

PERFIL DE DNA PLASMIDIAL EM BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS ISOLADAS DO RIBEIRÃO PACIÊNCIA – PARÁ DE MINAS-MG

Juliana Gonçalves de Araújo¹
Elaine Maria Guimarães Alves¹
Marcelo de Paiva Bechtluft²

Resumo:

Bactérias são organismos simples, procarióticos, que contêm um cromossomo principal e podem ou não conter plasmídeos. Podemos encontrá-las em quase todos os ambientes, até mesmo em elevadas temperaturas, como nos gêiseres, ou na profundidade dos oceanos. Os plasmídeos são moléculas de DNA circulares ou lineares, presentes em muitas espécies de bactérias. Os plasmídeos se replicam junto com a bactéria quando ela se divide por fissão binária ou de forma independente dentro da bactéria. Os plasmídeos são importantes para as bactérias: podem acarretar vantagens de crescimento, possibilitar a sobrevivência da bactéria em condições ambientais diversas, bem como a resistência dela a drogas agressivas, metais pesados como mercúrio e toxinas celulares. Neste trabalho, coletaram-se bactérias de um curso d'água localizado em Pará de Minas – MG (o Ribeirão Paciência), selecionando bactérias gram-negativas, resistentes aos antibióticos penicilina, ampicilina, vancomicina, clorafenicol, eritromicina e tetraciclina para extração de DNAs plasmidiais, que apresentaram plasmídeos característicos quanto à resistência aos antimicrobianos. Todas as bactérias isoladas do ribeirão apresentaram plasmídeos, sugerindo sua importância para a sobrevivência em um ambiente de esgoto. Um resultado interessante foi a resistência das bactérias isoladas a seis antimicrobianos, sendo cinco de uso comum e normalmente prescritos em postos de saúde de Pará de Minas.

Palavras-chave: Bactérias, plasmídeos, resistência, antibióticos.

1. INTRODUÇÃO

A seleção de bactérias resistentes a antibióticos vem se destacando como um problema de saúde pública, em que a velocidade de disseminação dos genes de resistência tem se mostrado maior que a capacidade da biotecnologia em produzir novos agentes antimicrobianos efetivos capazes de driblar os mecanismos de resistência. O ambiente hospitalar se destaca como o principal ponto de seleção de bactérias resistentes, em função do grande uso de antibióticos, especialmente os de última geração. A emergência de

¹ Alunas do curso de Ciências Biológicas da Faculdade de Pará de Minas – FAPAM

² Orientador e Professor de Genética, Bioquímica e Imunologia do Curso de Ciências Biológicas da Faculdade de Pará de Minas - FAPAM

bactérias resistentes nesses ambientes tem sido motivo da realização de vários trabalhos científicos (CASTRO et al., 2002; FURTADO et al., 2005; MELO et al., 2005).

A utilização de antibióticos na comunidade também contribui para a proliferação de bactérias resistentes, apesar de o uso de antibióticos de última geração na comunidade ser muito baixo (BERQUÓ et al., 2004). Deve-se destacar a importância de drogas de uso comum, como a penicilina, eritromicina e tetraciclina, dentre outras, das quais depende boa parte da população. Estudos mostram que mais da metade das prescrições de antibióticos, principalmente para doenças respiratórias, são desnecessárias, pois a maioria tem etiologia viral e que o consumo de antimicrobianos na população em geral é alto (BRICKS, 2003; BERQUÓ et al., 2004).

Os mecanismos de resistência bacteriana sempre refletem mudanças genéticas que podem ser classificadas como intrínsecas, ou seja, da própria da espécie, ou adquiridas, ou seja, resultantes de mutações ou alguma forma de transferência gênica (ALTERTHUM e TRALULSI, 2004).

A transferência gênica entre bactérias ocorre, principalmente, por conjugação e por transdução, que permitem a passagem de material genético para indivíduos da mesma espécie, de espécies diferentes e até mesmo de gêneros diferentes (GRIFFITHS, 2000).

