

PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA EM ISOLADOS GRAM NEGATIVOS DO RIACHO CAVOUÇO - UFPE

Macelle Iane Da Silva Correia¹; Maria Betânia Melo de Oliveira²

¹Estudante do Curso de nutrição – CCB - UFPE.- E-mail: macelleiane@hotmail.com, ²Docente/pesquisador do Depto de Bioquímica – CCB – UFPE E-mail: Maria.bmoliveira@ufpe.br

Sumário: Um dos problemas que atinge o ambiente aquático é o lançamento de grandes quantidades de efluentes sem tratamento prévio, comprometendo a biodiversidade aquática, além de desequilíbrios a fauna, a flora e aos ciclos biogeoquímicos. Atualmente a contaminação desses ambientes por bactérias resistentes vem crescendo significativamente. O riacho Cavouço tem sua nascente no *Campus* da Universidade Federal de Pernambuco e recebe um aporte de carga poluidora de resíduos provenientes dos laboratórios de ensino e pesquisa; resíduo hospitalar, além de despejo doméstico oriundos da população circunvizinha. Em trabalhos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa foram obtidos nesse ambiente isolados bacterianos Gram-negativos e Gram-positivos. O objetivo deste trabalho foi confirmar molecularmente a identidade dos isolados Gram-negativos *Pseudomonas putida* e *Sternotrophomonas maltophilia* através da análise das sequências do gene 16S rDNA, além de avaliar o perfil de susceptibilidade dessas bactérias a 20 antimicrobianos. Para análise molecular o gene 16S rDNA foi amplificado por PCR e sequenciado. Para o perfil de suscetibilidade foi realizado o método de difusão em discos (em triplicata), conforme as normas do CLSI (2014). As sequências foram analisadas e a identidade das espécies *P. putida* e *S. maltophilia* foram confirmadas. Quanto ao perfil de resistência, a espécie *P. putida* apresentou um percentual maior (35%) quando comparada a *S. maltophilia* (20%). Os resultados apontam para a implantação de estratégias de controle na disseminação de bactérias resistentes no ambiente investigado, uma vez que as mesmas representam risco potencial à saúde humana.

Palavras-chave: impacto ambiental; resistência; 16rDNA.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os ecossistemas aquáticos têm sido alterados de maneira significativa em função de múltiplos impactos ambientais advindos do lançamento de grandes quantidades de efluentes sem tratamento prévio adequado (LU, et al., 2010). Como consequência, na maioria dos casos, observa-se diminuição ou perda da biodiversidade aquática, além de desequilíbrios à fauna, flora, e aos ciclos biogeoquímicos (WHITE, P. A. & RASMUSSEN, 1998). O riacho Cavouço localizado nas coordenadas 8°2'52.05" latitude Sul e 34°57'10.33" longitude Oeste, possui sua nascente na Universidade Federal de Pernambuco-UFPE. No trecho que percorre dentro da Universidade, esse riacho recebe um aporte de carga poluidora de resíduos provenientes dos laboratórios de ensino e pesquisa; resíduo hospitalar, além de despejo doméstico oriundos da população circunvizinha. Esse riacho deságua no Rio Capibaribe, importante fonte hídrica da maioria das indústrias e de áreas irrigadas para a produção de alimentos no estado de Pernambuco, o que justifica diversas reivindicações ao Governo Estadual para realização de um plano de sustentabilidade hídrica que contemple toda a bacia do Capibaribe, responsável por banhar 43 municípios do estado. Segundo ARAÚJO & OLIVEIRA (2013) o efeito cumulativo dos resíduos descartados inadequadamente pelas atividades de ensino e pesquisa realizadas no

Campus da UFPE vem provocando mudanças na dinâmica desse ecossistema, afetando a qualidade da água, a macro e micro fauna e flora existentes, além da possibilidade da presença de bactérias multirresistentes demonstrando o risco do estabelecimento de patógenos resistentes no meio ambiente. No Brasil, a emergência e disseminação de bactérias produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL) têm sido retratadas como grande problema de saúde pública, especialmente no que diz respeito a patógenos associados às infecções relacionadas com a assistência à saúde (IRAS).

