

## DETECÇÃO DE *Staphylococcus aureus* COM RESISTÊNCIA INDUZIDA À CLINDAMICINA EM AMOSTRAS COLETADAS DE UMA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO EM DIVINÓPOLIS- MG.

Sílvia Letícia de Oliveira Toledo<sup>1\*</sup>, Letícia Gonçalves Resende Ferreira<sup>2</sup>, Magna Cristina de Paiva<sup>3</sup>

1. Estudante de IC do curso de Farmácia da UFSJ

2. Laboratório de Diagnóstico e Microbiologia Clínica da UFSJ

3. Laboratório de Diagnóstico e Microbiologia Clínica da UFSJ/ Orientadora

### Resumo:

*Staphylococcus aureus*, um importante patógeno humano, possui ampla distribuição e é capaz de desenvolver resistência aos antimicrobianos. Eritromicina e clindamicina são opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus*. No entanto, a aquisição do gene de resistência *erm*, pode comprometer a utilização clínica destes compostos. Estudos que investigam a presença de *S. aureus-erm*-positivo no ambiente são escassos. Este estudo teve como objetivo investigar, por método fenotípico, a presença de *S. aureus*-clindamicina-resistente por abrigarem o gene *erm*, em amostras de esgoto bruto e efluente coletadas em uma estação de tratamento de esgoto. Um total de 35 isolados de *S. aureus* foi recuperado, sendo os do esgoto mais sensíveis à eritromicina e clindamicina. *S. aureus* com resistência induzida à clindamicina foi detectado apenas no esgoto. Este estudo alerta para a presença de *S. aureus* resistente à eritromicina e clindamicina circulando nesse ambiente.

**Autorização legal:** A Companhia de Saneamento de Minas Gerais (Copasa) autorizou a coleta.

**Palavras-chave:** *S. aureus*; resistência induzida à clindamicina; esgoto bruto.

**Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição:** Universidade Federal de São João Del-Rei (UFSJ).

### Introdução:

No gênero *Staphylococcus* há espécies potencialmente patogênicas aos seres humanos e animais, destacando-se o *S. aureus*, que é responsável por infecções de pele, pneumonias, abscessos, endocardites, bacteremia, dentre outras. Além disso, é um agente frequente de infecções nosocomiais e comunitárias, que podem resultar em altos

índices de morbidade e mortalidade (KONEMAN *et al.*, 2008).

Para tratar infecções causadas por *S. aureus* são utilizadas várias classes de antimicrobianos, tais como os macrolídeos (eritromicina), lincosamidas (clindamicina) e glicopeptídeos. A eritromicina (ERI) e a clindamicina (CLI) são importantes opções terapêuticas no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* multirresistentes (DECK; WINSTON, 2014). No entanto, vários estudos têm descrito a emergência de *S. aureus* resistentes à ERI e CLI devido à aquisição do gene *erm* (do inglês, *erythromycin methionine methylase*) (GELATTI *et al.*, 2009). Vale ressaltar que esse gene codifica a resistência à ERI e pode induzir resistência à CLI. Considerando o diagnóstico laboratorial, o gene *erm* não é detectado por métodos convencionais. O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) preconiza sua detecção mediante a realização do D-teste, o qual evidencia *in vitro* a indução da resistência à CLI.

Segundo Basso e colaboradores (2014), a pesquisa da resistência induzida à CLI é amplamente realizada em isolados clínicos de *S. aureus*, porém são raros os estudos que avaliam a presença de *S. aureus-erm*-positivo em amostras de origem ambiental. As bactérias que colonizam ou infectam humanos e animais, chegam ao meio ambiente por meio de suas excretas, as quais são descarregadas nos esgotos, assim como os metabólitos ativos dos antimicrobianos, favorecendo a pressão seletiva sobre a comunidade bacteriana local (KÜMMERER, 2009). Em uma estação de tratamento de esgoto (ETE) estima-se a presença de vários microrganismos, dentre os quais membros da família *Staphylococcaceae*, possivelmente apresentando resistência aos antimicrobianos, incluindo a resistência induzida à CLI (GOLDSTEIN *et al.*, 2012; NAQUIN *et al.*, 2015).

