
Prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* em águas e superfície

Prevalence of Pseudomonas aeruginosa in water and surface

Glaucia dos Santos¹, Tatiana Elias Colombo¹

¹Curso de Biomedicina da Universidade Paulista, São José do Rio Preto-SP, Brasil.

Resumo

Objetivo – Investigar a prevalência da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de água e superfície anteriormente coletadas em uma empresa privada, localizada no noroeste do estado de São Paulo e determinar a suscetibilidade desse microrganismo frente a diferentes antimicrobianos. **Métodos** – Foram coletadas amostras de água e swab de superfície em um incubatório de matrizes situado no noroeste do estado de São Paulo. Para o isolamento, foram realizadas técnicas de semeadura e posteriormente a técnica de identificação do pigmento piocianina através da luz ultravioleta. Quanto ao perfil de resistência, as cepas foram submetidas a testes de antibiogramas com os antibióticos enrofloxacin, ciprofloxacina, norfloxacina, colistina, sulfametazol e trimetropim, fosfomicina, gentamicina, neomicina, estreptomicina, tetraciclina, doxiciclina, amoxicilina, ceftiofur para verificação da susceptibilidade frente aos antibióticos. **Resultados** – Foram analisadas o total de 402 amostras, sendo que 21 delas apresentaram positividade para *P. aeruginosa*. As amostras analisadas apresentaram resistência ou resistência intermediária a pelo menos uma classe de antimicrobiano testado. **Conclusões** – Os resultados obtidos no presente trabalho mostram a capacidade que a *Pseudomonas aeruginosa* tem de sobreviver em locais úmidos, com condições mínimas de nutrientes, mesmo quando submetida a higienização constante, além do amplo perfil de resistência observado frente aos diversos fármacos empregados no tratamento das infecções causadas por este patógeno.

Descritores: Água; Prevalência; *Pseudomonas aeruginosa*

Abstract

Objective – Investigate the prevalence of the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* in water samples and surface collected earlier in a private company, located in the northwest of the state of São Paulo and determine the susceptibility of this microorganism to different antimicrobials. **Methods** – Water samples and swabs were collected from surface in a hatchery located in the northwestern state of São Paulo. For isolation, seeding techniques were performed to identify the pigment pyocyanin by ultraviolet light. Regarding the resistance profile, the strains were submitted to antibiotic susceptibility test with antibiotics enrofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin, colistin, sulfametazol and trimethoprim, fosfomycin, gentamicin, neomycin, streptomycin, tetracycline, doxycycline, amoxicillin, ceftiofur. **Results** – A total of 402 samples were analyzed, and 21 of them were positive for *P. aeruginosa*. The samples showed resistance or intermediate resistance to at least one class of antimicrobial tested. **Conclusions** – The results obtained in this study show the ability of *Pseudomonas aeruginosa* has to survive in humid, with minimum conditions of nutrients, even when subjected to constant cleaning, in addition to broad resistance profile seen across the various drugs used in the treatment of infections caused by this pathogen.

Descriptors: Water; Prevalence; *Pseudomonas aeruginosa*

Introdução

A veiculação hídrica de agentes etiológicos de caráter infeccioso ou parasitário é responsável pela alta incidência de doenças que afetam as populações de modo geral¹⁻³.

A presença de bactérias do grupo coliforme em água potável tem sido vista como um indicador de contaminação fecal relacionado ao tratamento inadequado ou inabilidade de manter o desinfetante residual na água distribuída⁴. Uma das maiores preocupações para os consumidores é a qualidade da água potável relacionada aos padrões microbiológicos, hoje medida pelo número de coliformes totais e *Escherichia coli*⁵.

No Brasil, a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é considerada padrão em águas de abastecimento por se tratar de bactérias heterotróficas. Através da sua versatilidade metabólica, a *Pseudomonas aeruginosa* teria vantagens sobre os outros gêneros de microrganismos na água⁶.

