

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS PRODUTORAS DE ESBL EM AMOSTRAS ANIMAIS

Luana de Oliveira Silva, Theresse Camille Nascimento Holmström, Ana Carla dos Santos Pereira, Letícia Baptista Pinto, Mario Tatsuo Makita, Dayanne Araújo de Melo, Miliane Moreira Soares de Souza.

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)/Instituto de Veterinária, Rodovia BR 465, KM 7, 23890-000 – Seropédica-RJ, Brasil, luana.oliveira2001@outlook.com, theresseholmstrom@yahoo.com.br, anacarasantospereira17@hotmail.com, lebp.bio@hotmail.com, tatsuomakita@gmail.com, daymelo.com@gmail.com, milianemss@gmail.com.

Resumo

Em bactérias Gram-negativas é possível observar uma crescente disseminação de genes de resistência. Alguns desses genes caracterizam a produção de Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBL), capazes de hidrolisar antimicrobianos Beta-Lactâmicos, inativando-os. A partir de análises fenotípicas, amostras de bactérias Gram-Negativas foram analisadas e seu perfil de resistência foi caracterizado, a fim de identificar a presença de genes que codificam perfis de resistência. A presença de cepas resistentes encontradas no estudo demonstra que a disseminação da resistência antimicrobiana se tornou uma emergência mundial em um contexto de Saúde Única, devido principalmente ao uso indiscriminado de antimicrobianos em ambientes humanos, veterinários e de produção animal.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana. Beta-Lactamase de Espectro Estendido.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas - Microbiologia

Introdução

As bactérias Gram-negativas (BGN) são responsáveis por grande parte das infecções nosocomiais que acometem os seres humanos e animais atualmente (MOTA; OLIVEIRA; SOUTO, 2018). Seus componentes estruturais garantem sua sobrevivência, podendo conferir resistência intrínseca à determinadas classes de antimicrobianos e favorecendo a interação com o tecido hospedeiro, o que permite a evolução da infecção. Os antimicrobianos se tornaram uma revolução no tratamento de doenças infecciosas de origem bacteriana, porém, o uso indiscriminado destes fármacos, muitas vezes relacionado a práticas inadequadas na agropecuária e prescrições inapropriadas na medicina humana e veterinária, contribui consideravelmente para o aumento da pressão seletiva que acelera o processo de disseminação de mecanismos de resistência entre bactérias no ambiente. Alguns desses mecanismos estão associados à produção das enzimas Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBL), responsáveis por hidrolisar o anel beta-lactâmico dos antimicrobianos Beta-lactâmicos, considerada a classe mais utilizada clinicamente em infecções, composta por: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (MACEDO, 2016).

A resistência antimicrobiana tem se tornando uma emergência mundial em um contexto de Saúde Única, visto que, além da resistência intrínseca, os mecanismos de resistência adquirida contribuem para uma limitação das opções terapêuticas no tratamento das infecções na medicina humana e veterinária. Desta forma, algumas espécies de bactérias Gram-Negativas, como *Acinetobacter baumannii* e *Escherichia coli*, já estão listadas como superbactérias de nível crítico pela Organização Mundial da Saúde.

O presente estudo busca identificar e caracterizar cepas Gram-Negativas produtoras de ESBL em amostras animais de companhia e de produção e seu respectivo perfil de resistência.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Metodologia

