

PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DE CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DO AÇUDE CACHOEIRA EM SOBRAL - CE

Autores: Ailton Dias Ferreira¹; Francisca Lidiane Linhares de Aguiar²; Ana Jessyca do Nascimento Sousa³; Maria Eduarda Loiola Siqueira⁴; Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle⁵

¹ Discente do curso de Ciências Biológicas, CCAB, UVA; E-mail: ailtondyas2000@gmail.com

² Pós-doutoranda, CCAB, UVA, E-mail: lidianelinhares@yahoo.com.br

³ Discente do curso de Ciências Biológicas, CCAB, UVA; E-mail: annajessycasousa@gmail.com

⁴ Discente do curso de Ciências Biológicas, CCAB, UVA; E-mail: loiolaeduarda25@gmail.com

⁵ Professora/Orientadora, CCAB, UVA; E-mail: raquelbios@yahoo.com.br

Resumo: A relação da qualidade da água com a saúde pública propiciou verificar sua qualidade através da presença de *Escherichia coli*, bactéria bioindicadora de contaminação fecal. Ademais, constata-se o aumento da resistência bacteriana nesse importante recurso. Este trabalho objetivou pesquisar a presença de *E. coli* no açude Cachoeira em Sobral - CE e verificar o seu perfil de susceptibilidade aos antibióticos. Foram coletadas 12 amostras de forma bimestral em 3 pontos distintos do açude e foram submetidas ao processo de identificação das cepas de *E. coli*, seguido do teste de sensibilidade a 4 antibióticos. Foi constatado a presença de *E. coli* nas amostras de água. As cepas foram sensíveis à azitromicina e determinadas cepas foram resistentes a ciprofloxacina, gentamicina e imipenem. A presença de *E. coli* pode ser indicativo de contaminação fecal do ambiente e determinadas cepas isoladas deste local estão sendo resistentes a parte dos antibióticos testados.

Palavras-chave: Água; Antibióticos; Resistência; Sensibilidade

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A água doce é um recurso natural limitado e essencial para sustentar toda a vida no planeta (Cunha *et al.*, 2010). As fontes de água mais importantes para a população são nascentes, açudes, lagos, rios e lençóis freáticos, mas a urbanização insuficiente e não planejada tem aumentado a entrada de esgotos domésticos e industriais e de agrotóxicos nos corpos hídricos, o que piora sua qualidade (Moura *et al.*, 2021).

Segundo a FUNASA (2019), açudes ou reservatórios de água é o nome dado a uma espécie de barreira artificial feita para reter uma grande quantidade de água tanto de origem das

chuvas como água corrente de um rio existente, seu principal objetivo é abastecer com água as áreas agrícolas, residenciais e industriais.

O açude Cachoeira, local deste estudo, barra o riacho Mata Fresca e encontra-se no município de Sobral-CE (Ceará, 2010). Suas margens são ocupadas por casas de veraneio e comunidades em casas isoladas. Atualmente a finalidade da água é para uso para lavagens de roupas, pesca, banhos, dessedentação animal e irrigação.

Dado a importância da água na saúde humana, as condições microbiológicas desse recurso passaram a ser determinadas por microrganismos bioindicadores sendo os coliformes o principal grupo (Croxen *et al.*, 2013).

O grupo dos coliformes termotolerantes, comumente chamados de coliformes fecais, é um subgrupo dos coliformes totais, restrito aos membros capazes de fermentar a lactose a 44,5-45,5 °C com produção de gás. Essa definição objetivou, em princípio, selecionar apenas as enterobactérias originários do trato gastrointestinal (*Escherichia coli*), porém, atualmente sabe-se que o grupo inclui membros de origem não fecal várias cepas “*Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter freundii*” (Salfinger; Tortorello, 2015).

Escherichia coli (*E. coli*) é uma bactéria do grupo coliforme que fermenta a lactose e manitol, com produção de ácido e gás a $44,5 \pm 0,2$ °C em 24 horas, produz indol a partir do triptofano, oxidase negativa, não hidrolisa a ureia e apresenta atividade das enzimas β -galactosidase e β -glucuronidas, sendo considerado o mais específico indicador de contaminação fecal recente e de eventual presença de organismos patogênicos (FUNASA, 2013).

A resistência aos fármacos tornou-se um sério problema de saúde pública, sendo de extrema importância o isolamento dos microrganismos, sua identificação e realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos no laboratório (OPAS, 2017).

