

Resistência antimicrobiana em *E. coli* isolada do Rio Alegria – Medianeira, PR

Antimicrobial resistance in *E. coli* isolated from Rio Alegria - Medianeira, PR

RESUMO

Murilo Kalil Torres
murilotorres@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil

Marcia Antonia Bartolomeu Agustini
marciaagustini@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil

Cristhiane Rohde
cristhianerohde@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil

Lucas Lopes Fialho
fialho@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná

Alexandre Narcizo da Silva
alexandre.narcizo@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil

Thayane Walkovitz Ribeiro
thayanewalkovitz@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil

Diana Elena Sosa
Dianasosa1411@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná,

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença

O objetivo desse estudo foi analisar o perfil de resistência da *E. coli* isolada do rio Alegria, em Medianeira no Paraná. A obtenção do microrganismo ocorreu por meio do método do Número Mais Provável e esgotamento em estrias em meio de cultura Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB). O teste de susceptibilidade antimicrobiana seguiu a versão brasileira do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST). Para a avaliação de cepas multirresistentes foi calculado o índice de múltipla resistência (MAR), que considera o número de antibióticos para os quais as cepas foram resistentes sobre o número total testado. Para cada ensaio de resistência foi utilizada uma cepa de *E. coli* de cada coleta, totalizando 5 cepas. Analisando os resultados de cada antibiótico utilizado, foi identificada resistência da *Escherichia coli* aos antibióticos Cefalotina (coletas 1, 2, 3, 4 e 5), Ampicilina (coletas 2, 3, 4 e 5), Norfloxacin (coleta 4), Ácido Nalidíxico (coleta 3, 4, 5), Gentamicina (coletas 3, 4 e 5) e Nitrofurantoina (coletas 2, 3, 4 e 5). Por fim, pode-se concluir que o uso desenfreado de fármacos tem contribuído para a seleção de cepas resistentes de *Escherichia coli*, dificultando o tratamento de doenças com o uso dos antibióticos testados.

PALAVRAS-CHAVE: Antibióticos. Coliformes termotolerantes. Sensibilidade bacteriana.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the resistance profile of *E. coli* isolated from the Alegria river, in Medianeira in Paraná. The microorganism was obtained using the Most Likely Number method and streak depletion in a culture medium of Methylene Blue Eosin Agar (EMB). The antimicrobial susceptibility test followed the Brazilian version of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST). For the evaluation of multidrug-resistant strains, the multiple resistance index (MAR) was used, which considers the number of antibiotics that the strains were resistant to the total number tested. For each resistance test, one strain of *E. coli* from each collection was used, totaling 5 strains. Analyzing the results of each antibiotic used, *Escherichia coli* resistance to antibiotics was identified Cephalothin (collections 1, 2, 3, 4 and 5), Ampicillin (collections 2, 3, 4 and 5), Norfloxacin (collection 4), Nalidixic Acid (collection 3, 4, 5), Gentamicin (collections 3, 4 and 5) and Nitrofurantoin (collections 2, 3, 4 and 5). Finally, it can be concluded that the unrestrained use of drugs has contributed to the selection of resistant strains of *Escherichia coli*, which makes it difficult to treat diseases with the use of the tested antibiotics.

KEYWORDS: Antibiotics. Bacterial sensitivity. Fecal coliforms.



INTRODUÇÃO

A dependência da água para a realização das atividades humanas é um fato, o que exige uma atenção redobrada quanto à sua utilização e conservação. Geralmente após seu uso, a água é descartada como esgoto e, é de extrema importância que antes de ser devolvido ao ambiente, este receba tratamento adequado em uma Estação de Tratamento de Esgoto.

Dessa forma, a existência dos serviços de tratamento de efluentes e esgotos está diretamente ligada à manutenção da saúde e qualidade de vida da população, uma vez que doenças causadas por microrganismos em água não tratada ou contaminada é frequente.

As águas contaminadas podem apresentar poluentes como matéria orgânica, sólidos, nutrientes e fármacos. A ocorrência de fármacos residuais, também chamados de micropoluentes emergentes no ambiente pode apresentar efeitos adversos tanto em organismos aquáticos quanto em terrestres. Pelo consumo exacerbado desses fármacos, algumas espécies de patógenos podem desenvolver resistência por meio de mutações e, essas alterações genéticas vão se estabilizando em benefício da sobrevivência de uma linhagem bacteriana. Madigan et al., (2004), definem a resistência a antimicrobianos como a capacidade adquirida de resistir a um agente quimioterápico, ao qual normalmente é suscetível.

