°C por 24 h. As colônias com crescimento verde metálico característico foram então identificadas por meio dos testes bioquímicos: produção de gás, produção de H₂S, fermentação de lactose, fermentação de glicose, indol, motilidade e citrato de simmons. Para evitar o uso de bactérias clone apenas uma colônia foi isolada por placa.

Para o teste de resistência aos antibacterianos foi utilizado o método de difusão por discos (CLSI, 2012). Foram utilizados os discos comerciais com os seguintes antibacterianos: ampicilina (10µg), amoxicilina + ac. clavulânico (30µg), cefotaxima (30µg), amicacina (30µg), estreptomicina

(10µg), gentamicina (10µg), neomicina (30µg), tetraciclina (30µg), sulfazotrim (25µg), azitromicina (5µg), ác. nalidixico (30 µg), ciprofloxacina (5µg), cloranfenicol (30µg) e imipenem (10µg). Primeiramente, os isolados foram suspensos em solução salina 0,85% para ajuste na concentração 0,5 da escala McFarland. A semeadura em tapete nas placas se deu posteriormente com o auxílio de swabs embebidos nas suspensões. Em seguida, foram dispostos os discos antibióticos com o auxílio de uma pinça estéril. Os resultados foram visualizados com 24 h de incubação a 36°C. A partir dos resultados foram calculados o Índice de Resistência aos Antibacterianos (IRA) (Jones et al., 1986) e o índice de Resistência Múltipla Antibacteriana (MAR) (Krumperman, 1983).

Para garantir a confiabilidade dos testes primeiramente foi realizado um teste qualitativo dos discos com a cepa referência de *E. coli* ATCC 25922.

Resultados e Discussão

Ao todo foram isoladas e identificadas 8 cepas de *E. coli* em cada ponto amostral. Os percentuais de resistência encontrados nas análises encontram-se na Tabela 1. Dentre os 16 isolados de *E. coli*, 68,75% apresentou resistência a pelo menos um antibacteriano. A azitromicina foi o antibacteriano com maior percentual de resistência, com 68,75% das estirpes resistentes.

Dentre os isolados do ponto A, onde há presença de derrame de esgoto no leito do Rio, 62,5% dos achados foram resistentes a alguma droga antibacteriana, havendo sinais de resistência também para tetraciclina (25%), sulfazotrim (25%), estreptomicina (12,5%) e clorafenicol (12,5%). Para este local, 25% das estirpes apresentaram resistência a pelo menos três classes diferentes de antibacterianos, caracterizando-as como multirresistentes (Tabela 2). No ponto B foi verificada resistência apenas à azitromicina, em 75% dos isolados.

Gallert *et al.* (2005), observou algo parecido com o achado neste trabalho, o qual em seu estudo encontrou resistência a penicilina, ampicilina e vancomicina em mais de 90% de isolados de *E. coli* em poços localizados próximos a canos de emissão de esgotos. O que não foi observado em estirpes obtidas de poços distantes. Ao que se pode notar, a presença de contaminantes no ambiente, neste caso a presença de esgoto doméstico nos recursos hídricos, afeta o perfil de sensibilidade da comunidade microbiana, colocando em risco à saúde humana e animal.

A transmissão de patógenos por meio dos recursos hídricos já está bastante evidente na literatura, o que é potencializado quando há despejo de efluentes em locais utilizados para lazer pela comunidade que vive no entorno destes ambientes. O que ainda é pouco difundido é a periculosidade das infecções causadas nestes ambientes, onde há a presença de bactérias resistentes

ou multirresistentes, como encontrado neste trabalho. No ambiente aquático, os microrganismos sofrem pressão e seleção quando há presença de contaminantes externos e, a coexistência de um elevado número de microrganismos, comum em locais onde há acúmulo de nutrientes, favorece a seleção das linhagens resistentes e propicia a troca de determinantes de resistência entre os grupos de microrganismos (Schneider *et al.*, 2009).

Tabela 1. Percentual de resistência antimicrobiana nas estirpes de *E. coli* isoladas dos locais de coleta.

Antibacteriano	Ponto A	Ponto B	Total
Ampicilina	0	0	0
Amoxicilina + ac. Clav.	0	0	0
Cefotaxima	0	0	0
Amicacina	0	0	0
Estreptomicina	12,5	0	6,25
Gentamicina	0	0	0
Neomicina	0	0	0
Tetraciclina	25	0	12,5
Sulfazotrim	25	0	12,5
Azitromicina	62,5	75	68,75
Ác. Nalidixico	0	0	0
Ciprofloxacina	0	0	0
Cloranfenicol	12,5	0	6,25
Imipenem	0	0	0

O Índice de Resistência a Antibacterianos (IRA) das amostras variou de 0 a 0,044, o que já representa algum risco para disseminação de genes de resistência (Oliveira, 2017). O índice de Múltipla Resistência aos Antibacterianos (MAR) foi de 0,250 e 0,357. O que permite supor que a multirresistência entre as bactérias presentes no ponto A pode estar relacionada com a disseminação de elementos genéticos móveis ou com a seleção de estirpes mutantes (Oliveira, 2017). Desta forma, faz-se necessário uma avaliação detalhada deste ambiente para que se possa qualificar o local para sua utilização.

