



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANÁLISE DA SUCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS
EM *Pseudomonas spp.* ISOLADAS DE PRODUTOS
SANEANTES

RECIFE / PE
2020

MIZÂNIA CABRAL DE ALMEIDA VITOR

**ANÁLISE DA SUCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS
EM *Pseudomonas spp.* ISOLADAS DE PRODUTOS
SANEANTES**

Monografia, apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Anna Carolina Soares Almeida

Coorientadora: Me. Paula Mariana Salgueiro de Souza

RECIFE / PE

2020

MIZÂNIA CABRAL DE ALMEIDA VITOR

**ANÁLISE DA SUCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS
EM *Pseudomonas spp.* ISOLADAS DE PRODUTOS
SANEANTES**

Monografia, apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Anna Carolina Soares Almeida

Coorientadora: Me. Paula Mariana Salgueiro de Souza

DATA DA APROVAÇÃO: 03/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Anna Carolina Soares Almeida
Presidente

Me. Ana Paula Domingues de Lima
Titular

Me. Bárbara Nazly Rodrigues Santos
Titular

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Pai celestial, pela Sua graça, por me dar sempre forças para continuar e principalmente, por colocar pessoas maravilhosas no meu caminho, ao longo da minha vida acadêmica. Essas pessoas maravilhosas, não poderia mencionar aqui pois a lista é extensa.

À Universidade por proporcionar um ambiente de aprendizagem e desenvolvimento dos conhecimentos adquiridos para ajudar a sociedade e todo meio ambiente.

A todos os meus professores por compartilhar seus conhecimentos e amizade, em especial a minha querida orientadora Prof^a Dr^a Anna Carolina Soares de Almeida e minha amada coorientadora Paula Salgueiro por além de compartilharem seus conhecimentos e me segurarem pela mão nos momentos mais difíceis, que não foram poucos.

Às pessoas mais importantes da minha vida que são minha família. Obrigada minha mãe (Marilene Cabral), por me ensinar a ser uma mulher forte e independente, obrigada ao meu esposo, Gustavo Vitor, por me lembrar que devo lutar pelos meus objetivos me incentivando do seu jeitinho particular e por aguentar meus estresses. Obrigada meu filho, Gabriel Vitor, por chegar na minha vida e mudar totalmente o sentido dela, me dando ainda mais forças para continuar a adquirir mais conhecimento.

Aos meus gestores Raimundo Feitosa, Altamira Sobrinho e Janaína Almeida, por todo apoio e incentivo que sabem que se não fossem a permissão de Deus e suas bondades, não conseguiria concluir minha graduação. Agradeço a minha companheira de trabalho Elizabete Silva, pela compreensão e incentivo e todos os outros companheiros de trabalho.

Por fim, a todos que me ajudaram de forma direta e indireta.
Muito obrigada!

ANÁLISE DA SUCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS EM *Pseudomonas spp.* ISOLADAS DE PRODUTOS SANEANTES

Vitor, M. C. A¹; Souza, P.M.S.S²; Almeida, A. C. S¹

¹ Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.

² Laboratório de Resistência Microbiana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Brasil.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes tipos de produtos saneantes, identificando a presença de microrganismos oportunistas patogênicos, em especial *Pseudomonas*, e conhecer a suscetibilidade aos antimicrobianos. Foram coletadas amostras durante setembro de 2019 e janeiro de 2020 para isolamento de possíveis microrganismos patogênicos oportunistas e a partir destes, foram realizados testes com 7 antimicrobianos, sendo eles amicacina, ceftazidima, cefepime, gentamicina, imipenem, aztreonam e polimixina, através do método disco-difusão. Foram recuperadas 17 cepas ao longo do estudo, que apresentaram sensibilidade à maioria dos antimicrobianos citados. Uma das cepas de *Pseudomonas spp.*, apresentou resistência a cefepime e três cepas apresentaram resistência a amicacina.