Segundo Belisário et al., (2009), os fármacos podem ser encontrados frequentemente em águas superficiais, águas de abastecimento e em estações de tratamento de esgoto, onde há uma variedade de métodos utilizados para o tratamento da água objetivando um produto adequado tanto para o consumo humano quanto para a reinserção no meio ambiente, entretanto, a maioria dos métodos não é capaz de remover completamente os fármacos residuais presentes na água.

Por conter elevada concentração de nutrientes e uma porcentagem residual de fármacos, as águas superficiais que atuam como corpos receptores de efluentes tratados se tornam ambientes propícios para o desenvolvimento das bactérias e conseqüentemente para a transferência dos genes resistentes. Cepas de bactérias coliformes podem disseminar a resistência para outros grupos de bactérias, inclusive para as patogênicas (DEPIZZOL, 2006).

Haja vista, que o Rio Alegria sofre influência da urbanização e da presença de indústrias e áreas agrícolas ao longo de suas margens, este trabalho objetiva avaliar o perfil de suscetibilidade aos antibióticos das cepas de *Escherichia coli* afim de mapear possíveis reservatórios de genes resistentes.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no município de Medianeira, situado na região oeste do estado do Paraná, Brasil (25° 17' 40" S e longitude 54° 05' 30" W-GR). O monitoramento da qualidade da água foi feito em diferentes pontos de coleta no Rio Alegria, que é pertencente à microbacia de mesmo nome e tem suas nascentes localizadas na área rural do município de Medianeira. Esse rio está entre os principais mananciais do município, sendo utilizado pela Sanepar (Companhia de

Saneamento do Paraná), para realizar a captação de água para o abastecimento municipal e apresenta o percurso de seu leito no contexto urbano da cidade. (PREFEITURA DE MEDIANEIRA, 2019).

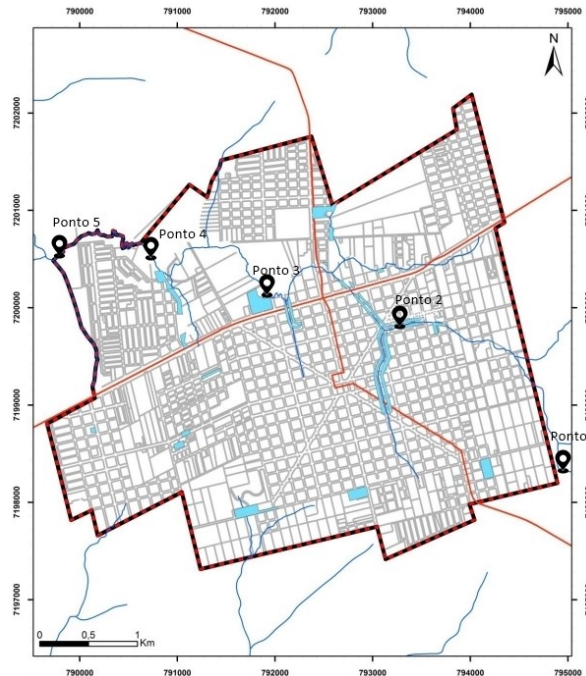
Foram selecionados cinco pontos amostrais no Rio Alegria, cada um contendo características paisagísticas diferentes, como caracterizado no Quadro 1 e demonstrado nas Figuras 1 e 2.

Quadro 1 – Caracterização dos pontos dos pontos amostrais

Amostra	Caracterização
Ponto 1	Caracteriza-se como ponto inicial do rio anterior a seu adentramento na zona urbana, possui estreita mata ciliar e faz vizinhança com área agrícola.
Ponto 2	Encontra-se adentro da zona urbana e não possui mata ciliar
Ponto 3	Encontra-se adentro da zona urbana, possui estreita mata ciliar e próximo aos despejos da Estação de Tratamento de Efluentes (ETE)
Ponto 4	Encontra-se adentro da zona urbana, possui mata ciliar e se encontra posterior a despejos de efluentes de frigorífico
Ponto 5	Caracteriza-se com o final da zona urbana e possui estreita mata ciliar.