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é considerada um bacilo gram-negativo, aeróbico, não formador de esporos, pertencente à família *Pseudomonadaceae*. Esse bacilo apresenta-se sozinho, em pares ou em pequenas

cadeias, sendo móvel devido à presença de um ou mais flagelos polares. Essa bactéria produz pigmentos fluorescentes e solúveis em água, como a piocianina e a pioverdina, o que facilita sua identificação. Cresce aerobicamente e não fermenta os carboidratos. No exame direto não é facilmente distinguível de outros bacilos gram-negativos não-fermentadores. Outra característica observada nessa espécie é o odor doce semelhante à uva, proveniente de suas colônias em meios de culturas. Através de meios de triagem e bioquímicos é possível identificar a *P. aeruginosa* por meio de métodos manuais, semi-automatizados e automatizados⁷. Somam-se a essas propriedades sua capacidade de produzir biofilme além do amplo espectro de resistência que estes microrganismos frequentemente apresentam, podendo ser resistentes a diferentes classes de antimicrobianos, inclusive contra cefalosporinas de terceira e quarta gerações, assim como a carbapenêmicos⁸.

A *P. aeruginosa* apresenta uma distribuição cosmopolita, com predileção por ambientes úmidos, sendo encontrada no solo, na água e em humanos. As mínimas necessidades nutricionais contribuem para seu

sucesso ecológico e para seu papel como agente oportunista⁹. Ela é capaz de crescer em água destilada usada para diluir drogas administradas por injeção intravenosa¹⁰. É considerada o segundo agente patogênico mais frequente nas pneumonias nosocomiais, o terceiro nas infecções urinárias, o quarto nas infecções pós-operatórias e o sétimo em septicemias, além de estar relacionada a falhas respiratórias e de morte da maioria dos doentes com fibrose cística¹¹⁻¹⁴. Sendo o objetivo principal do presente trabalho, foi investigar a prevalência da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de água e superfície anteriormente coletadas em uma empresa privada, localizada no Noroeste do estado de São Paulo, assim como determinar a suscetibilidade desse microrganismo frente a diferentes antimicrobianos.

Métodos

A presente pesquisa, dispensada de submissão ao Comitê de Ética por não envolver pesquisas em seres humanos ou animais, apresentou um estudo descritivo, por meio de pesquisa de campo que avaliou os resultados em análise microbiológica de água e *swab* de superfície anteriormente coletadas em uma empresa privada localizada no Noroeste do estado de São Paulo, seguindo como referência o ano de 2013.

As amostras foram coletadas em um incubatório de aves matrizes por se tratar de um ambiente onde não é utilizado nenhum tipo de antimicrobiano e por não apresentar nenhum vínculo com ambiente hospitalar, com o objetivo de avaliar se as cepas isoladas nesse ambiente, mesmo sem nenhum contato com antimicrobianos, possuem ou não resistência aos grupos farmacológicos testados. Os pontos de coletas de água foram: água pia do laboratório (ponto A), água máquina de lavagem bandejas (ponto B), ambas coletadas em saco estéreis. As amostras de *swab* de superfície foram obtidas nos pontos: ventosa inovojet bandeja 1 (ponto C), ventosa inovojet bandeja 2 (ponto D), mesa transferência inovojet (ponto E), umidificador incubadora (ponto F), umidificador nascedouro (ponto G), bandeja de ovos (ponto H), vacinadora coccidiose (ponto I) e entrada de ar salas com ovos ou pintos (ponto J), todas coletadas com auxílio de *swab* umidecido em solução salina 1%, seguindo os padrões internos do controle de qualidade da empresa. Importante ressaltar que não existe nenhum contato desse material com humanos susceptíveis.