Palavras-chaves: *Pseudomonas* ambiental, amaciantes, resistência microbiana.

INTRODUÇÃO

Pseudomonas spp. é um bacilo Gram-negativo, reto ou ligeiramente curvo, aeróbio estrito, incapaz de fermentar carboidratos como a lactose. Quando semeados em meio de cultura ricos ou seletivos, esse microrganismo é capaz de exibir pigmentação verde (Figura 1), azulada, vermelha ou preta, como resultado da produção de substâncias como pioverdina, piocianina, piorrubina ou piomelanina (PALLERONI et al., 1973).

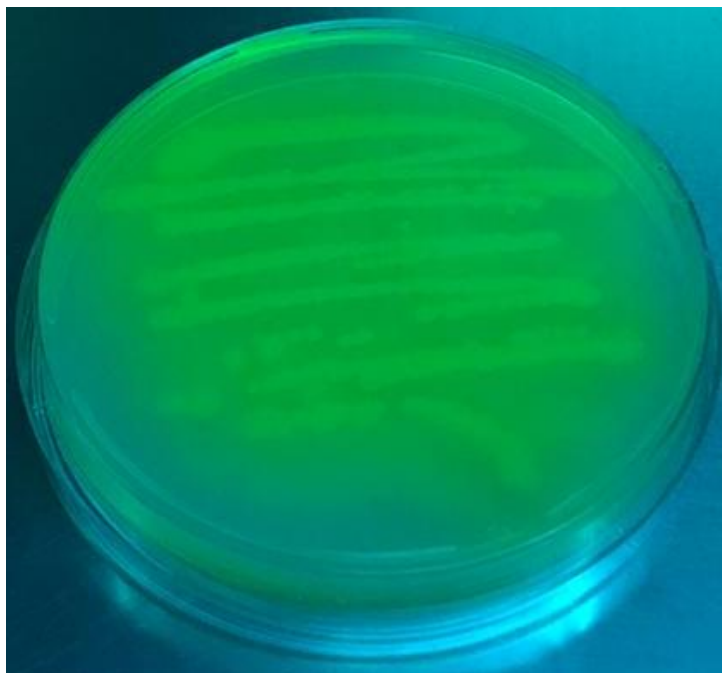


Figura1. *Pseudomonas* spp. em ágar cetremide na luz UV.

Fonte: Autor

É uma bactéria ambiental comum, particularmente abundante em ambientes úmidos (FELFÖLDI; TARNÓCZAI; HOMONNAY, 2010; LEFEBVRE et al., 2017) e se caracteriza como um patógeno oportunista, capaz de causar uma variedade de infecções, incluindo diarreia, bacteremia, pneumonias, infecções oculares e auditivas graves (HUHULESCU et al., 2011). Estudos relacionados a infecções hospitalares por *Pseudomonas* spp., relacionam a origem desse patógeno ao ambiente, como fontes hídricas, ar e superfícies úmidas (BERTHELOT et al., 2005; BLANC et al., 2004)

Pseudomonas também é frequentemente relatada como contaminante de produtos saneantes, tendo sido isolada do ambiente de produção como pias, drenos, juntas e válvulas onde ocorrem acúmulo de água e resíduos de produtos e matérias primas (ADJUNTO et al., 2012; BUGNO et al., 2003).

A água utilizada no processo de fabricação desses produtos também é relatada como fonte de contaminação por *Pseudomonas* spp., além de partículas de poeira, ar contaminado e escamas de pele. Outro tipo de contaminação que pode acontecer é a pós-fabricação, que é ocasionada após uso e estocagem do produto (BUGNO; APARECIDA BUZZO; CALDAS PEREIRA, 2003).