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa isolaram e identificaram várias espécies Gram positivas (quatro) e Gram negativas (sete) nesse riacho. Apesar da importância da caracterização da microbiota desse ambiente, apenas o estudo fenotípica não é suficiente para entender a dinâmica dessas espécies no ambiente. A presente proposta objetivou confirmar molecularmente isolados de *P. putida* e *S. maltophilia* obtidos no riacho Cavouco e avaliar seu perfil de suscetibilidade a 20 antimicrobianos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram investigados os isolados Gram negativos (*P. putida* e *S. maltophilia*) obtidos anteriormente do riacho Cavouco. Esses isolados mantidos em glicerol (25%) -80°C foram reativados em caldo BHI (Brain Heart Infusion - Difco) e plaqueados em Agar Miller Hilton para análises. A extração do DNA genômico das culturas de *P. putida* e *S. maltophilia* foi realizada mediante a técnica descrita por Sambrook *et al* (1989). Foi utilizados iniciadores específicos para a amplificação do gene RNA ribossômico (WEISBURG *et al.*,1991). Para o perfil de susceptibilidade foram testados 20 antimicrobianos, de acordo com suas classes e espectro de ação, pelo método de difusão em discos, conforme as normas do CLSI (2014). *Escherichia coli* foi utilizada como controle de referência.

RESULTADOS

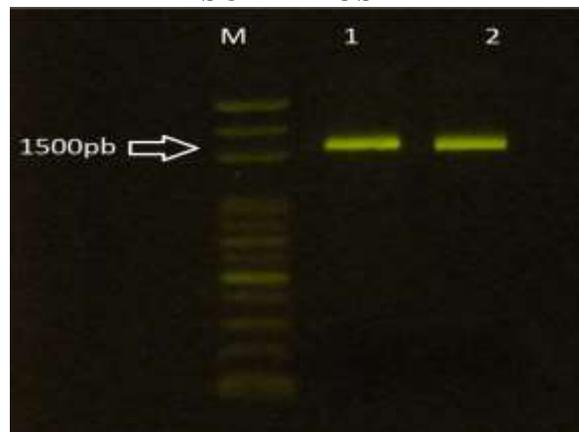


Figura 1- Produtos de amplificação do gene 16S rDNA das bactérias 1 –*P. putida* 2 –*S. maltophilia*. M- Marcador molecular

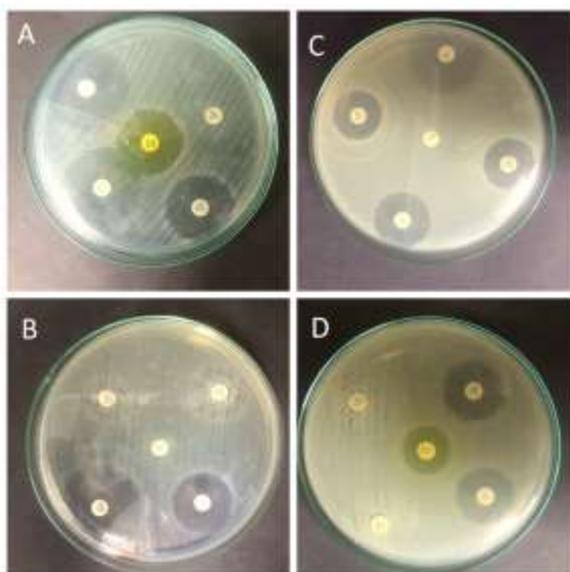


Figura 2 A-D - Halos formados pela *P. putida* (A-B) e *S. maltophilia* (C-D).