As técnicas de cultivo e isolamento do microrganismo *P. aeruginosa* foram realizadas pelo laboratório de controle de qualidade da empresa por meio de semeaduras em meio de cultura seletivo denominado Cetrimide Ágar Base (Difco) com adição de glicerol, incubado em incubadora B.O.D (demanda bioquímica de oxigênio) 37°C ± 1°C, durante um período 48 horas para posterior realização da identificação bacteriana. O resultado das amostras segue o critério de qualificação com somente presença e ausência em 100 mL da amostra¹⁵⁻¹⁶.

As colônias de *P. aeruginosa* hidrolisam a caseína produzindo um pigmento difusível esverdeado (piocianina) visualizado no Cetrimide Ágar Base (Difco). Um dos fatores que facilitam a identificação é o odor característico e adocicado semelhante ao de uva verde, juntamente com a fluorescência apresentada na colônia da bactéria pela composição do pigmento da pioverdina quando submetida a um foco de luz Ultra Violeta (UV), após ter realizado procedimento recomendado o resultado é considerado positivo para *Pseudomonas aeruginosa*¹⁵⁻¹⁶.

O perfil de susceptibilidade dessas amostras foi determinado frente aos antimicrobianos (enrofloxacina, ciprofloxacina, norfloxacina, colistina, sulfametazol + trimetropim, fosfomicina, gentamicina, neomicina, estreptomicina, tetraciclina, doxiciclina, amoxicilina, cefotiofur), por meio de testes de difusão em ágar. Assim, foi realizada uma diluição da bactéria, sendo este semeada em tubos de ensaio contendo solução salina 0,85% utilizando como parâmetro a escala de 0,5 Mac Farland. Em seguida foi feita a semeadura, com a ajuda de *swabs* sobre a superfície do meio de ágar Müller-Hinton (Difco). A etapa seguinte consistiu na colocação dos discos impregnados com antibióticos, fazendo-se leve pressão para permitir o contato entre os mesmos e a superfície do meio. As placas de antibiogramas foram submetidas a uma incubadora B.O.D (Demanda bioquímica de oxigênio) à 37°C, por 24 horas, com posterior leitura de acordo com o diâmetro de sensibilidade apresentado por cada amostra frente aos diversos antimicrobianos utilizados. A interpretação desses resultados foi realizada de acordo com as recomendações do CLSI¹⁷.

Resultados

Foram identificados 21 isolados de *Pseudomonas aeruginosa*: nove dos pontos de coleta E (3), G (3) e J (3); sete do ponto de coleta C; quatro dos pontos F (2) e I (2) e 1 do Ponto D. Nenhum isolado de *P. aeruginosa* foi recuperado nos Pontos A, B e H (Tabela 1).

Quanto ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, 51,14% das amostras de *P. aeruginosa* isoladas no Ponto C, foram resistentes ou apresentaram resistência intermediária a pelo menos três classes diferentes de antimicrobianos (β -Lactâmicos, Tetraciclina e Sulfonamidas) (Tabela 2).

Das sete amostras isoladas no Ponto C, apenas uma apresentou perfil de resistência a todos os grupos de antimicrobianos testados. Para a classe das quinolonas, um (Enrofloxacina) de três antimicrobianos testados apresentou 95,23% do perfil de resistência ou resistência intermediária juntamente ao grupo das sulfonamidas que também apresentaram 95,23% de resistência, além de ser efetivo apenas para um dos isolados positivos (amostra 21, como demonstrado na Tabela 2).

As amostras encontradas nos pontos E (amostra 3) e I (amostra 8) apresentaram alto índice de resistência a seis grupos de antimicrobianos (Tetraciclina, β -Lactâmicos, Aminoglicosídeos, Fosfomicinas, Sulfonamidas e Polimexina E) (Tabela 2).