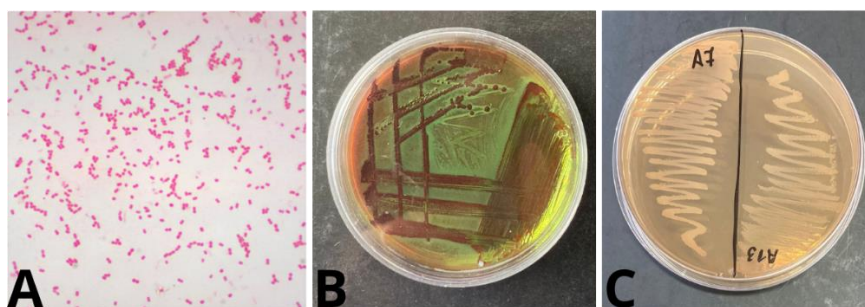
CEUA: 6239180418

Para o desenvolvimento do presente estudo, foram analisadas 181 amostras, sendo 165 oriundas de diferentes processos infecciosos em animais de companhia e 16 oriundas de swabs retais de coelhos saudáveis. O isolamento e identificação fenotípica foram realizados de acordo com Koneman e colaboradores (2018). As amostras foram semeadas em Ágar sangue de carneiro 5%, um meio enriquecido que visa o crescimento e isolamento primário das bactérias presentes. O meio com a amostra inoculada foi deixado por 24h em estufa bacteriológica a 35°C. Após o período estipulado, as colônias foram identificadas através dos testes presuntivos, compostos por coloração de Gram, prova da catalase e Hidróxido de potássio (KOH) 3%. A coloração de Gram foi utilizada para visualização macroscópica das bactérias, além de permitir uma separação em dois grandes grupos: bactérias Gram positivas e Gram negativas. Nos casos em que a visualização microscópica foi inconclusiva, o teste KOH 3% foi realizado para confirmação. Bactérias Gram positivas foram direcionadas para a prova da catalase. As bactérias identificadas primariamente como Gram negativas foram repicadas para isolamento em Ágar MacConkey ou Ágar EMB (meios seletivos para BGN). Após 24h em estufa bacteriológica a 35°C foi possível analisar, a partir do crescimento, se houve ou não fermentação da lactose. As cepas isoladas foram direcionadas para uma série de testes bioquímicos que permitem a identificação fenotípica a nível de gênero. Para as cepas identificadas como fermentadoras, os testes bioquímicos utilizados foram: Citrato, que avaliou a capacidade de utilização do citrato como única fonte de carbono; SIM, que avaliou a produção de gás e indol; Triple Sugar Iron (TSI), que avaliou a capacidade de fermentação de glicose, sacarose e/ou lactose; SIM, que avaliou produção de H₂S, indol e motilidade; Voges Proskauer (VP): que avaliou a utilização da via de fermentação de Butilenoglicol. Para as cepas identificadas como não fermentadoras, os testes bioquímicos utilizados foram: Fita de oxidase, que avaliou a produção da enzima oxidase e Ágar Indol Sulfeto Motilidade (SIM), que avaliou se as colônias eram móveis. A partir dos resultados obtidos em cada prova foi possível realizar uma identificação fenotípica primária.

A última etapa foi a análise fenotípica de resistência e sensibilidade aos antimicrobianos. As cepas isoladas foram suspensas em solução salina com turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland (CLSI VET, 2020). A suspensão foi então inoculada em toda a placa de Ágar Muller Hinton. Para a análise, foram utilizados os seguintes discos de antimicrobianos: Ceftazidima (CAZ 30 µg), Cefoxitina (CFO 30 µg), Cefotaxima (CTX 30 µg), Aztreonam (ATM 30 µg), Cefepime (CPM 30 µg) e Amoxicilina com ácido clavulânico (AMC 30 µg), dispostos a 25mm de distância entre eles (BrCAST 2021). Os antimicrobianos selecionados são padronizados como marcadores de triagem para análise da produção de ESBL (CLSI VET, 2020). O disco de AMC foi disposto ao centro da placa para análise de sinergismo com os antimicrobianos marcadores (cefalosporinas de terceira geração), indicando que a cepa analisada é produtora de ESBL. Após crescimento em estufa bacteriológica por 24h a 35°C, foram medidos os halos de sensibilidade dos discos. Com base nos resultados dos testes bioquímicos e de resistência aos antimicrobianos, foi possível realizar uma identificação fenotípica primária das bactérias Gram Negativas.

Figura 1 - Métodos de Identificação fenotípica de BGN.

- A) Bastonetes Gram Negativos em coloração de Gram. B) Colônia Fermentadora em Ágar EMB. C) Colônia não fermentadora em Ágar MacConkey.

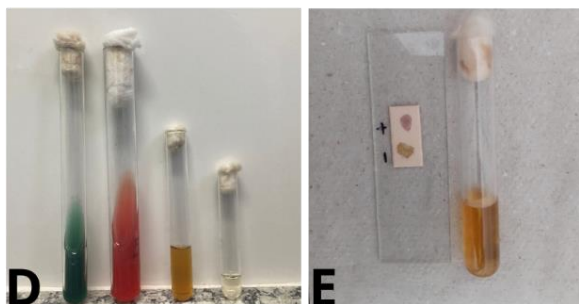


Fonte: As autoras.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

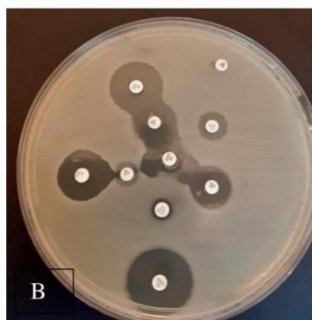
Figura 2 - Métodos de Identificação fenotípica de BGN.

D) Testes bioquímicos: VP, SIM, TSI e Citrato, respectivamente. E) Fita de Oxidase e SIM.



Fonte: As autoras.

Figura 3 - Análise fenotípica de resistência e sensibilidade aos antimicrobianos.



Fonte: As autoras.

