



ISOLAMENTO DE *Pseudomonas* spp EM AMOSTRAS DE SWABS OTOLÓGICOS DE PACIENTES DO HOSPITAL VETERINÁRIO ULBRA – CANOAS E SEU PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Ana Paula L. de Souza, Aluna do PPG Doenças Infecciosas e Parasitárias (ULBRA);

Jane M. Brasil, Técnica do Laboratório de Microbiologia Veterinária (ULBRA);

Celso Pianta, Professor Orientador (ULBRA);

Cristina B. Z. Grecellé, Professora Orientadora (ULBRA).

RESUMO

A família Pseudomonadaceae é constituída por cocos e bacilos Gram negativos aeróbios, sendo uma mescla completa de patógenos oportunistas de animais e plantas. Inclui-se nessa família o gênero das *Pseudomonas*. Dentre as inúmeras espécies de *Pseudomonas* identificadas, apenas a *Pseudomonas aeruginosa* é de importância veterinária. A *P. aeruginosa* é uma bactéria muito difundida na natureza e desperta particular interesse por ser descrita como o bacilo Gram negativo não fermentador mais encontrado nas infecções hospitalares. Raramente causa infecção num indivíduo imunocompetente, porém é um dos principais agentes de infecção em indivíduos com defesas diminuídas. Sua importância clínica está baseada na difícil erradicação da infecção e contínuos fracassos terapêuticos, consequência direta da ampla expressão de fatores de virulência, assim como a resistência natural e adquirida a muitos antibióticos e desinfetantes. O objetivo desse trabalho foi realizar um estudo das amostras de *Pseudomonas* spp isoladas pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Luterana do Brasil – Campus Canoas e provenientes de swabs otológicos de paciente da rotina clínica, visto que esse gênero bacteriano é bastante adaptado ao ambiente e, conforme outras pesquisas é bastante resistente à diversos antibióticos. No período de fevereiro de 2014 a maio de 2015, no Laboratório de Microbiologia, foram analisados materiais provenientes de secreções em casos de otite, onde foi realizado exame bacteriológico e antibiograma. Esses materiais foram obtidos de pacientes caninos e felinos atendidos na rotina do Hospital Veterinário da Ulbra (HV-ULBRA/Canoas). A rotina laboratorial de isolamento bacteriano baseou-se na inoculação do material recebido, em: Ágar Sangue com 5% de sangue ovino, Ágar Mac Conkey e, em caldo BHI, ambos incubados a 37°C. A leitura realizada após 24 horas, onde foi observado macroscopicamente e microscopicamente as colônias bacterianas buscando encontrar características típicas do gênero *Pseudomonas*. Para realização dos testes de sensibilidade, utilizou-se o método de Kirby-Bauer sendo testados 15 princípios ativos. Foi realizado um total de 651 exames bacteriológicos na rotina do laboratório sendo 243 de amostras de swabs otológicos, evidenciando que 37,32% dos exames bacteriológicos recebidos são dessa origem. Das 243 amostras, em 29 (11,93%) foram isoladas bactérias do gênero *Pseudomonas*. Dentre as 29 amostras de *Pseudomonas* spp, 10 foram isoladas em cultura pura (34,48%) e 19 foram isoladas em cultura mista (65,52%). Foi possível observar que as *Pseudomonas* spp isoladas foram 100% resistentes à 5 princípios ativos e apresentaram maior sensibilidade a enrofloxacina e norfloxacina (93,1%). Nenhum

antibiótico mostrou-se 100% eficaz para o combate ao gênero isolado em teste *in vitro*. Ainda, as cepas de *Pseudomonas* spp isoladas mostraram-se resistentes à pelo menos seis antimicrobianos. Portanto, constatou-se que as otites bacterianas em pequenos animais são causadas muitas vezes por *Pseudomonas* spp e são bastante resistentes aos antibióticos utilizados rotineiramente para esse tipo de patologia.

PALAVRAS-CHAVE: Resistência à antimicrobianos. *Pseudomonas* spp. Otite.