Um dos principais problemas associados aos fármacos é o uso acentuado de medicações que proporciona o surgimento de linhagens resistentes aos antimicrobianos. Mudanças genéticas possibilitam que as bactérias criem resistência aos fármacos que antes inibiam esses microrganismos (Tortora; Funke; Case, 2012). Essas mudanças são desde deficiência de porinas até produção de enzimas pelas bactérias que inativam a ação das drogas antimicrobianas (Abrantes; Nogueira, 2017).

A resistência frente a um fármaco é definida do ponto de vista operacional, classificando a bactéria como sensível/susceptível, intermediária ou resistente, a depender da possibilidade de se tratar as infecções ocasionadas pelo agente microbiano. (Martinez, 2014).

Esse trabalho tem como objetivo pesquisar a presença da bactéria *E. coli* na água devido a sua importância para a saúde da população bem como verificar se as bactérias deste ambiente estão sendo resistente contra os antibióticos comercializados.

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA DAS AMOSTRAS

Foram escolhidos três pontos distintos do açude Cachoeira para coletar as amostras, e ocorreram quatro coletas que aconteceram de forma bimestral entre março e setembro totalizando doze amostras. Utilizou-se frascos Schott de 500 mL estéreis para o recolhimento da água. A abertura do frasco ocorreu somente no momento da coleta, e realizou-se o mergulho na água a uma distância recuada da margem. Os frascos passaram a ser armazenados de forma asséptica em uma caixa de isopor com bolsas de gelo. Todas as coletas feitas seguiram para o

laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA para a realização das análises.

IDENTIFICAÇÃO DE COLIFORMES NAS AMOSTRAS DE ÁGUA

Teste Presuntivo

As amostras foram inoculadas em tubos estéreis contendo 10 mL do meio de cultura Caldo Lactose Bacto (Difco) e tubos de Durhan invertidos. Os tubos foram então incubados a 35°C/48h. O resultado positivo da prova foi confirmado através da formação de gás nos tubos de Durhan e turvação do meio. As análises foram realizadas conforme o estabelecido pelo *Standard methods for the examination of water and wastewater* (APHA, 2012).

Teste Confirmativo para coliformes termotolerantes

Dos tubos positivos da prova presuntiva, foram retiradas alíquotas que foram transferidas para tubos contendo 10 mL de caldo EC (Difco) e incubados em banho-maria a 45°C por 48 horas para a estimativa dos coliformes termotolerantes. A positividade destas provas foi verificada através da turvação do meio e formação de gás nos tubos de Durhan.

TESTES BIOQUÍMICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Escherichia coli*

O teste bioquímico do indol, VM, VP e citrato (IMViC) permite distinguir bactérias da família enterobacteriaceae a partir da produção de indol, gás sulfídrico, acetoina; da utilização do citrato como fonte única de carbono e da motilidade. O resultado positivo ou negativo do teste foi observado pela alteração da cor e pela mudança de turvação do meio de cultura.

Os tubos de EC positivos para coliformes termotolerantes são suspeitos da presença de *E. coli*. Para a confirmação, uma alçada de cada tubo foi estriada no meio de cultura Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-EMB), meio seletivo diferencial para distinguir *E. coli* dos demais coliformes termotolerantes.

Foram isoladas para as provas bioquímicas do IMViC colônias típicas de *E. coli* crescidas no L-EMB (colônias verdes metalizadas). Foram consideradas confirmadas as culturas com o perfil: ++ -- ou - + -- (Silva, 2017).

ANTIBIOGRAMA

Para a realização desse teste foram utilizados quatro antibióticos sendo eles: Azitromicina, Ciprofloxacina, Gentamicina e Imipenem. Os antibióticos são impregnados em discos para posterior difusão em ágar Mueller Hinton.

Foram utilizadas as oito cepas de *E. coli* isoladas da água do açude Cachoeira e uma cepa controle ATCC 25922. As cepas foram incubadas em Ágar Tryptic Soy (TSA) por 24h. Com auxílio de um swab foi retirado uma alíquota e passado o microrganismo inoculado em placas de ágar Mueller Hinton. Após isso, os discos foram colocados na placa com auxílio de uma pinça e as placas foram incubadas por 24h a 37°C. Após esse período foi realizada a medição dos halos de inibição. O experimento foi realizado em duplicata. Os resultados foram comparados com as normas relativas a teste de sensibilidade antimicrobiana do *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST).