Resultados

Das 165 amostras oriundas de processos infecciosos em animais de companhia, foram identificadas 15 cepas Gram negativas, sendo 12/15 (80%) bastonetes fermentadores e 3/15 (20%) bastonetes não fermentadores. A partir das amostras de cunicultura foram identificados seis bastonetes gram-negativos, sendo 6/6 (100%) *E. coli*. O perfil de resistência fenotípica revelou duas cepas que apresentam perfil de produção de ESBL, já que apresentaram a formação de uma zona fantasma entre os halos de AMC e um ou mais discos de antimicrobianos marcadores no antibiograma. Estas cepas produtoras de ESBL são pertencentes às amostras oriundas de swab retal de coelhos saudáveis.

Tabela 1 – Identificação e determinação de resistência das cepas Gram-Negativas das amostras animais avaliadas

Origem das amostras	Gram negativos Fermentadores	Gram negativas não fermentadores	Produção de ESBL
Animais de companhia	12	3	0
Cunicultura	6	0	2

Fonte: As autoras.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Discussão

Nas análises fenotípicas das amostras animais de companhia, 16 cepas foram identificadas como bastonetes Gram Negativos. Estas cepas apresentaram algumas divergências de identificação com o padrão avaliado, com variações a nível de gênero. Para mais, a técnica de análise proteômica MALDI-TOF será empregada a fim de confirmar os resultados em novas etapas do trabalho. A maioria dos processos infecciosos nestes animais eram piodermites, que geralmente estão associadas a infecções por *Staphylococcus spp.*, um gênero de bactérias Gram positivas. Neste cenário, bactérias Gram Negativas são isoladas em casos mais raros ou quando há infecções secundárias, já que a barreira da pele é comprometida (MARKUS; SIMONI, 2021). Nas amostras oriundas de swab retal de coelhos, a técnica de MALDI-TOF foi realizada para confirmação dos resultados. Nestas amostras, é comum encontrar espécies como *E. coli*, já que são bactérias consideradas simbioses e compõem a microbiota intestinal dos animais.

A partir da análise do perfil de resistência das amostras, é possível observar que duas cepas apresentaram a enzima Beta-Lactamase de Espectro Estendido sendo expressa nos testes fenotípicos, oriundas de um ambiente de produção animal (cunicultura). A presença de genes de resistência na microbiota de animais de produção é uma emergência em um contexto de Saúde Única, visto que estudos indicam que o consumo de alimentos de origem animal e excreções como as fezes podem ser fontes de disseminação de bactérias multirresistentes. Além disso, os resultados mostram que apesar da resistência antimicrobiana estar associada a infecções hospitalares no ambiente veterinário, por conta da pressão de seleção positiva, já é possível encontrar genes de resistência em animais saudáveis.

A não detecção dos genes de resistência pesquisados neste trabalho não significa que a bactéria não possua os mesmos, visto que estes genes podem apenas não estar sendo expressos no momento da análise fenotípica. Desta forma, como uma nova etapa deste estudo, faz-se necessário a identificação genotípica através de técnicas como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Conclusão

A disseminação da resistência antimicrobiana traz um alerta sobre a importância da identificação e caracterização de cepas bacterianas no cenário da medicina veterinária, já que há um impacto direto na disponibilidade terapêutica, além de afetar diretamente o ambiente, gerando agravos à saúde humana e animal, em um contexto de Saúde Única. A compreensão da prevalência de bactérias multirresistentes é fundamental para avaliar opções terapêuticas adequadas e projetar estratégias de controle, como a regulamentação rigorosa no uso de antimicrobianos em ambientes como a agropecuária e o desenvolvimento de medidas de conscientização sobre a resistência antimicrobiana para profissionais de saúde humana e veterinária, garantindo o uso responsável de medicamentos.

Referências

KONEMAN, Elmer W.; ALLEN, Stephen. Koneman. **Microbiological diagnosis: Text and Color Atlas**. Ed. médica panamericana, 2018.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 3, p. 601–616, jun. 2011.

ARIAS, M. V. B.; CARRILHO, C. M. D. DE M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 775–790, 15 maio 2012.

REPIK, C. F. et al. A resistência antimicrobiana na produção animal: Alerta no contexto da saúde única. **Pubvet**, v. 16, n. 4, p. 1–6, abr. 2022.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

TENOVER, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6, p. S3–S10, jun. 2006.

NIKAIDO, H. Multidrug Resistance in Bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, n. 1, p. 119–146, jun. 2009.

HOLMSTRÖM, T. C. **Desafios na caracterização e na análise da Resistência antimicrobiana de espécies bacterianas oriundas de diferentes ambientes animais com uma abordagem em Saúde Única**. 2022. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2022.

NOGUEIRA, K. DA S. et al. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated from hospitalized patients in Curitiba, southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, dez. 2006.

MARTINS, A.; SIMONE; PICOLI, U. **Alternative methods for the detection of extended-spectrum-beta-lactamase in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/jbpml/a/sGCRb6hXWFJPY3xGkLCKGTB/?format=pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2023.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC) - Código de Financiamento 001.