No contexto da infecção, deve ser considerado o intercâmbio clínico-ambiente

dos microrganismos, além do potencial de disseminação da resistência bacteriana. Assim, este trabalho teve como objetivo investigar a presença de *S. aureus* com resistência induzida à CLI em amostras obtidas em uma ETE, o que poderá contribuir para medidas de controle da disseminação da resistência bacteriana.

### Metodologia:

A área de estudo foi a Estação de Tratamento de Esgoto do Rio Pará, situada no município de Divinópolis - MG, a qual adota o sistema de tratamento de lodos ativado convencional e trata cerca de 10% do esgoto gerado pela população.

Foi coletado um litro de esgoto bruto (EB) e de efluente (EF) em frascos de polipropileno com tampa de rosca previamente esterilizados. Os frascos foram transportados em gelo até a análise no Laboratório de Microbiologia Clínica no Campus Centro-Oeste da UFSJ.

Para a quantificação de *S. aureus* nas amostras de EB e EF, um mL de cada amostra foi usado para realizar a diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) em soro fisiológico estéril. 100  $\mu$ L de cada diluição foram inoculados no meio Ágar Hipertônico Manitol (LabM®), em duplicata, com auxílio de uma alça de Drigalski. Todas as placas foram incubadas à 37°C por 18-24 horas. Posteriormente, as placas que apresentaram crescimento de 20 a 200 colônias foram selecionadas e quantificadas por Silva e colaboradores (2015) - dados não publicados. Colônias apresentando coloração amarela, que indica a capacidade de fermentar o Manitol, foram selecionadas para a identificação final da espécie.

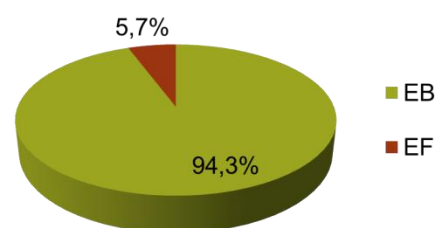
Para a identificação de *S. aureus*, inicialmente foi realizada uma análise macroscópica das colônias, seguida por avaliação morfo-tintorial utilizando a coloração de Gram, testes da produção de coagulase e Dnase (KONEMAN *et al.*, 2008). Após a identificação, as colônias foram transferidas para o Caldo Infuso de Cérebro e Coração (BHI, do inglês, *Brain Heart Infusion Broth*) (Lab M®) e incubadas à 37°C por 18-24 horas. Posteriormente foi acrescido glicerol e armazenados à -20°C.

Para o teste de resistência induzida à CLI, foi realizado um inóculo a partir das colônias em caldo BHI equivalente à escala 0,5 do padrão de McFarland ( $10^8$  UFC/mL). Utilizando swab estéril, o inóculo foi semeado cuidadosamente por toda a superfície do Ágar Mueller Hinton (Alere®) distribuído em placas de 150 mm. Posteriormente, os discos de ERI 15  $\mu$ g (Sensidisc®) e CLI 2  $\mu$ g (Sensidisc®)

foram testados seguindo as orientações do CLSI (2015) para a realização do D-teste. Todas as placas foram incubadas à 35°C  $\pm$  2°C por 16-18 horas. Após incubação, os isolados que apresentaram um achatamento do halo adjacente ao disco de CLI, com a forma da letra D, foram considerados como D-teste positivos e reportados como resistentes à CLI. As zonas de inibição ao redor dos discos foram medidas com régua milimetrada e os critérios de interpretação seguiram o CLSI (2015), o qual considera que para a ERI, o isolado com halo de inibição com diâmetro  $\geq 23$  mm é classificado como sensível; 14-22 mm como intermediário e  $\leq 13$  mm como resistente. Para a CLI, halos de inibição com diâmetro  $\geq 21$  mm, o isolado é classificado como sensível; 15-20 mm como intermediário e  $\leq 14$  mm como resistente. Foi utilizada como controle negativo a cepa de *S. aureus* ATCC 29213.