Tabela 1. Locais de isolamento das amostras analisadas

Amostras	Ponto de coleta	Total de amostras	Amostras Positivas N	%	
Água	A	Água (Pia laboratório)	38	0	0
	B	Água máquina de lavagem bandejas	37	0	0
Swab de superfície	C	Ventosa inovobject bandeja 1	43	7	16
	D	Ventosa inovobject bandeja 2	37	1	2,5
	E	Mesa de transferência inovobject	43	3	7
	F	Umidificador incubadora	43	2	4,5
	G	Umidificador nascedouro	43	3	7
	H	Bandeja de ovos	42	0	0
	I	Vacinadora coccidiose	39	2	5
	J	Entrada de ar (salas com ovos ou pintos)	37	3	8
Total			402	21	5

Fonte: Dados da pesquisa, 2014

Tabela 2. Circunferência dos Halos de sensibilidade ou resistência ao antimicrobianos testados nas amostras isoladas

Amostra	Ponto coleta	Antimicrobianos halos(mm)												
		Eno 5	Cip 5	Nor 10	Cl 10	Szt 25	Fos 200	Gen 10	Neo 30	Est 10	Tet 30	Dox 30	Amo 10	Eft 30
µg/ML														
1	F	22	26	26	12	0	22	24	22	12	12	0	0	10
2	G	10	32	10	12	0	18	22	22	10	0	0	0	0
3	E	22	32	32	14	0	0	26	20	22	0	0	0	12
4	C	16	26	30	0	30	22	20	22	20	0	12	0	22
5	E	16	26	20	0	0	14	0	16	10	0	0	0	0
6	C	16	32	30	12	0	22	22	20	12	0	0	0	12
7	J	20	28	26	12	0	18	20	20	12	18	18	0	0
8	I	16	20	22	0	0	12	20	20	18	16	12	0	0
9	C	14	12	12	0	0	0	12	10	12	0	0	0	0
10	D	20	30	28	12	0	14	20	22	12	12	0	0	0
11	C	22	28	30	12	0	20	18	20	16	0	0	0	16
12	F	12	24	24	12	0	18	18	14	10	0	0	0	0
13	G	20	34	32	12	0	24	18	16	12	12	0	0	10
14	I	20	22	24	12	0	18	24	20	18	18	14	0	10
15	C	22	34	34	12	0	14	18	16	10	10	10	0	10
16	C	18	28	30	12	0	16	18	20	14	0	0	0	10
17	G	22	26	22	12	0	16	18	16	0	0	0	0	0
18	C	12	10	18	12	0	18	20	16	10	0	0	0	22
19	E	20	28	32	14	0	20	20	20	10	0	0	0	0
20	J	20	32	28	12	0	20	20	20	10	0	0	0	0
21	J	24	34	30	12	0	0	22	18	10	10	0	0	10

* A tabela mostra acima a circunferência dos halos de sensibilidade ou resistência aos antimicrobianos Enrofloxacina (Eno), Ciprofloxacina (Cip), Norfloxacina (Nor), Colistina (Cl), Sulfametazol + Trimetopim (Szt), Fosfomicina (Fos), Gentamicina (Gen), Neomicina (Neo), Estreptomicina (Est), Tetraciclina (Tet), Doxiciclina (Dox), Amoxicilina (Am) e Ceftiofur (Eft).
Fonte: Dados da pesquisa, 2014

Os isolados referentes aos pontos de coleta F (amostras 1 e 12), G (amostras 2, 13 e 17) e o ponto J (amostras 7, 20 e 21) apresentaram resistência ou resistência intermediária a quatro classes farmacológicas Sulfonamidas, Aminoglicosídeos, Tetraciclina e os β-Lactâmicos, sendo efetivo apenas para o grupo das Fosfomicinas, Polimexinas e para dois (Ciprofloxacina e a Norfloxacina) de três antimicrobianos testados do grupo das Quinolonas. Já o ponto de coleta D (amostra 10) foi sensível apenas para o grupo das Polimexinas e Quinolonas e não foi efetivo para os demais grupos de antimicrobianos Sulfonamidas, Tetraciclina, β-Lactâmicos, Fosfomicinas, Aminoglicosídeos (Tabela 2).