Características como ubiquidade, enorme versatilidade, resistência a muitos detergentes e desinfetantes fazem da *Pseudomonas* spp um microrganismo

persistente no ambiente e infecções causadas por esse patógeno costumam ser difíceis de tratar. Além desses fatores, a resistência a antimicrobianos é um fenômeno que torna a *Pseudomonas* spp um patógeno ainda mais preocupante, uma vez que esse microrganismo pode apresentar resistência natural ou adquirida a muitos antimicrobianos utilizados na prática clínica (SCHIAVANO et al., 2017)

A aquisição de determinantes de resistência nesse patógeno é atribuída ao intercâmbio de material genético, que ocorre de forma natural intra ou interespécies entre os bacilos Gram-negativos. Assim, a capacidade que as espécies de *Pseudomonas* possuem de tornar-se resistente durante o tratamento ao antibiótico é inerente à espécie e muitas vezes, inevitável. (LUPO; HAENNI; MADEC, 2018).

A resistência aos antibióticos se desenvolve como uma natural consequência da habilidade da população bacteriana de se adaptar. Entretanto, o uso indiscriminado de antibióticos na medicina humana e veterinária, aumenta a pressão imposta, selecionando microrganismos resistentes e favorecendo a evolução e a disseminação da resistência bacteriana no meio ambiente (LUPO; HAENNI; MADEC, 2018).

Além da resistência adquirida, *Pseudomonas* é um grupo que exhibe diversos mecanismos de resistência intrínseca, que compreende todas as propriedades inerentes ao microrganismo, nas quais agem limitando a ação dos antimicrobianos. Além disso, mecanismos intrínsecos são estáveis e podem ser transmitidos verticalmente para as gerações subsequentes (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012).

Um exemplo desse mecanismo é o sistema de efluxo multidrogas do tipo RND, em *P. aeruginosa*, o MexABOprM (MORITA; TOMIDA; KAWAMURA, 2012). Esse sistema é capaz de remover β -lactâmicos, cloranfenicol, macrolídeos, novobiocina, sulfonamidas, tetraciclina trimetoprima, assim como vários corantes e detergentes. MexAB-OprM é o sistema de efluxo mais comum, e sua superexpressão resulta em resistência às quinolonas, penicilinas e cefalosporinas. A superprodução de MexAB-OprM, geralmente, é resultado da transcrição aumentada do operon *mexA-mexB-oprM*, devido a mutações no gene cromossomal que codifica a proteína repressora MexR (STRATEVA; YORDANOV, 2009)

O acúmulo de todos esses mecanismos de resistência intrínsecos e adquiridos torna a *Pseudomonas* um microrganismo importante, e trabalhos que investiguem a sua ocorrência e susceptibilidade no ambiente são extremamente relevantes para o desenvolvimento de ações para o seu controle. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a susceptibilidade de *Pseudomonas* isoladas de produtos saneantes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coletas das amostras e análise microbiológica: Foram coletadas amostras de produtos saneantes dentre eles amaciantes, lava louças, lava roupas líquido, limpadores perfumados e desinfetantes, de uma determinada empresa localizada no município de Paulista- PE, durante o período de setembro de 2019 a janeiro de 2020.

As análises microbiológicas realizadas foram, contagem de bactérias heterotróficas utilizando a técnica de semeadura em profundidade (método de *Pour Plate*), assim como também a pesquisa de patógenos, a nível de gênero, em meios de cultura seletivos.

Para determinação de bactérias nos produtos, inicialmente as amostras foram pesadas 10g em 90mL de caldo *Lethen* e homogeneizadas. Após essa diluição, foram retiradas alíquotas (1mL para cada placa) para semeadura de bactérias pela técnica de *Pour Plate*, sendo realizada em duplicata para bactérias. O meio de cultura utilizado foi o ágar *Tryptic Soy* para bactérias heterotróficas. A diluição em caldo *Lethen*, assim como as placas para bactérias heterotróficas, foram incubadas a 37°C durante 24h a 48h. Após o período de incubação, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) nas placas que apresentaram crescimento microbiano. A diluição realizada no caldo *Lethen*, foi semeada em meios de cultura sólidos seletivos (ágar MacConkey e ágar Cetremide), pela técnica de esgotamento, para isolamento das colônias e estas, foram incubadas a 37°C por 16-18h. Após verificação de crescimento, as colônias foram diluídas em solução salina a 0,8% e plaqueadas em placas contendo ágar *Mueller Hinton* e foram incubadas a 37°C 16-18h.