### Resultados e Discussão:

Um total de 35 isolados de *S. aureus* (33/94,3% do EB e 02/5,7% do EF) foi recuperado das amostras coletadas (Figura 1). Considerando as amostras estudadas, o número de *S. aureus* recuperado foi pequeno. Porém é importante destacar que, atualmente, a ETE do Rio Pará trata menos da metade do EB produzido em Divinópolis, de modo que este número poderia ser ainda mais representativo caso todo o esgoto do município fosse submetido ao tratamento.



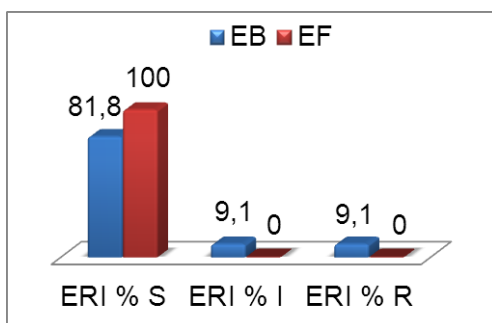
**Figura 1:** Percentual dos *S. aureus* isolados das amostras de esgoto bruto (EB) e efluente (EF), coletadas na ETE do Rio Pará, em Divinópolis - MG.

Segundo Metcalf e Eddy (2015), no esgoto doméstico é encontrada uma grande variedade de bactérias, incluindo patogênicas, sobretudo bactérias Gram negativas que habitam o trato gastrointestinal humano e são rotineiramente eliminadas nas fezes. Entretanto, o presente estudo evidencia que as bactérias Gram positivas potencialmente patogênicas como o *S. aureus*, também podem ser encontradas nas águas residuais. No Brasil, são escassos os estudos que investigam a presença de *Staphylococcus* spp.

em amostras não clínicas. Uma revisão bibliográfica sistemática de Nascimento e Araújo (2014), no qual constam 21 artigos sobre a resistência bacteriana aos antimicrobianos em ambientes aquáticos brasileiros, mostrou que 71,4% desses trabalhos investigavam apenas bactérias Gram negativas.

Foi verificado no presente trabalho um pequeno número de isolados de *S. aureus* no EF, semelhante ao encontrado em estudos prévios que mostram a redução de bactérias patogênicas em amostras pós-tratamento de esgoto (BÖRJESSON *et al.*, 2010; NAQUIN *et al.*, 2014; PAIVA *et al.*, 2015). A redução de *S. aureus* no EF aqui observada é atribuída possivelmente ao sistema de tratamento de esgoto utilizado, sugerindo a eficiência do lodos ativado convencional na remoção dessas bactérias. Luddeke e colaboradores (2015), em um trabalho realizado em uma estação de tratamento de esgoto na Alemanha, também verificaram redução no total de *S. aureus* após tratamento do esgoto por lodos ativado e concluíram que esse fato se deve possivelmente a sedimentação das bactérias absorvidas pelas partículas de lodo.

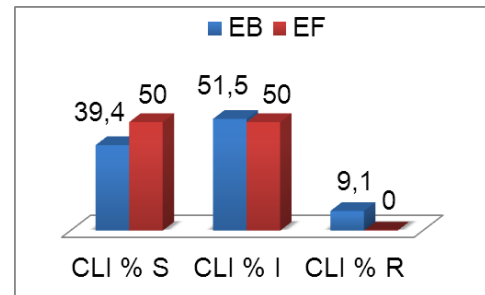
Para detecção da resistência induzida à CLI, foi realizado o D-teste em todos os isolados de *S. aureus*. Simultaneamente, foi realizada a determinação do perfil de susceptibilidade à ERI e CLI. O gráfico da Figura 2 mostra o perfil de susceptibilidade dos *S. aureus* recuperados das amostras de EB e EF, em relação à ERI. Uma alta sensibilidade à ERI foi observada nos isolados, tanto de EB quanto de EF.