Aqui, destaca-se a importância dos plasmídeos nesse processo, através da conjugação; portando o fator de transferência F e o fator de resistência R podem ser transferidos com facilidade e podem se combinar formando super plasmídeos que portam genes de resistência para várias drogas, levando bactérias à multir-resistência (CASE, FUNKE, TORTORA, 2000).

A identificação desses plasmídeos e das bactérias que os possuem pode representar uma ferramenta de comparação entre diversos ambientes aquáticos, provendo um maior conhecimento sobre sua evolução e ecologia (MEIRELES-PEREIRA et al., 2002).

O lançamento de dejetos provenientes das residências, dos hospitais e da atividade industrial e agropecuária pode estar contribuindo para a seleção e disseminação de genes de resistência no ambiente. O ambiente poluído por esgoto pode ser favorável à expressão desses plasmídeos e à troca de material genético entre as bactérias pela grande presença de matéria orgânica (BECHTLUFFT, 1999).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de DNA plasmidial bacteriano, referente à resistência antibacteriana, coletando bactérias de um curso d'água extremamente poluído pela descarga de esgoto, traçando um perfil de ocorrência de DNA plasmidial encontrado em bactérias resistentes aos antibióticos penicilina, ampicilina, tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol e vancomicina.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Área de Estudo

Nossa área de estudo compreende o ribeirão Paciência, que corta a cidade de Pará de Minas – MG, dividindo-a ao meio em seu perímetro urbano e rural. O ribeirão nasce na localidade de Pimentas a 1.100 m de altitude e segue de sudeste a noroeste, desaguando no rio São João próximo à cidade de Onça do Pitangui. Ele recebe as águas de vinte e quatro afluentes, sendo oito da margem direita e dezesseis da margem esquerda. As águas do ribeirão Paciência recebem o esgoto da cidade e o esgoto da zona rural onde a atividade econômica predominante é a avicultura (NAIME, 2005).

Coleta de Amostras

As coletas foram realizadas em setembro de 2005 e fevereiro de 2006, no leito do ribeirão Paciência, em seu trecho confrontante com os fundos do *campus* da FAPAM – Faculdade de Pará de Minas, em frasco estéril, observando-se as medidas de segurança necessárias como o uso de luvas e jaleco.

Crescimento Bacteriano

As amostras de água coletadas foram inoculadas em Agar BHI (Acumédia®), preparado conforme orientações do fabricante, na presença de um dos antibióticos: ampicilina, eritromicina ou tetraciclina (CECON) e incubadas em estufa a 37° por 24 horas.

Antibiograma

O antibiograma foi realizado pelo método de difusão com discos de *Bawer e kirby* (modificado pela FDA), descrito em Ribeiro e Soares, 2002. Através desse método, discos

de papel absorventes impregnados com o antibiótico nas concentrações máximas atingidas no sangue são colocados na superfície de um Agar semeado com o microorganismo.

Utilizamos o Agar *Miiler Hinton* (Acumedia®) preparado conforme orientações do fabricante, esterilizado e posteriormente resfriado sobre uma superfície nivelada. O inóculo foi preparado a partir de um crescimento bacteriano em caldo BHI (Acumedia®) diluído em caldo BHI observando-se a escala de 0,5 de *Mac Farland*, que corresponde a aproximadamente $5,0 \times 10^{-5}$ unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/ml).

As placas foram inoculadas com o auxílio de um *swab* de algodão embebido da solução diluída. Os discos dos antibióticos foram então dispostos pela placa e incubados em estufa a 37° C por 24 horas. Os antibióticos utilizados foram: Penicilina (10 µg), Ampicilina (10 µg), Vancomicina (30 µg), Clorafenicol (30 µg), Eritromicina (15 µg) e Tetraciclina (30 µg) industrializados pela empresa Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos (CECON).

A leitura das placas foi feita medindo-se e anotando-se o diâmetro dos halos de inibição em milímetros, incluindo o diâmetro dos discos, com o auxílio de uma régua. A interpretação do tamanho dos halos caracteriza as colônias classificadas como: resistentes, sensíveis e de sensibilidade intermediária.