Análise da susceptibilidade aos antimicrobianos: As colônias semeadas anteriormente em ágar *Mueller Hinton* foram suspensas em solução salina a 0,8% e padronizadas de acordo com a escala de *Mcfarland*. O perfil de susceptibilidade dos isolados aos agentes antimicrobianos amicacina, ceftazidima, cefepime, gentamicina, imipenem, aztreonam e polimixina, foi testado pelo método de disco-difusão em ágar (Figura 2), de acordo com as normas preconizadas pelo BRCast, 2019.

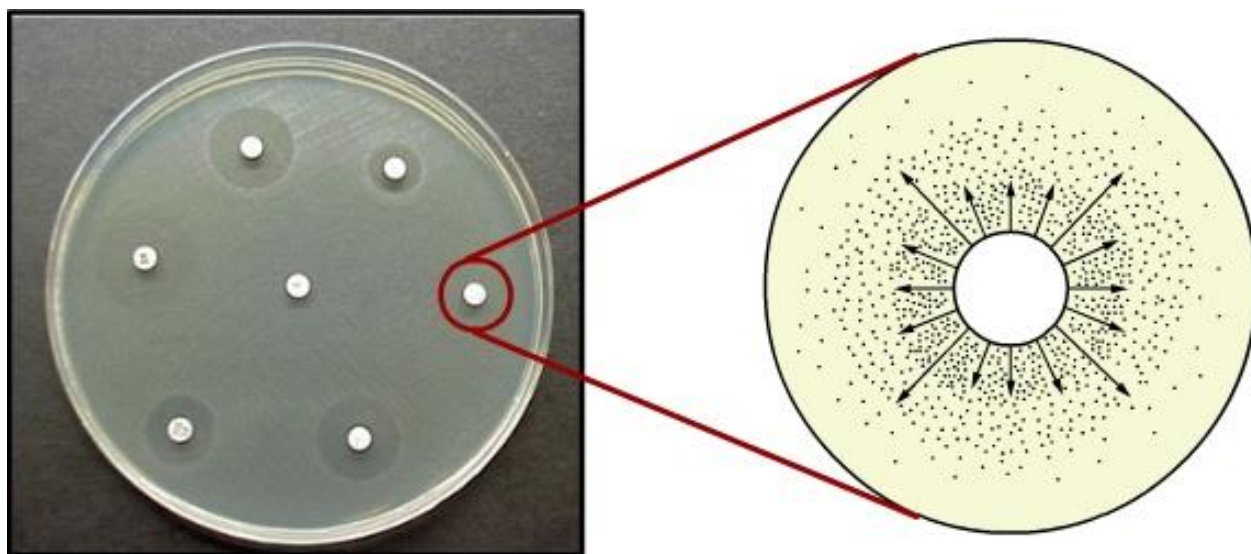


Figura 2. Método de disco difusão em ágar.
Fonte: ANVISA, 2007.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 17 dezessete *Pseudomonas spp.* foram recuperadas de amaciantes (Tabela 1). Todas apresentaram pigmento, morfologia características e crescimento em meio seletivo para o gênero.

Tabela 1- Identificação das amostras de amaciantes utilizadas na pesquisa.