**Figura 2:** Perfil de susceptibilidade à eritromicina (ERI) dos *S. aureus* isolados das amostras de esgoto bruto (EB) e efluente (EF). S: sensível; I: intermediário; R: resistente.

O gráfico da Figura 3 mostra o perfil de susceptibilidade dos *S. aureus* recuperados das amostras de EB e EF, em relação à CLI. Deve ser ressaltado que não foram encontrados *S. aureus* resistentes a este antimicrobiano no EF. No entanto, 50% ou

mais dos isolados de EB e EF apresentaram susceptibilidade intermediária à CLI.



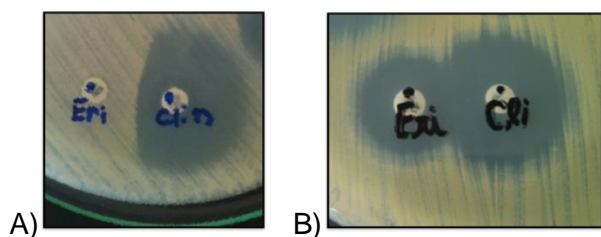
**Figura 3:** Perfil de susceptibilidade à clindamicina (CLI) dos *S. aureus* isolados das amostras de EB (esgoto bruto) e EF (efluente). S: sensível; I: intermediário; R: resistente.

Ao contrário dos dados deste trabalho, Basso e colaboradores (2014) verificaram alta taxa de resistência à eritromicina (37,5%) em isolados de *Staphylococcus* spp. Além disso, 12,5% desses isolados foram resistentes à clindamicina, similar ao encontrado no presente estudo (9,1%). Uma possível explicação para esses achados poderia ser a origem das amostras, uma vez que estes autores trabalharam com águas de rios da cidade de Porto Alegre - RS, Brasil. A presença de compostos antimicrobianos no ambiente aquático pode interferir na resistência bacteriana. Xu e colaboradores (2007) relataram a ocorrência de resíduos de macrolídeos e outros antimicrobianos em estações de tratamento de esgoto da China, tanto em amostras de esgoto quanto de efluente. Isso sugere que a presença de *S. aureus* resistentes à eritromicina e clindamicina pode estar relacionada à pressão seletiva exercida pelos resíduos destes compostos descarregados neste ambiente.

Um dado importante do presente trabalho é que os isolados do EF foram sensíveis à ERI e CLI. Esse achado, em conjunto com a redução do número de *S. aureus* nesta amostra, reforçam a eficácia do tratamento de esgoto por lodos ativado convencional na remoção de patógenos resistentes, como também sugerido por Luddeke *et al.* (2015).

Quanto à resistência induzida à CLI, foi observado que apenas dois isolados de *S. aureus* (5,7%) apresentaram resultado positivo para o D-teste (Figura 4A). Deve ser ressaltado que esses isolados foram recuperados do EB e indicam a expressão do fenótipo MLSBi, atribuída à presença do gene *erm*, no qual a ERI induz resistência à CLI (AMORIM *et al.*, 2009; MONTROYA *et al.*, 2009). Estudos nacionais investigando a