Extração de DNAs Plasmidiais

Para extração de DNA plasmidial foi utilizado o método de *lise* alcalina descrito por Sambrook et al. (1989), modificado em Bechtluft, (1999) e descrito abaixo:

As bactérias crescidas em caldo BHI por um período de 12 a 24 horas foram colocadas em tubos *ependorfs* com volume de 1,5 ml e centrifugadas por 15 minutos. Após centrifugação, o precipitado foi recuperado, desprezando-se a parte líquida e mantido no gelo sobre a bancada, para evitar a ação de enzimas DNAs. Adicionaram-se então 100 µl da solução I (EDTA 10Mm, TRIS-base 25mM, Glicose 50 mM). Acrescentaram-se 200 µl da solução II (NaOH 0,2 mM, SDS 1%). O tubo foi invertido suavemente algumas vezes. Adicionaram-se 150 µl da solução III (60 % de Acetato de potássio 5M, 11,5 % de Ácido Acético Glacial, 28,5 % de água destilada). Centrifugou-se por 5 minutos e recuperou-se a parte líquida em outro tubo, desprezando o precipitado. Então a solução foi lavada em um volume igual de fenol/clorofórmio. Após centrifugação por 5 minutos, recuperou-se a fase

superior em outro tubo *ependorf*. O DNA plasmidial foi precipitado pela adição de dois volumes de etanol, aproximadamente 1 ml e deixado no congelador *over-nigth*. O DNA plasmidial foi então ressuspinto em 50 µl de tampão TE pH 8,0 (EDTA 1 Mm, TRIS-base 10 Mm).

Quantificação do DNA

Para quantificação do DNA plasmidial foi utilizado o aparelho espectrofotômetro (FENTO 700 S). Aplicou-se 1 µL da amostra de DNA em 0,999 ml de água destilada, registrando os valores de densidade ótica nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. Calculou-se a razão entre esses valores para obter uma estimativa da quantidade de DNA presente na amostra e para avaliação de sua pureza (SAMBROOK et. al., 1989).

Visualização dos Fragmentos de DNA

A visualização do DNA plasmidial foi desenvolvida conforme Sambrook et al. através de eletroforese em gel de agarose, com 10mg/mL de brometo de etídio, preparado a 1%, em tampão TAE (TRIS-acetato 0,4 M e EDTA 1,0 mM).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Crescimento Bacteriano

Foi observado um bom crescimento bacteriano em todos os caldos acrescidos com os antibióticos testados inicialmente: ampicilina, tetraciclina e eritromicina, em que as amostras de água do ribeirão eram incubadas diretamente em caldo BHI contendo um dos antibióticos. As colônias isoladas aleatoriamente das placas foram classificadas como resistentes por apresentarem crescimento na presença dos antibióticos, para melhor extração de DNA plasmidial. As culturas bacterianas foram identificadas e estocadas em 10% de glicerol.

Extrações de DNA Plasmidial

Quando foram feitas extrações de DNA plasmidial e visualização em gel de agarose, foi observado que as bactérias resistentes ao antibiótico ampicilina apresentaram bandas,

com tamanho equivalente a DNA plasmidial, de baixo peso molecular. As bactérias resistentes à eritromicina ou à tetraciclina não mostraram essas bandas. Esse resultado indica uma possível relação entre a resistência à ampicilina e a presença desses plasmídeos, enquanto as resistências à tetraciclina e à eritromicina dessas bactérias podem estar relacionadas a genes cromossomais. Quando foram selecionadas bactérias com resistência conjugada de dois ou três antibióticos percebe-se a presença de DNA plasmidial em todas as extrações, exceto em uma amostra resistente à eritromicina e tetraciclina, conforme a Figura 1.