RESULTADO E DISCUSSÃO

IDENTIFICAÇÃO DE Escherichia coli

Através do teste bioquímico (IMViC) foi possível identificar 8 cepas de *Escherichia coli* nas amostras de água das coletas 1, 2 e 4, essa presença pode ser indicativa de contaminação fecal na água. Não foi identificado a presença de *E. coli* nas amostras da coleta 3.

As águas ambientais podem estar sujeitas a contaminação por *E. coli* devido a ação humana. Dentre as ações humanas, destacam-se vazamento de esgotos, fossas sépticas e descarga de águas residuais. As fontes animais de poluição incluem animais de estimação e dejetos de animais em parques e escoamento de fazendas de animais (Cho *et al.*, 2020).

PERFIL DE RESISTÊNCIA E SENSIBILIDADE

Foram testadas as 8 cepas de *E. coli* oriundas da água do açude Cachoeira, sendo quatro cepas da primeira coleta, três cepas da segunda e uma cepa da quarta coleta. As cepas foram submetidas ao teste de sensibilidade antimicrobiana no qual foi selecionado quatro antibióticos mostrados nas tabelas abaixo seguindo os protocolos de acordo com o *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST)*.

As cepas isoladas da primeira coleta apresentaram sensibilidade a quase todos os antibióticos, e apenas uma cepa foi resistente ao imipenem. Na segunda coleta constatou-se resistência das cepas frente aos antibióticos ciprofloxacina, gentamicina e imipenem. Já a cepa isolada da quarta coleta foi resistente à gentamicina e sensível aos demais antimicrobianos.

Identificados isolados de *E. coli* resistentes a ciprofloxacina também foram documentados por Malaggi *et al.* (2020) em estudos feitos em rios de Cascavel - PR que recebem efluentes.

As fluoroquinolonas, grupo a qual pertence a ciprofloxacina, assim como outras drogas, são novos poluentes ambientais importantes. Este medicamento é excretado na urina, muitas vezes na forma não metabolizada (cerca de 70%), entra no ambiente aquático em altas concentrações e pode persistir por muito tempo. Este fato favorece a seleção de genes de resistência para esta classe de antimicrobianos, e a resistência em *E. coli* está frequentemente associada a processos mutacionais quando aquela bactéria interage com aquele poluente ambiental (Finn *et al.*, 2019; Teglia *et al.*, 2019).

Segundo Lépesová *et al.* (2018), a resistência de *E. coli* frente a ciprofloxacina e gentamicina pode ser observada em amostras de águas residuais devido sua ampla utilização na comunidade e nos hospitais.

Segundo Colet *et al.* (2021) a gentamicina é 100% eliminada na urina na forma ativa, essa informação mostra que pode haver interação entre o fármaco e os microrganismos na água o que induz a resistência a este medicamento.

Além do uso e da excreção via renal de antimicrobianos pelos seres humanos, o uso desses fármacos na pecuária tem crescido exponencialmente nas últimas décadas. Como consequência, as águas residuais não tratadas da pecuária têm contribuído fortemente para os altos níveis de antibióticos residuais encontrados no ambiente aquático (Cheng *et al.*, 2020).

Tabela 1. Valores dos halos de inibição dos discos de antibióticos em milímetros.

Cepas	Azitromicina	Ciprofloxacina	Gentamicina	Imipenem
ATCC	21	28,5	13,5	30
A1	17,5	25,5	21	30
A2	30	31,5	22	30
A3	25	32,5	21	31
A4	28	37	27	15
B1	18,5	27	14	24
B2	13,5	19	13,5	25
B3	14,5	18,5	13,5	21,5
C1	14,5	31,5	15,5	24,5

Cepa padrão controle (ATCC), Cepas da primeira coleta (A), Cepas da segunda coleta (B), Cepas da quarta coleta (C). Fonte: O autor.

Tabela 2. Perfil das cepas frente aos antibióticos

Cepas	Azitromicina	Ciprofloxacina	Gentamicina	Imipenem
ATCC	S	S	S	S
A1	S	S	S	S
A2	S	S	S	S
A3	S	S	S	S
A4	S	S	S	R
B1	S	S	R	S
B2	S	R	R	S

Continua

Cepas	Azitromicina	Ciprofloxacina	Gentamicina	Imipenem
B3	S	R	R	I
C1	S	S	R	S

Sensível (S), Resistente (R), Intermediário (I). Fonte: O autor.