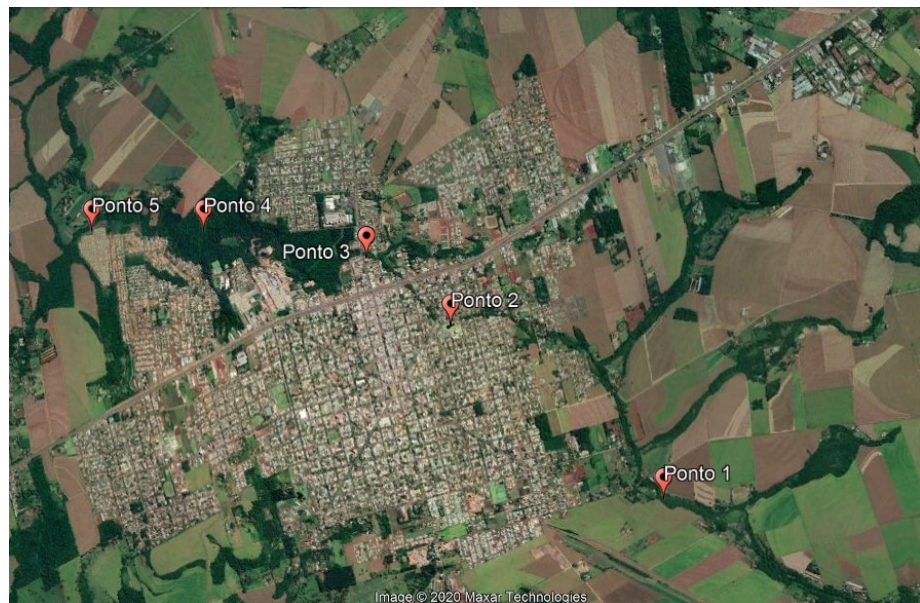
Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 1 – Pontos amostrados visualizados em mapa temático



Fonte: Retirado do Plano Municipal de Saneamento Básico de Medianeira (2018) e modificado pelos autores (2020).

Figura 2 – Pontos amostrados visualizados por imagem de satélite



Fonte: Google Earth (2020).

As coletas de água foram realizadas bimensalmente, durante o segundo semestre de 2019 e o primeiro de 2020, totalizando cinco coletas. Em cada local foram coletadas três amostras de 100 ml, a cerca de 20 cm de profundidade. As três amostras de cada local foram homogeneizadas e armazenadas em um mesmo recipiente estéril, devidamente identificado, e mantidos em uma caixa térmica com gelo, até serem transportados ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Medianeira, onde permaneceram refrigerados a 4 °C, por no máximo 24 h.

As análises microbiológicas foram realizadas utilizando-se o método dos tubos múltiplos ou Número Mais Provável – NMP (SILVA *et al.*, 2017). No teste presuntivo foram inoculadas amostras de água do Rio Alegria nas diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} em tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), adicionando 1,0 mL da diluição por tubo com 9 mL de Caldo LST. Feito isso, os tubos foram incubados a 35 °C durante 48 horas. Os tubos positivos (turbacção do meio e presença de gás no tubo de duran) foram repicados em caldo *Escherichia coli* (EC) para confirmação da presença de coliformes termotolerantes e incubados a 45 °C por 48 horas. O crescimento com produção de gás nos tubos com EC confirma e quantifica a presença de coliformes termotolerantes pela técnica do Número Mais Provável (NMP).

A identificação de *E. coli* foi realizada através do estriamento de cada tubo positivo em placas de Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), sendo este, um meio seletivo diferencial que distinguirá *E. coli* dos demais coliformes termotolerantes. Estas placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas.

Após o período de incubação do EMB, iniciaram-se os estudos de resistência antimicrobiana. Para a realização dos antibiogramas foram alçadas colônias de *E. coli* com 24 horas de crescimento, em tubos contendo água salina estéril para o

ajuste da concentração bacteriana em espectrofotômetro usando o tubo 0,5 da escala MacFarland como referência, que equivale a $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

Os antibiogramas foram realizados com o uso de discos impregnados com Ciprofloxacina, Cefalotina, Ampicilina, Norfloxacin, Ácido Nalidíxico, Gentamicina e Nitrofurantoina e dispostos em placas com ágar *Mueller Hinton*. E para a semeadura da bactéria já com a concentração conhecida foram utilizados swabs. A metodologia utilizada para comparação dos halos de inibição foi a do Comitê Brasileiro sobre Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (BrCAST) que é baseado no Comitê Europeu de Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana (EUCAST).