Discussão

Tendo em vista que *Pseudomonas aeruginosa* apresenta tolerância a uma ampla variedade de condições físicas, é responsável por diferentes infecções comunitárias e hospitalares, cuja gravidade é amplamente reconhecida¹⁸⁻¹⁹.

Pseudomonas aeruginosa foi identificada em 5,22% das amostras analisadas no presente estudo, resultado semelhante ao estudo realizado no Estado do Paraná²⁰, no qual observou a presença de *Pseudomonas aeruginosa* em 10,41% das amostras de água potável analisadas, incluindo 23,53% das amostras do sistema de água secundário e 8,56% das amostras do sistema de água

principal; as *P. aeruginosa* isoladas foram testadas para sensibilidade ao cloro livre e sobreviveram a uma concentração de cloro três vezes acima da concentração mínima usada. Baseando-se neste achado, foi recomendada, no Estado do Paraná, a determinação periódica de *Pseudomonas* em adição aos dados rotineiramente coletados na maioria dos sistemas de abastecimento.

O trabalho realizado por Feltman e colaboradores²¹, analisou N isolados de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes do ambiente hospitalar, assim como de amostras clínicas provenientes de aspirado traqueal de pacientes submetidos a ventilação mecânica, escarro de pacientes com fibrose cística, além do sangue, urina e feridas, achado laboratorial também presente em diversos outros estudos além do fato de alguns demonstrarem uma grande resistência aos antibióticos testados, dados que mostram a necessidade de implementar ações para a diminuição dos índices dessas infecções²¹⁻²³.

Maia e colaboradores¹⁹, analisando cepas isoladas de frangos e peixes, observaram resistência a algumas drogas como a Amoxicilina/ácido clavulânico, Tetraciclina, Sulfametoxazol-Trimetoprim, Cloranfenicol, dentre outras usualmente eletivas, de uso parenteral ou tópico no tratamento de infecções por *P. aeruginosa*.

No estudo realizado por Fuentes e colaboradores⁸, foi observada resistência a carbapenênicos em amostras de água do Rio Passo Fundo, embora o fenótipo de multiresistência não tenha sido observado.

Além de substâncias antimicrobianas e desinfetantes, bactérias resistentes também são excretadas por seres humanos e lançadas no efluente, podendo alcançar outros compartimentos ambientais²⁴⁻²⁵. A pressão seletiva exercida pelos antibióticos normalmente presentes no efluente hospitalar é um importante fator de seleção de bactérias resistentes, como as encontradas em alguns dos pontos deste estudo. Por outro lado, existem muitas evidências de que a resistência antimicrobiana já esteja presente em ambientes naturais e que ocorra apenas a troca de genes entre bactérias, fato que também pode estar ocorrendo entre os isolados do presente estudo, uma vez que os principais mecanismos de resistência aos antibióticos onde foi observada resistência são adquiridos e passíveis de transferência horizontal⁸.

Conclusão

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram a capacidade que a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* tem de sobreviver em locais úmidos, com condições mínimas de nutrientes, mesmo quando submetida a higienização constante.

O padrão de resistência encontrado na presente pesquisa está de acordo com a literatura, demonstrando o perfil de resistência da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* frente a diversos fármacos utilizados no tratamento de infecções causadas por este patógeno oportunista. Estes dados permitem questionar se ainda vêm sendo utilizada uma avaliação contínua do perfil de suscetibilidade às diferentes drogas empregadas na terapêutica

humana e veterinária ou ainda em programas de monitoramento, ou se a persistência de genes de resistência a estas drogas se mantém no meio ambiente, inferindo na necessidade de uma avaliação ampla que permita apontar um perfil efetivo em nosso meio.