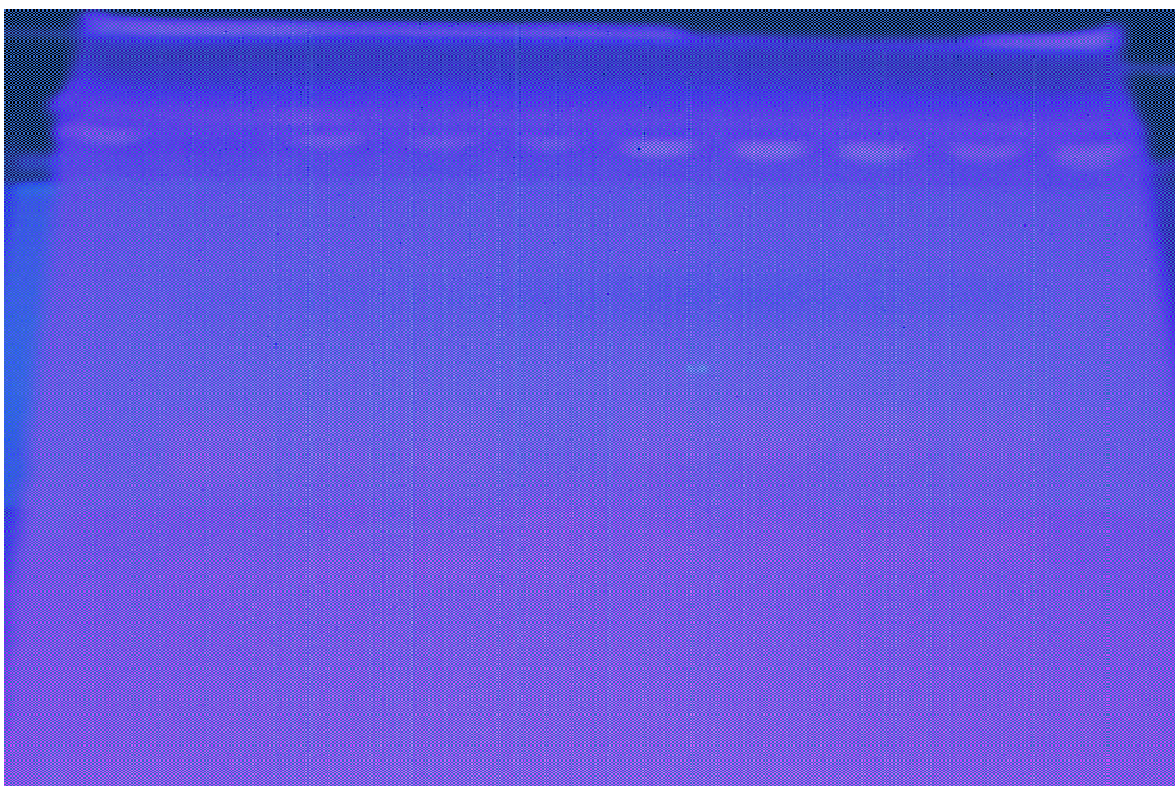


Figura 1: Gel de DNA plasmidial de bactérias resistentes aos antibióticos Ampicilina, Tetraciclina e Eritromicina

A ampicilina é um antibiótico de amplo espectro, indicado para o combate a bactérias negativas e positivas, capaz de penetrar a membrana externa das bactérias Gram-negativas (ALTERTHUM, TRABULSI, 2004). A resistência à ampicilina também pode ter ocorrido por outros motivos como mecanismos de efluxo (MOREIRA,SOUZA,MORAES, 2004), modificações nas porinas que permitem a entrada desse antibiótico ou modificações nas proteínas ligadoras de penicilina, as PBP (Protein Binding Penicilin). Os genes

responsáveis por essas alterações também podem estar presentes em plasmídeos (ALTERTHUM, TRABULSI, 2004).

Os plasmídeos observados podem estar relacionados também à sobrevivência dessas bactérias no ambiente rico em matéria orgânica como o ribeirão de onde foram coletadas. Esse resultado nos mostra que as bandas observadas podem estar associadas a plasmídeos de resistência quando se faz uma comparação com as bactérias resistentes à tetraciclina e eritromicina, em que tais bandas não foram observadas.