Ao fim do período de incubação das placas com meio de cultura e antibióticos, cada halo de inibição formado foi medido com escalímetro, sendo feitas duas medidas por halo. Os valores encontrados foram medidos em milímetros (mm) e realizada a média aritmética simples.

O índice de múltipla resistência aos antimicrobianos (MAR) foi calculado conforme metodologia descrita por Krumperman (1983), sendo este índice determinado pela relação entre o número de antimicrobianos em que a amostra é resistente e o número total de antimicrobianos testados. Índice MAR acima de 0,2 caracteriza multirresistência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta as porcentagens de cepas resistentes presentes nas cinco coletas de água do Rio Alegria.

Tabela 1 – Percentual de resistência de cepas de *E. coli* isoladas do Rio Alegria

Antibióticos	[]	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4	Coleta 5
	mg	% Resistência				
Ciprofloxacina	5	0	0	100	80	100
Cefalotina	30	60	100	100	100	100
Ampicilina	10	80	100	100	100	100
Norfloxacin	10	0	0	60	60	40
Ácido Nalidíxico	30	0	20	100	100	100
Gentamicina	10	0	0	60	80	100
Nitrofurantoina	100	0	100	100	100	100

Fonte: Autoria própria (2020).

Analisando os resultados obtidos na Tabela 1, é notório a evolução da resistência das cepas de *E. coli* durante o período de coletas. Também é de suma importância observar que na primeira coleta já houve resistência em dois antibióticos analisados (cefalotina e ampicilina), e na quinta coleta, as cepas apresentaram resistência à quatro novos antibióticos (ciprofloxacina, ácido

nalidíxico, gentamicina e nitrofurantoina) totalizando resistência em seis dos antibióticos testados.

A Tabela 2 evidencia percentuais inversamente proporcionais à tabela 1, uma vez que apresenta os percentuais de cepas sensíveis aos antibióticos testados.

Tabela 2 - Percentual de sensibilidade de cepas de *E. coli* isoladas do Rio Alegria

Antibióticos	[]	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4	Coleta 5
	mg			% S		
Ciprofloxacina	5	100	80	0	0	0
Cefalotina	30	40	0	0	0	0
Ampicilina	10	20	0	0	0	0
Norfloxacina	10	100	100	0	20	20
Ácido Nalidíxico	30	80	0	0	0	0
Gentamicina	10	100	80	0	0	0
Nitrofurantoina	100	20	0	0	0	0

Fonte: Autoria própria (2020).

Ao analisarmos os resultados de forma geral, observa-se que a ação do antibiótico Norfloxacina se mostrou intermediária. No entanto, ao ponderar as coletas individualmente ao longo do ano, percebe-se que inicialmente ele possuía efeito antimicrobiano sobre todas as cepas, por sua vez, nas últimas coletas este antibiótico perdeu parte de sua eficácia, apresentando-se resistente à algumas cepas.

Pelas ações antrópicas, falta de saneamento capaz de remover fármacos, uso inadequado de antibióticos na saúde humana e animal, entre outros fatores, estas cepas foram expostas à antimicrobianos no rio, favorecendo a resistência das mesmas, de modo que, antibióticos que eram eficientes no início das coletas, passaram a se mostrar ineficientes. Vale salientar que a resistência aos antimicrobianos é considerada uma das maiores preocupações globais em saúde pública.

A partir de estudos feitos por Koch (2008), foi possível perceber que a *E. coli*, assim como nesse estudo, também apresentou resistência aos antibióticos Cefalotina, Ácido Nalidíxico e Nitrofurantoina. Esse comportamento foi justificado pela alta frequência em que esses medicamentos são utilizados em tratamentos empíricos de infecções do trato urinário (ITU) em adultos. Em estudos feitos por Bahashwan e Shafey (2013), também foi detectada a ineficiência da Ampicilina no tratamento de infecções causadas por *E. coli*, o que reforça os resultados obtidos.