Isolado	Fonte	Data de Coleta/ Análise
1		21/09/2019
2		21/09/2019
3		21/09/2019
4		21/09/2019
5		09/10/2019
6		11/10/2019
7		19/10/2019
8		19/10/2019
9	Amaciante	22/10/2019
10		14/01/2020
11		14/01/2020
12		14/01/2020
13		14/01/2020
14		17/01/2020
15		18/01/2020
16		18/01/2020
17		18/01/2020

O gênero *Pseudomonas* se constitui como uma classe de bactérias já relatada na literatura como contaminantes em antissépticos, desinfetantes e produtos à base de compostos de amônios quaternários, como os amaciantes (MIYAGI;

TIMENETSKY; ALTERTHUM, 2000; NAKASHIMA; HIGHSMITH; MARTONE, 1987; OIE; KAMIYA, 1996, 1997)

Bugno et al. (2009), avaliaram 104 amostras de diferentes produtos saneantes, no Programa de Monitoramento de Saneantes Notificados- PROMOSAN, que é coordenado pela ANVISA. Dos produtos analisados, 41% apresentaram crescimento microbiano, sendo os detergentes para lava louças e os amaciantes, os produtos que apresentaram maior proporção de amostras contaminadas. O estudo citado verificou a presença de bactérias Gram-negativas, dentre as quais, *Pseudomonas aeruginosa* foi a mais frequente (SIRONI, 2009).

Após a análise do perfil de susceptibilidade, uma das cepas de *Pseudomonas* spp. apresentou halo correspondente a resistência à cefepime e três apresentaram resistência a amicacina no teste de disco difusão.

O β -lactâmico cefepime é uma cefalosporina de 4ª geração e representa uma das únicas opções terapêuticas disponíveis pertencentes a essa classe, o que se deve ao fato de *Pseudomonas* apresentarem mecanismos de resistência intrínseca capazes de impedir a ação dessas drogas, como a diminuição da permeabilidade da membrana e a super expressão de bombas de efluxo (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012).

Em relação a resistência ao cefepime, mecanismos de resistência adquiridos podem ser responsáveis por esse fenótipo, como a presença de enzimas capazes de hidrolisar esse antibiótico, denominadas de β -lactamases, ou ainda a diminuição da permeabilidade celular nesse isolado impedindo a entrada da droga na célula e sua ação (LIVERMORE, 2002).

A amicacina, antimicrobiano pertencente a classe dos aminoglicosídeos, também se constitui como uma das poucas opções terapêuticas para tratar infecções causadas por esse patógeno, dada a sua infinidade de mecanismos de resistência intrínseca a outros antibióticos. Atualmente são descritos três mecanismos reconhecidos de resistência bacteriana aos aminoglicosídeos: alteração dos sítios de ligação no ribossomo, alteração na permeabilidade e modificação enzimática da droga. Os genes que conferem resistência podem estar associados a plasmídeos conjugativos e não conjugativos e a transposons, e parecem ser constitutivos, não sendo induzidos pela presença do antimicrobiano (ANVISA, 2007).

O aparecimento e a disseminação de microrganismos com múltipla resistência às drogas são situações preocupantes constantemente relatadas tanto nos hospitais quanto nas comunidades. Isto pode ser o resultado da interação de vários fatores,

sendo talvez o mais importante, a pressão seletiva exercida pelas drogas sobre os microrganismos, dificultando assim, a sua sobrevivência na presença de agentes antimicrobianos (LUPO; HAENNI; MADEC, 2018).

CONCLUSÃO

Os resultados mostrados aqui reforçam a necessidade do desenvolvimento de estratégias cada vez mais rigorosas, que visem conter a disseminação de bactérias resistentes a antibióticos, em especial a *Pseudomonas spp.* no meio ambiente, sobretudo por se tratar de um microrganismo hábil na aquisição e acúmulo de diversos mecanismos de resistência. Esses fatores facilitam a sobrevivência e disseminação de bactérias desse gênero em diferentes tipos de produtos, inclusive em produtos saneantes, o que exige das empresas um maior controle do processo e uso das boas práticas de fabricação.