Referências

1. Barreto EF. Análise microbiológica da água fornecida a unidades de alimentação de regiões administrativas do Distrito Federal. Anuário de Produção de Iniciação Científica Discente. 2009; 7(13):7-15.
2. Macedo JAB. Águas & Águas. Belo Horizonte: Ortofarma, 2000.
3. Siqueira LP, Shinohara NKS, Lima RMT, Paiva JE, Carvalho IT. Avaliação microbiológica da água de consumo empregada em unidades de alimentação. Rev Ciênc Saúde Col. 2010; 15(1):63-6.
4. Lechevallier MW, Welch NJ, Smith DB. Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62:2201-11.
5. Ministério da Saúde (BR), Portaria MS/GM n. 2914, de 12 de dezembro de 2011. Portaria de Potabilidade da Água para consumo humano. Diário Oficial da União. Poder Executivo, Brasília (DF); 12 de dez 2011; seção 1. p. 39-46.
6. Vasconcelos U, Medeiros LV, Andrade MAG, Calazans GMT. Evidência do antagonismo entre *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias indicadoras de contaminação fecal em água. Hig Aliment. 2006;21(140):127-30.
7. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 8. ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
8. Fuentes DB, Ferreira AE, Graf T, Corção G. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41(5): 470-3.
9. Zavascki AP. Fatores de risco para aquisição de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a Imipenem em pacientes hospitalizados [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2003.
10. Favero MS, Carson LA, Bond WW, Petersen NJ. *Pseudomonas aeruginosa* growth in distilled water from hospitals. Science. 1971;173:836-8.
11. Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Ciofu O, Hoiby N, Molin S. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. Nat Rev Microbiol. 2012; 10:841-51.
12. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:582-610.
13. Kanj SS, Sexton DJ. Epidemiology Microbiology and pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infection. Clin Lab Sci. 2011; 24(1):43-6.
14. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WCJ. Diagnóstico microbiológico. Texto e Atlas Colorido. Rio de Janeiro: Medsi; 2001.
15. Kiska DL, Gilligan PH. *Pseudomonas*. In: *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. Washington: ASM Press; 2003.
16. Macfaddin JF. Media for the isolation – cultivation – maintenance of medical bacteria: Baltimore, London: Williams and Wilkins; 1985.

17. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria Isolates From Aquatic Animals; Second Informational Supplement. VET03/VET04-S2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
18. Soares, MCST. Estudo de resistência aos antimicrobianos em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em hospitais da cidade de Niterói-RJ. [Dissertação]. Niterói-RJ: Universidade Federal Fluminense; 2005.
19. Maia AA, Cantisani ML, Esposto EM, Silva WCP, Rodrigues DP, Lázaro NS. Resistência antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* isolados de pescado e de cortes e de miúdos de frango. Ciênc Tecnol Aliment. 2009;29(1):114-9.
20. Guerra NMM, Otenio MH, Silva MEZ, Guilhermetti M, Nakamura CV, Ueda-Nakamura T. Ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* em água potável. Acta Sci Biol Sci. 2006;28(1):13-8.
21. Feltman H, Schulert G, Khan S, Jain M, Peterson L, Hauser AR. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology. 2001; 147:2659-69.
22. Silva NFV, Kimura CA, Coimbra MVS. Perfil de sensibilidade antimicrobiana das *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes da unidade de tratamento intensiva de um hospital público de Brasília. Revisa. 2012;1(1):19-24.
23. Polotto M, Rubio FG, Nogueira ML, Almeida MTG, Nogueira MCL. Detection of *P. aeruginosa* harboring bla. BMC Infect Dis. 2012;12:176-97.
24. Kümmerer K. Resistance in the environment. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2004;54:311-20.
25. Kummerer K, Henninger A. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. Clinical Microbiology and Infection. 2003;9(12):1203-14.

Endereço de correspondência:

Tatiana Elias Colombo
Av. Juscelino Kubitschek de Oliveira, s/nº – Jd. Tarrá II
São José do Rio Preto-SP, CEP 15091-450
Brasil

E-mail: taty_ec@hotmail.com

Recebido em 5 de maio de 2015
Aceito em 17 de novembro de 2015