Tabela 2. Perfil de resistência a antimicrobianos em cepas de *E. coli* dos pontos de amostragem.

Localização	Cepa	Perfil de resistência	IRA	MAR
Ponto A	1	AZI	0,008	-
	2	TET, SUT, AZI	0,026	0,250
	3	-	-	-
	4	AZI	0,008	-
	5	-	-	-
	6	-	-	-
	7	EST, TET, SUT, AZI, CLO	0,044	0,357
	8	AZI	0,008	-
Ponto B	1	AZI	0,008	-
	2	AZI	0,008	-
	3	-	-	-
	4	AZI	0,008	-
	5	AZI	0,008	-
	6	AZI	0,008	-
	7	AZI	0,008	-
	8	-	-	-

MAR: Múltipla Resistência a Antimicrobianos; IRA: Índice de Resistência a Antimicrobianos.

Conclusões

Neste trabalho foram encontrados valores preocupantes de resistência microbiana no rio São Francisco, em região que banha a cidade de Petrolina-PE contaminada por esgoto doméstico e utilizada como ambiente de lazer pela população, com 25% das cepas classificadas como multirresistentes.

Palavras-Chave: Antibacterianos; *Escherichia coli*; Poluição ambiental; Resistência a medicamentos.

Referências

Barros ALR, et al. **Resistência a metais pesados, antimicrobianos e formação de biofilme em cepas de *Escherichia coli* isoladas de praias de São Luis – Maranhão.** Ver. Patol. Trop. 2014; 43(3); 277-289.

- Cabello FC. **Antibióticos y acuicultura em Chile: consecuencias para la salud humana y animal.** Rev. Méd. do Chile. Santiago. 2004; 132(8), 1001-1006.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard.** 11th ed. 2012; 32(1), 58p.
- Gallert C; Fund K; Winter J. **Antibiotic resistance of bacteria in raw and biologically treated sewage and in groundwater below leaking sewers.** Applied Microbiology and Biotechnology. 2005; 69, 106-112.
- Harakeh S, Yassine H, El-Fadel M. **Antimicrobial-resistant patterns of Escherichia coli and Salmonella strains in the aquatic Lebanese environments.** Environ. Pollut. Oxford. 2006; 143(2), 269-277.
- Ibrahim EH, et al. **The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting.** Clinical Investigations in Critical Care. 2000; 118(1), 146-55.
- Jones JG, Gardener S, Simon BM, Pickup RW. **Factors affecting the measurement of antibiotic resistance in bacteria isolated from lake water.** J. Appl. Microbiol. Oxford. 1986; 60(5), 455-462.
- Krumperman PH. **Multiple antibiotic resistance indexing of Escherichia coli to identify high-risk sources of fecal contamination of foods.** Appl. Environ. Microbiol. Washington. 1983; 46(1), 165-170.
- Machado ATM. **A construção de um programa de revitalização na bacia do São Francisco.** Estudos Avançados. 2008; 22(63), 195-210.
- Martinez, JL. **Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants.** Environmental Pollution. 2009; 157, 2893-2902.
- Morais AV, et al. **Avaliação da qualidade ambiental do rio Itaguapé, Bertioga-SP, com base em testes de toxicidade e indicadores microbiológicos de balneabilidade.** O Mundo da Saúde. São Paulo. 2011; 35(1), 55-63.
- Oliveira GM. **Microbiologia e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e metais pesados em bactérias isoladas de viveiros de peixes** [Dissertação]. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e Biológicas. Universidade Federal do Vale do São Francisco. Petrolina. 2017.
- Pallecchi L, et al. **Antibiotic resistance in the absence of antimicrobial use: mechanisms and implications.** Expert Rev. Anti-Infect. Ther. 2008; 6, 725-732.
- Sales TEA. **Estudo da balneabilidade das praias urbanas do município de Natal-RN durante o ano de 2005** [Dissertação]. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Sanitária. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2006.
- Schneider RN; Nadvorny A; Schmidt V. **Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de Escherichia coli obtidos de águas superficiais e subterrâneas, em área de produção de suínos.** Biotemas. 2009; 22(3), 11-17.
- Silva AR, Werneck L, Henriques CT. **Dinâmica da circulação de bactérias multirresistentes em unidades de terapia intensiva pediátrica do Rio de Janeiro.** Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção. 2012; 2(2), 41-45.
- Smith PR, et al. **Guidelines for antimicrobial use in aquaculture.** In: Guardabassi L, Jensen LB, Kruse H. (Ed.). Guide to antimicrobial use in animals. Oxford: Willey-Blackwell. 2008; 207-216.
- World Health Organization. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance.** World Health Organization. 2014; 232p.