Bechtluft (1999), em seu trabalho, descreve uma associação entre o aumento da resistência bacteriana e o aumento do número de plasmídeos em um gradiente de poluição orgânica de uma estação de tratamento. Os resultados do antibiograma com algumas dessas bactérias vêm apoiar a ideia de que a multirresistência é mediada por plasmídeos, pois as bactérias resistentes a um número maior de antibióticos apresentam bandas mais intensas no gel.

Antibiograma

Algumas das amostras de bactérias isoladas foram avaliadas através do antibiograma e os resultados são mostrados no Quadro 1.

	Proteus	Staphylococcus	Bactéria 25	Bactéria 26	Bactéria 2	Bactéria 3
Clorafenicol	Sensível	Sensível	Sensível	Resistente	Intermediário	Sensível
Penicilina	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
Vancomicina	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
Eritromicina	Resistente	Intermediário	Resistente	Resistente	Sensível	Intermediário
Tetraciclina	Resistente	Sensível	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível
Ampicilina	Sensível	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível	Sensível

Quadro 1: Antibiograma das bactérias isoladas do Ribeirão Paciência e a bactéria do acervo do laboratório da FAPAM (*Staphylococcus*).

Foi observado que todas as amostras apresentaram resistência à vancomicina. Para as bactérias Gram-negativas, isto se deve à presença da membrana externa que dificulta a

passagem de moléculas grandes como a vancomicina, limitando seu acesso até seu alvo, o acil-D-alnil-D-alanina na formação da camada de peptidoglicano.

Hoje vários trabalhos têm descrito a resistência de *Enterococcus* e *Staphylococcus* à vancomicina em todo o mundo. Com atenção especial para o *Staphylococcus*, que é o agente de muitas infecções humanas. O *Enterococcus* foi o primeiro a adquirir resistência à vancomicina e temia-se que essa resistência pudesse ser transmitida aos *Staphylococcus*; (ALTERTHUM, TRABULSI, 2004). Fato confirmado *in vitro* nos Estados Unidos (2000) e Pensilvânia (2002) quando *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina foram recuperados de pacientes portando *Enterococcus* com fenótipo Van A (FURTADO et al., 2005).

As bactérias isoladas também apresentaram resistências à penicilina. A resistência dos bacilos Gram-negativos à penicilina também pode ser explicada pela dificuldade de benzilpenicilina em atravessar a membrana externa. A penicilina é indicada para tratamento contra bactérias Gram-positivas, cocos Gram-negativos e espiroquetas (ALTERTHUM, TRABULSI, 2004). A resistência das Gram-positivas à penicilina pode ser explicada pelos mesmos mecanismos relatados anteriormente neste trabalho para a ampicilina, os mecanismos de efluxo (MOREIRA, SOUZA, MORAES, 2004), produção de β -lactamases, modificações nas porinas ou modificações nas proteínas PBP (*Protein Binding Penicilin*). Os genes responsáveis por esses mecanismos são encontrados em plasmídeos (ALTERTHUM, TRABULSI, 2004).

Para o antimicrobiano cloranfenicol foi observado: uma bactéria apresentando resistência e uma demonstrando resistência intermediária. A resistência ao cloranfenicol também pode ocorrer em função de genes portados por plasmídeos, levando à perda da permeabilidade da membrana ou à produção da enzima cloranfenicol-acetil-transferase que acetila a molécula da droga fazendo com que ela perca a afinidade pelo alvo, a sub unidade ribossômica (ALTERTHUM, TRABULSI, 2004).

Um destaque deve ser dado à bactéria de número 3, que cresce pouco em caldo na presença de eritromicina e que no antibiograma mostrou um halo de resistência intermediária. Isto nos leva a pensar que a ação da eritromicina está sendo inibida de alguma forma. Essa bactéria não apresentou bandas de DNA plasmidial.

Foi observado, conforme a Figura 2, em algumas amostras, a presença de bandas com alto peso molecular e nas canaletas, que certamente se trata de DNA cromossomal, e de uma mancha avermelhada ao longo da corrida, provocada pela presença de algum DNA cromossomal degradado.