INTRODUÇÃO

A família Pseudomonadaceae é constituída por cocos e bacilos Gram negativos aeróbios, sendo uma mescla completa de patógenos oportunistas de animais e plantas. Inclui-se nessa família o gênero das *Pseudomonas* (VALLE et al., s/d). Dentre as inúmeras espécies de *Pseudomonas* identificadas, apenas a *P. aeruginosa* é de importância veterinária (HIRSH e ZEE, 2003).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria difundida na natureza e desperta particular interesse por ser descrita como o bacilo Gram negativo não fermentador mais encontrado nas infecções hospitalares (VASCONCELOS e CALAZANS, 2006). Nesse sentido, raramente causa infecção num indivíduo imunocompetente, porém é um dos principais agentes de infecção em indivíduos com defesas diminuídas (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

Sendo assim, sua importância clínica está baseada na difícil erradicação da infecção e contínuos fracassos terapêuticos, consequência direta da ampla expressão de fatores de virulência, assim como a resistência natural e adquirida a muitos antibióticos e desinfetantes (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

Nessa assertiva, o objetivo desse trabalho foi realizar um estudo das amostras de *Pseudomonas* spp isoladas pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Luterana do Brasil – Campus Canoas e provenientes de *swabs* otológicos de paciente da rotina clínica, visto que esse gênero bacteriano é bastante adaptado ao ambiente e, conforme outras pesquisas é bastante resistente à diversos antibióticos. Fazendo-se necessário, maiores estudos na área veterinária referente a testes de sensibilidade antimicrobiana para o microrganismo em questão.

MATERIAIS E MÉTODOS

No período de fevereiro de 2014 a maio de 2015, no Laboratório de Microbiologia, foram analisados os materiais provenientes de secreções em casos de otite, onde foi

realizado exame bacteriológico e antibiograma. Nos casos onde houve o cultivo de *Pseudomonas* spp, a bactéria foi isolada e armazenada na mistura de 1 mL de BHI (*Brain Heart Infusion*) e 0,3 ml de Glicerol, homogeneizada e mantida em congelador. Esses materiais foram obtidos de pacientes caninos e felinos atendidos na rotina do Hospital Veterinário da Ulbra (HV-ULBRA/Canoas), na cidade de Canoas, Rio Grande do Sul.

A rotina laboratorial de isolamento bacteriano baseou-se na inoculação do material recebido, em: Ágar Sangue com 5% de sangue ovino, Ágar Mac Conkey e, em caldo BHI, ambos incubados a 37°C.

A leitura era realizada após 24 horas da incubação, onde foi observado macroscopicamente nas colônias bacterianas sua morfologia, coloração, presença ou ausência de hemólise, crescimento em Ágar MacConkey, lactose positiva ou negativa e odor. Já do ponto de vista microscópico, se a mesma era gram positiva ou negativa, sua forma, arranjo e presença de cápsula. Em alguns casos, foram necessários testes ou provas bioquímicas (catalase, oxidase, coagulase, SIM, citrato, glicose, entre outros).

Sendo assim, para confirmação de cultura positiva para *Pseudomonas* spp, a mesma deveria apresentar as seguintes características ou, a maioria delas:

- Crescimento em Ágar Sangue, onde a colônia apresenta-se grande, irregular, achatada, com borda serrilhada, de coloração metálica e odor adocicado;
- Crescimento em Ágar MacConkey e lactose negativa;
- Produção de pigmento (piocianina, pioverdina, piorubina, piomelanina);
- Ao microscópio deve apresentar-se como um bacilo gram negativo de tamanho médio;
- Oxidade positiva, catalase positiva, imóvel e fermentadora de glicose.

Para realização dos testes de sensibilidade, utilizou-se o método de referência de difusão por disco (Kirby-Bauer) em Ágar Mueller Hinton, e os antibióticos utilizados foram: amoxicilina (10 µg), amoxicilina + ácido clavulânico (30 µg), amicacina (30 µg), clorafenicol (30 µg), cefalexina (30 µg), ceftiofur (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), doxiciclina (30 µg), enrofloxacin (5 µg), gentamicina (10 µg), neomicina (30 µg), norfloxacina (10 µg), polimixina B (300 µg), sulfazotrim (25 µg) e tobramicina (10 µg).

Os dados foram trabalhados da seguinte forma: análise da prevalência de *Pseudomonas* spp comparado ao montante geral de bactérias isoladas; a prevalência de *Pseudomonas* spp nos *swabs* otológicos recebidos e a sensibilidade das amostras isoladas para cada antibiótico testado.

RESULTADOS

Durante o período de fevereiro de 2014 a maio de 2015, foram realizados um total de 651 exames bacteriológicos na rotina do Laboratório de Microbiologia do HV-ULBRA/Canoas. Desse total, 243 foram de amostras de *swabs* otológicos de pacientes caninos e felinos, evidenciando que 37,32% dos exames bacteriológicos recebidos são de *swabs* otológicos.