resistência induzida à CLI em *S. aureus* recuperados de amostras coletadas em ETE não foram encontrados na literatura pesquisada. Coutinho e colaboradores (2014) investigaram a presença de bactérias resistentes, incluindo *S. aureus*, em diferentes ambientes aquáticos na cidade do Rio de Janeiro - Brasil, porém não avaliaram a resistência induzida à CLI. Mas, Nanquin e colaboradores (2015) identificaram a presença de genes de resistência (*erm B* e *mec A*) em *S. aureus* recuperados de esgoto bruto e efluente em estações de tratamento de esgoto nos Estados Unidos. Como a maioria dos trabalhos investiga a resistência induzida à CLI em *S. aureus* de origem clínica, tais como sangue, secreção nasal, pele, abscessos e urina, alguns dados aqui encontrados foram comparados aos desses isolados. Por exemplo, os estudos de Amorim e colaboradores (2009), Coutinho e colaboradores (2010) mostraram que 6,12% e 3,3% dos *S. aureus*, respectivamente, apresentaram o fenótipo de resistência induzida à clindamicina, o que é similar ao achado neste estudo.



**Figura 4:** Teste de resistência induzida à CLI (D-teste). A) D-teste positivo em isolado da amostra de esgoto bruto (EB); B) D-teste negativo para a cepa controle *S. aureus* ATCC 29213.

Ainda no presente estudo, foi detectado um isolado de *S. aureus* resistente à ERI com susceptibilidade intermediária à CLI e D-teste negativo. Esse fato constitui um importante alerta para a presença de mecanismos de resistência diversos em *S. aureus* recuperados de ETEs. Segundo as descrições da literatura, a resistência à ERI neste isolado não é atribuída à presença do gene *erm*, podendo estar envolvidos outros mecanismos, tais como a inativação enzimática do fármaco e o efluxo ativo.

### Conclusões:

Neste estudo foi observada a presença de *S. aureus* em amostras de EB e EF, mas uma redução desses microrganismos após o tratamento do esgoto. Além disso, isolados resistentes à ERI e CLI foram encontrados

apenas no EB. Esses achados sugerem que o tratamento de esgoto pelo processo de lodos ativado adotado pela ETE do Rio Pará foi efetivo na remoção destes microrganismos.

Considerando que o EF das ETEs é descarregado em cursos d'água e o possível intercâmbio clínico-ambiente dos microrganismos, o achado de *S. aureus*, sobretudo resistente à ERI e CLI aqui reportado, alerta para a necessidade de adoção de medidas de controle da disseminação destes microrganismos.

### Referências bibliográficas

AMORIM, D.M.R.; PERSON, O.C.; AMARAL, P.J.; TANAKA, I.I. Resistência induzível à clindamicina entre isolados de *Staphylococcus aureus*. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 4, n. 33, p. 401-405, 2009.

BASSO, A.P.; MARTINS, P.D.; NACHTIGALL, G.; SAND, S.V.D.; MOURA, T.M.; FRAZZON, A.P.G. Antibiotic resistance and enterotoxin genes in *Staphylococcus* sp. isolates from polluted water in Southern Brazil. **An. Acad. Bras. Cienc.**, Porto Alegre, v. 86, n. 4, p. 1813-1820, May. 2014.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; **Twenty-Fifty Informational Supplement**. Approved standard M100-S25, v. 35, n. 3, 2015.

KONEMAN, E.W.; WINN JÚNIOR, W.C.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; PROCOP, G.W.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WOODS, G.L. **Koneman, diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1565 p.

METCALF, L.; EDDY, H.P. **Tratamento de Efluentes e Recuperação de Recursos**. 5.ed. São Paulo: McGraw Hill Education, 2015. 2008p.

NAQUIN, A., SHRESTHA, A., SHERPA, M., NATHANIEL, R., BOOPATHY, R. Presence of antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant in Thibodaux, Louisiana, USA. **Bioresource Technology**, v. 188, p. 79-83, Jan. 2015.

PAIVA, M.C.; ÁVILA, M.P.; REIS, M.P.; SILVA, P.C.; NARDI, R.M.D.; NASCIMENTO, A.M.A. The Microbiota and Abundance of the Class 1 Integron-Integrase Gene in Tropical Sewage Treatment Plant Influent and Activated Sludge. **Plos One**, p. 1-12, 2015.