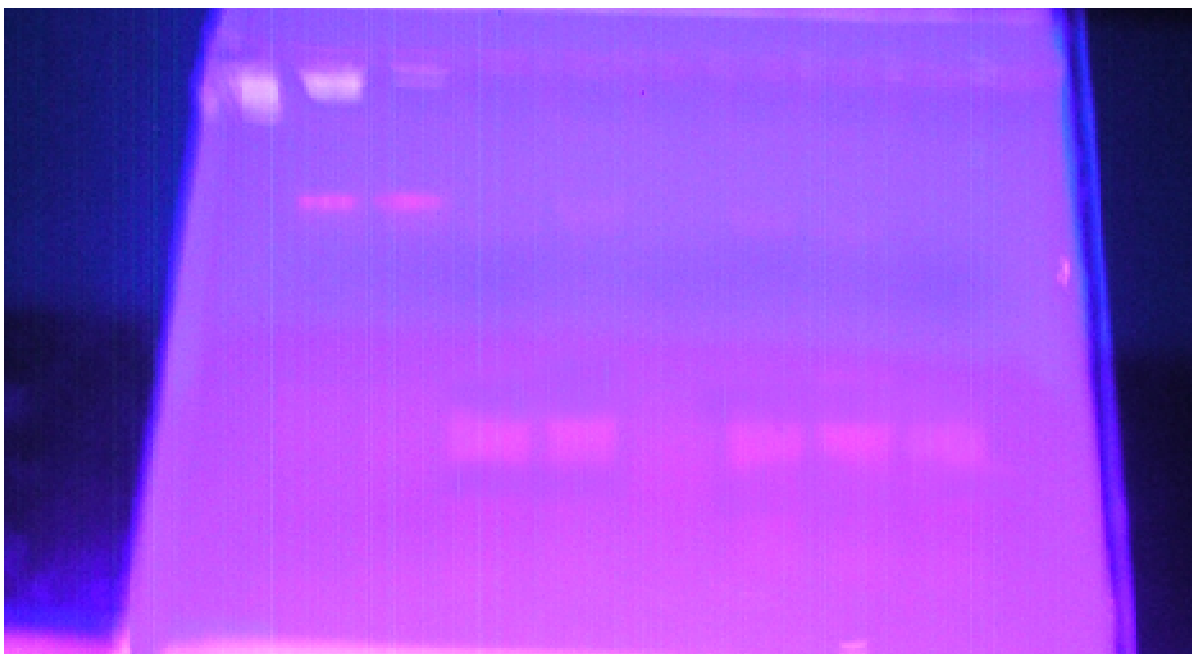


Figura 2: DNA plasmidial e cromossomal das bactérias resistentes aos antibióticos.

A resistência, característica marcante em hospitais pelo uso frequente de antimicrobianos, pode estar sendo intensamente disseminada no ambiente através do lançamento de esgoto nos cursos d'água. Alguns trabalhos têm procurado mostrar a relação entre a disseminação de genes de resistência e suas implicações ecológicas e ambientais.

Meireles-Pereira et al. (2002), no Rio de Janeiro - RJ, propõe uma rota de disseminação de genes de resistência no ambiente, mostrando o potencial que a poluição dos cursos d'água com o esgoto, especialmente de hospitais e de atividades veterinárias na produção de alimento, tem para contribuir com a disseminação de multirresistência.

Neste trabalho foi mostrada a presença de bactérias, portando plásmídeos de resistência no ribeirão. Este curso d'água recebe o esgoto doméstico, de abatedouros, do hospital da cidade, da criação de frangos e suínos, constituindo uma fonte de contaminação para a população e um ambiente propício para a disseminação desses plásmídeos de resistência.

Bechtluft (1999), avaliando uma estação de tratamento de esgoto (ETE) fez o isolamento e classificação de bactérias quanto à resistência a 20 (vinte) antimicrobianos diferentes, traçando um perfil de ocorrência de DNA plasmidial em diversos pontos de coleta ao longo da ETE. Neste trabalho, ele descreve uma significativa diminuição de resistência aos antibióticos ao longo do processo de tratamento de esgoto, bem como a diminuição do número de plasmídeos presentes nas bactérias.