Silva *et al.* (2021) ao analisar o susceptibilidade de isolados do Rio Carioca-RJ constatou que todas as cepas de *E. coli* eram sensíveis ao imipenem, resultado semelhante foi encontrado por Costa *et al.* (2016) ao analisar o perfil de susceptibilidade de *E. coli* isoladas dos rios Cuiabá e Coxipó – MT. Esses resultados divergem deste trabalho no qual foi observado resistência em 12,5% das cepas isoladas frente ao imipenem.

Com relação aos demais antibióticos foi notado expressivamente sensibilidade das cepas isoladas. Segundo Costa *et al.* (2016), a alta expressividade de cepas aos antibióticos pode ser indicativo de que as cepas de *E. coli* foram oriundas de animais de sangue quente em que a resistência aos antibióticos são menores, ou, oriundos de animais domésticos e humanos que pouco tem contato com esses antimicrobianos.

CONCLUSÃO

As resistências aos fármacos evidenciam que a água do açude Cachoeira pode ser um ambiente que esteja exercendo pressão para a ocorrência de *E. coli* resistentes a ciprofloxacina, gentamicina e imipenem.

O contato humano, o descarte de resíduos e os dejetos de animais podem estar ligados com o aparecimento de microrganismos resistentes principalmente no período de maior pluviosidade, onde a chuva costuma levar diversos elementos para os corpos de água.

A presença da bactéria *E. coli* pode ser indicativo de contaminação fecal do ambiente e se faz necessário a conscientização da população sobre os descartes de lixo e dejetos de animais para que não contamine esse importante recurso hídrico e para que este não venha se tornar um veículo de doenças.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento desta pesquisa e aos integrantes do Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA) por contribuírem de diversas formas com este trabalho.

REFERÊNCIAS

ABRANTES, J; NOGUEIRA, J. M. R. Utilização de testes fenotípicos para a pesquisa de carbapenamases em enterobactérias: uma ferramenta para orientação clínica. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 3, p. 240-244, 2017.

APHA - American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22ª ed. Washington: APHA, 2012, 9-224p.



UNIVERSIDADE ESTADUAL
VALE DO ACARAÚ

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PRPPG



CEARÁ
GOVERNO DO ESTADO
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E EDUCAÇÃO SUPERIOR

BrCAST - Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos, método de disco difusão, 2023.

CEARÁ. (2010). "Plano de gerenciamento das águas da bacia do Acaraú - fase 1: estudos básicos e diagnóstico. " **SRH - Secretaria dos Recursos Hídricos.**

CHO, S; Jackson, C. R; FRYE, J. G. The prevalence and antimicrobial resistance phenotypes of Salmonella, Escherichia coli and Enterococcus sp. in surfacewater. **Applied Microbiology**, v.71, p. 3-25, 2020.

COLET, Christiane et al. Qualidade microbiológica e perfil de sensibilidade a antimicrobianos em águas de poços artesianos em um município do noroeste do Rio Grande do Sul. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 26, p. 683-690, 2021.

CROXEN, M.; LAW, R.J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K.M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B.B. Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 4, p. 822-880, 2013.

DA CUNHA, Andréia Heringer et al. Análise microbiológica da água do rio Itanhém em Teixeira de Freitas-BA. **Revista Biociências, UNITAU**, v. 16, n. 2, 2010.

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. **Manual prático de análise de água**. 2. ed. Brasília, DF: Assessoria de GALL, J. Açudes são reservas de água importante para o abastecimento, 2019.

MARTINEZ, J. L. General principles of antibiotic resistance in bacteria. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 11, p. 33–39, 2014.

MOURA, A. C.; ASSUMPÇÃO, R. A. B.; BISCHOFF, J. Monitoramento físico-químico e microbiológico da água do Rio Cascavel durante o período de 2003 a 2006. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 1, p. 17-22, 2021.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. **DE S. Folha informativa - Resistência aos antibióticos**, 2017. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5664:folha-informativa-resistencia-aos-antibioticos&Itemid=812.

SALFINGER, Y. & TORTORELLO, M.L. (eds.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 5th ed.* Washington: **American Public Health Association (APHA)**, 2015.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5. ed. São Paulo: Blucher, 2017.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. , 2012.



UNIVERSIDADE ESTADUAL
VALE DO ACARAÚ

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PRPPG



CEARÁ
GOVERNO DO ESTADO
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E EDUCAÇÃO SUPERIOR