Além disso, o uso indiscriminado de antibióticos em humanos e animais, assim como o seu descarte inadequado no ambiente, atuam no agravamento desse panorama e, portanto, também devem ser avaliados.

REFERÊNCIAS

ADJUNTO, D.-P. et al. **3 Orientações para os consumidores de saneantes desde que citada a fonte. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa).** [s.l: s.n.].

ANVISA. Antimicrobianos - Bases Teóricas e Uso Clínico. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, p. 1, 2007.

BERTHELOT, P. et al. **Epidemiology of nosocomial infections due to Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacia and Stenotrophomonas maltophilia** *Pathologie Biologie* Elsevier Masson SAS, , 2005.

BLANC, D. S. et al. Faucets as a reservoir of endemic *Pseudomonas aeruginosa* colonization/infections in intensive care units. **Intensive Care Medicine**, v. 30, n. 10, p. 1964–1968, 2004.

BUGNO, A. et al. **Avaliação da Qualidade Microbiológica de Produtos Saneantes Destinados à Limpeza** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. [s.l: s.n.].

BUGNO, A.; APARECIDA BUZZO, A.; CALDAS PEREIRA, T. Avaliação da qualidade microbiológica de produtos saneantes destinados à limpeza. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 3, p. 335–340, jul. 2003.

FELFÖLDI, T.; TARNÓCZAI, T.; HOMONNAY, Z. G. Presence of potential bacterial pathogens in a municipal drinking water supply system. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 57, n. 3, p. 165–179, 1 set. 2010.

FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. W. Adaptive and mutational resistance: Role of porins and efflux pumps in drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 661–681, out. 2012.

HUHULESCU, S. et al. Fatal *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in a previously healthy woman was most likely associated with a contaminated hot tub. **Infection**, v. 39, n. 3, p. 265–269, jun. 2011.

LEFEBVRE, A. et al. Association between *Pseudomonas aeruginosa* positive water samples and healthcare-associated cases: nine-year study at one university hospital. **Journal of Hospital Infection**, v. 96, n. 3, p. 238–243, 1 jul. 2017.

LIVERMORE, D. M. Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 5, p. 634–640, 1 mar. 2002.

LUPO, A.; HAENNI, M.; MADEC, J.-Y. Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. **Microbiology spectrum**, v. 6, n. 3, 2018.

MIYAGI, F.; TIMENETSKY, J.; ALTERTHUM, F. Evaluation of bacterial contamination in disinfectants for domestic use. **Revista de Saude Publica**, v. 34, n. 5, p. 444–448, 2000.

MORITA, Y.; TOMIDA, J.; KAWAMURA, Y. **Mexxy multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*** *Frontiers in Microbiology* Frontiers Research Foundation, , 2012.

NAKASHIMA, A. K.; HIGHSMITH, A. K.; MARTONE, W. J. Survival of *Serratia*

marcescens in benzalkonium chloride and in multiple-dose medication vials: Relationship to epidemic septic arthritis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 1019–1021, 1987.

OIE, S.; KAMIYA, A. Microbial contamination of antiseptics and disinfectants. **American journal of infection control**, v. 24, n. 5, p. 389–95, out. 1996.

OIE, S.; KAMIYA, A. Microbial contamination of antiseptic-soaked cotton balls. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 20, n. 6, p. 667–669, 1997.

PALLERONI, N. J. et al. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 23, n. 4, p. 333–339, 1973.

SCHIAVANO, G. F. et al. Prevalence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in water samples in central Italy and molecular characterization of oprD in imipenem resistant isolates. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, 1 dez. 2017.

SIRONI, P. B. **AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE PRODUTOS SANEANTES DESTINADOS À LIMPEZA**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

STRATEVA, T.; YORDANOV, D. ***Pseudomonas aeruginosa* - A phenomenon of bacterial resistance** **Journal of Medical Microbiology**, set. 2009.