O Índice de Multirresistência (MAR) das cepas de *E. coli* para cada ponto amostral em relação as diferentes coletas estão presentes na Tabela 3.

Tabela 3 – Índice de Múltipla Resistência (MAR)

	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4	Coleta 5
Ponto 1	0,29	0,43	0,71	0,43	0,86
Ponto 2	0,29	0,43	1	1	0,86
Ponto 3	0,14	0,43	0,71	0,86	1
Ponto 4	0	0,43	1	1	1
Ponto 5	0,29	0,57	1	1	0,86

Fonte: Autoria própria (2020).

Analisando os resultados da Tabela 3, observa-se que 92% das respostas possuem valor maior que 0,2 e 32% destes, são iguais a 1, caracterizando cepas multirresistentes e com alto potencial de transmissão de genes. Estes resultados também se apresentam de forma semelhante em análises realizadas por Costa *et al.*, (2006), em criadouros de suínos no sul do Brasil, onde evidenciou-se a multirresistência da *E. coli* à antimicrobianos.

A alta taxa de multirresistência pode estar relacionada com as ações antrópicas, esgotos clandestinos e atividades industriais de frigoríficos presentes no leito do rio, já que a quantidade de efluentes provenientes de abatedouros, contaminados por fezes e carcaças de animais de sangue quente, aumentam o número de microrganismos, bem como a *E. coli*, enriquecendo o meio para o crescimento exponencial bacteriano e favorecendo a transferência dos genes de resistência.

CONCLUSÃO

Analisando os resultados obtidos foi possível afirmar ao final das coletas, os antibióticos testados não conseguiram apresentar a ação antimicrobiana eficiente contra as cepas de *E. coli*. Também é possível concluir que há uma resposta rápida de resistência do microrganismo em relação aos antibióticos, já que no período de um ano, foi observado o desenvolvimento de resistência em quatro antibióticos, ponderando que já havia resistência em dois dos antibióticos.

Assim, a partir das análises das águas do Rio Alegria pode-se concluir que esse corpo d'água é um possível armazenador de genes de resistência, o que leva a crer que o uso desenfreado de fármacos na cidade de Medianeira tem se mostrado recorrente, acarretando em uma baixa eficiência destes antimicrobianos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação (PROPPG) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, pelo apoio à pesquisa científica e desenvolvimento tecnológico, a UTFPR por ceder seu espaço físico e equipamentos necessários, e também agradecemos a professora orientadora por compartilhar seus conhecimentos com todos os membros envolvidos na pesquisa.

REFERÊNCIAS

BELISÁRIO, M. *et al.* O emprego de resíduos naturais no tratamento de efluentes contaminados com fármacos poluentes. *InterSciencePlace*, v. 1, n. 10, 2015.

Disponível em: <http://interscienceplace.org/isp/index.php/isp/article/view/99>.
Acesso em: 20 ago. 2020.

CASAS, R. L.; ORTIZ, M.; ERAZO-BUCHELI, D. Prevalencia de la resistencia a la ampicilina en gestantes con infección urinaria en el Hospital Universitario San José de Popayán (Colombia) 2007-2008. **Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología**, v. 60, n. 4, p. 334-338, 2009.

COSTA, M. M. *et al.* Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 5-8, 2006.
Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2006000100002&script=sci_arttext. Acesso em: 20 ago. 2020.

DA SILVA, N. *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. Editora Blucher, 2017.

DEPIZZOL, F. **Avaliação da resistência a antibióticos em isolados de *Escherichia coli* provenientes de esgoto hospitalar e sanitário**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2006.

KOCH, C. R. *et al.* Resistência antimicrobiana dos uropatógenos em pacientes ambulatoriais, 2000-2004. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 277-281, 2008. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86822008000300010&script=sci_arttext&tlng=pt. Acesso em: 2 set. 2020.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 165-170, 1983. Disponível em: <https://aem.asm.org/content/46/1/165.short>. Acesso em: 4 set. 2020.

LOPES, A. A. *et al.* Aumento da frequência de resistência à norfloxacina e ciprofloxacina em bactérias isoladas em uroculturas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 44, n. 3, p. 196-200, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0104-42301998000300006>. Acesso em: 4 set. 2020.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Prentice Hall, ed. 10, 2004.

MEDIANEIRA. **Plano municipal de saneamento básico - PMBS**. Medianeira, 2018.