A maioria dos trabalhos concentra suas atenções no ambiente hospitalar, onde cepas multirresistentes são selecionadas devido ao grande uso de antibióticos, especialmente os de última geração (MELO et al., 2005; FURTADO et al., 2004), no entanto o esgoto de muitos hospitais ainda é descarregado no ambiente.

Um outro lado para o qual se dá pouca importância é o do uso de antimicrobianos na comunidade e seu papel na seleção de resistência aos antimicrobianos de uso comum, dos quais dependem grande parte da população (BERQUÓ et al., 2004; BERTOLDI et al., 2004). Isto se deve a vários fatores, dentre eles a falta de recursos para diagnóstico, especialmente na rede pública de saúde e a automedicação, levando à seleção de bactérias cada vez mais resistentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTERTHUM, Flávio; TRABULSI, Luiz Rachid. **Microbiologia**. 4^a ed. São Paulo: Atheneu. 2004.

BECHTLUFFT, Marcelo de Paiva. **Resistência a Antimicrobianos e Perfil de DNA plasmidial em Enterobacteriaceae isoladas de uma estação de tratamento de esgoto e águas superficiais**. 1999. 152f. Dissertação. (Mestrado em microbiologia agrícola e do ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BERQUO, Laura S, BARROS, Aluísio J D, LIMA, Rosângela C et al. **Utilização de medicamentos para tratamento de infecções respiratórias na comunidade**. Rev. Saúde Pública, jun. 2004, vol.38, nº 3, p.358-364. ISSN 0034-8910.

BERQUO, Laura S et al . **Utilização de antimicrobianos em uma população urbana**. Rev. Saúde Pública., Abr.2004, vol. 38, nº 2, p. 239-246. ISSN 0034-8910.

BERTOLDI, Andréa D et al . **Utilização de medicamentos em adultos**: prevalência e determinantes individuais. Rev. Saúde Pública, Jun. 2004,vol. 38, nº 3, p. 358-364, ISSN 00348910.

BRICKS, Lucia Ferro. **Judicious use of medication in children**. J. Pediatr. (Rio de J.), Porto Alegre, v. 79, 2003.

CASE, Christine L.; FUNKE, Berdell R.; TORTORA, Gerard J. **Microbiologia**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. p.75-76, 235.

CASTRO, Mauro Silveira de, PILGER, Diogo, FERREIRA, Maria Beatriz Cardoso et al. **Tendências na utilização de antimicrobianos em um hospital universitário**, 1990-1996. Rev. Saúde Pública, out. 2002, vol.36, no.5, p.553-558. ISSN 0034-8910.

FURTADO, Guilherme Henrique Campos, MARTINS, Sinaida Teixeira, COUTINHO, Ana Paula et al. **Incidência de Enterococcus resistente à vancomicina em hospital universitário no Brasil**. Rev. Saúde Pública, fev. 2005, vol.39, no.1, p.41-46. ISSN 0034-8910.

GRIFFITHS, Anthony J. F. et al. **Introdução à Genética**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000. p. 194-197, 344-345.

MEIRELLES-PEREIRA, Frederico de et al . **Aspectos ecológicos da resistência antimicrobiana de bactérias de importância em infecção humana**. Braz. J. Microbiol., São Paulo, v. 33, n. 4, 2002.

MELO, Geraldo B. et al . **Analysis of the genetic diversity of vancomycin-resistant Staphylococcus aureus**. Braz. J. Microbiol., São Paulo, v. 36, n. 2, 2005.

MOREIRA, Maria Aparecida Scatamburlo; SOUZA, Edmar Chartone de; MORAES, Célia Alencar de. **Multidrug efflux systems in Gram-negative bacteria**. Braz. J. Microbiol., São Paulo, v. 35, n. 1-2, 2004.

NAIME, Sônia Maria Moreira Mariquito. **Águas de Pará de Minas**. 1ª ed. Gráfica Ideal. Jun.2005.

SAMBROOK J, FRITSCH E. F, MANNIATS T. **Molecular cloning**: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour, New York.1989.