Antimicrobiano/ Concentração	Sigla	<i>P. putida</i>	<i>S. maltophilia</i>
Ampicilina (10µg)	AMP	R	S
Oxacilina (1µg)	OXA	R	R
Cefazolina (30µg)	CFZ	I	I
Cefalotina (30µg)	CFL	R	S
Cefepima (30µg)	CPM	S	S
Cefotaxima (30µg)	CTX	S	S
Cefoxitina (30µg)	CFO	S	S
Cefuroxima (30µg)	CRX	S	S
Meropenem (10µg)	MER	S	S
Imipenem (10µg)	IMP	S	S
Amicacina (30µg)	AMI	S	S
Gentamicina (10µg)	GEN	S	S
Ácido Nalidíxico (30µg)	NAL	I	S
Ciprofloxacina (5µg)	CIP	S	S
Tetraciclina (30µg)	TET	R	R
Cloranfenicol (30µg)	CLO	S	S
Nitrofurantoína (300µg)	NIT	S	S
Trimetoprim (5µg)	TRI	R	S

Tabela1- Atividade Antimicrobiana nas bactérias *P. putida* e *S. maltophilia*

DISCUSSÃO

As sequências do gene 16S rDNA obtidas no presente estudo apresentaram similaridade igual ou superior a 97% com a espécie *P. putida* e *S. maltophilia* depositada no GenBank. De acordo com Stackebrant e Goebel (1994), para confirmar a identidade molecular de uma espécie a sequencia de 16S deverá apresentar similaridade igual ou

superior a 97%. *P. putida* foi resistente a 35% dos antimicrobianos testados (Ampicilina, Cefalotina, Clindamicina, Vancomicina, Tetraciclina, Trimetoprim e Oxalicina), além de apresentar resistência intermediária à cefazolina e Ácido Nalidixico (Tabela 1). Para *S. maltophilia* foi observado resistência a 20% dos antimicrobianos (Vancomicina, Tetraciclina, Clindamicina e Oxalicina) e resistência intermediária à cefazolina (Tabela 1). Para os demais antimicrobianos foi observada sensibilidade nas duas espécies investigadas.

Conforme os resultados observados, as bactérias mostraram diferenças quanto ao perfil de susceptibilidade. De acordo com a literatura, o potencial do antimicrobiano ensaiando pode variar de um microrganismo para outro devido às suas características estruturais, além de fatores como pH, oxigênio do meio e condições de incubação que podem interferir nos resultados (MARINS et al., 2011). O riacho Cavouco recebe o descarte de efluentes hospitalares e substâncias químicas, em sua grande maioria sem tratamento prévio, além de ser utilizado como corpo receptor de efluentes da comunidade circunvizinha. Estudos anteriores demonstraram que em alguns pontos do riacho apresentam quantidade excessiva de coliformes fecais, baixa quantidade de oxigênio dissolvido e alterações no índice de qualidade das águas para proteção da vida aquática (Araujo & Oliveira, 2013). Dessa forma, a partir dos resultados obtidos, pode-se perceber que os isolados obtidos deste ecossistema visivelmente impactado, são resistentes a alguns antibióticos e que por isso representam risco potencial à saúde humana.

CONCLUSÕES

O trabalho aponta para a implantação de estratégias de controle na disseminação de bactérias resistentes no meio ambiente, uma vez que as mesmas representam risco potencial à saúde humana.

AGRADECIMENTOS

Aos Departamentos de Bioquímica e Antibióticos, pelo espaço cedido; e a Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação – PROPESQ, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, M. C.; SANTOS, F. M. S. OLIVEIRA, M. B. M. 2013. Monitoramento da qualidade das águas de um riacho da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil *Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science* ISSN 1980-993X – doi:10.4136/1980-993X.
- CLSI (2014). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*; 23th Informational Supplement. M100-S23. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**.
- LU, S.Y.; ZHANGS, S.N.; GENG, T.Y.; LI, C.M.; YED, D.; ZHANG, F. ZOU, H. W. High diversity of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in an urban river sediment habitat. *Appl. Environ. Microbiol.*; v.76, p.5972-5976, 2010.
- MARINS, K. FERRONATO, R, ZANATTA, V, FERNANDES DE MOURA, N. Atividade antimicrobiana das folhas de *Casearia decandra* Jacq. **Brazilian Journal of Pharmacy**, V. 92, 295-298, 2011.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory Manual**, 2ª edição. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- WHITE, P. A.; RASMUSSEN. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface water. **Mutat Res** 410, p. 223-226, 1998.