Dos 243 *swabs* otológicos recebidos, em 29 foram isoladas bactérias do gênero *Pseudomonas* spp (11,93%). Dentro das 29 amostras, 26 foram de pacientes caninos e 3 de pacientes felinos. Dentre as 29 amostras de *Pseudomonas* spp, 10 foram isoladas em cultura pura (34,48%) e 19 foram isoladas em cultura mista (65,52%), ou seja, encontrava-se a cultura de *Pseudomonas* spp associada a outro(s) gênero(s) bacteriano(s).

Após o isolamento foi realizado a técnica de antibiograma utilizando o método de Kirby-Bauer em Ágar Mueller Hinton, testando 15 princípios ativos. Foram obtidos os seguintes resultados em relação ao perfil de sensibilidade antimicrobiana das *Pseudomonas* spp isoladas nessa pesquisa, conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Perfil de sensibilidade antimicrobiana das *Pseudomonas* spp isoladas de swab otológico de pacientes do HV-ULBRA/Canoas.

Antimicrobiano	Resistente	Intermediário	Sensível	Observações
Amoxicilina	29 (100%)	-	-	-
Amoxicilina + ácido clavulânico	29 (100%)	-	-	-
Amicacina	3 (10,34%)	2 (6,90%)	24 (82,76%)	-
Cefalexina	29 (100%)	-	-	-
Cloranfenicol	28 (96,55%)	-	1 (3,45%)	-
Ceftiofur	15 (55,56%)	9 (33,33%)	3 (11,11%)	2 bactérias não testadas
Ciprofloxacina	2 (6,90%)	2 (6,90%)	25 (86,20%)	-
Doxiciclina	29 (100%)	-	-	-
Enrofloxacina	2 (6,90%)	-	27 (93,10%)	-
Gentamicina	3 (10,34%)	3 (10,34%)	23 (79,32%)	-
Neomicina	15 (51,72%)	11 (37,94%)	3 (10,34%)	-
Polimixina	3 (10,34%)	-	26 (89,66%)	-
Tobramicina	3 (10,34%)	2 (6,90%)	24 (82,76%)	-
Norfloxacina	2 (6,90%)	-	27 (93,10%)	-
Sulfazotrim	29 (100%)	-	-	-

Foi possível observar que as *Pseudomonas* spp isoladas foram 100% resistentes à 5 antibióticos (amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, cefalexina, doxiciclina e sulfazotrim) e apresentaram maior sensibilidade a enrofloxacina e norfloxacina (93,1%). Mas, nenhum antibiótico mostrou-se 100% eficaz para o combate ao gênero isolado.

Também, ressalta-se que todas as *Pseudomonas* spp isoladas mostraram-se resistentes à pelo menos seis antimicrobianos. Sendo que uma das amostras isoladas foi resistente à 14 antibióticos, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2: Número de antimicrobianos aos quais as amostras de *Pseudomonas* spp mostraram-se resistentes no antibiograma.

Número de amostras	Número de antibióticos resistentes
8 (27,59%)	6
13 (44,82%)	7
6 (20,69%)	8
1 (3,45%)	11
1 (3,45%)	14

DISCUSSÃO

Os swabs otológicos provenientes de pacientes caninos e felinos com provável otite bacteriana são um dos materiais mais enviados para bacteriológico e antibiograma no Laboratório de Microbiologia do HV-ULBRA/Canoas, evidenciando a prevalência dessa patologia e grau de importância.

Sendo assim, constatou-se que as otites bacterianas em pequenos animais são causadas muitas vezes por *Pseudomonas* spp e, conforme observado nas tabelas acima mencionadas, são bastante resistentes aos antibióticos utilizados rotineiramente para esse tipo de patologia. Isso demonstra a importância da realização de exame bacteriológico e antibiograma previamente ao início de qualquer terapêutica, buscando prevenção do desenvolvimento de otites crônicas, devido ao desenvolvimento de resistência pelo gênero de *Pseudomonas* spp à antimicrobianos usados de forma empírica e indiscriminada.

As *Pseudomonas* spp são organismos ambientais, encontrados na água, solo e plantas, incluindo frutas e vegetais. Essas apresentam distribuição mundial. São bem reconhecidas como fitopatógenos, e muitas espécies foram descritas pela primeira vez

nesse contexto. Por causa da sua capacidade de sobrevivência em meio aquoso, a presença desse organismo tornou-se particularmente problemática no ambiente hospitalar (MURRAY et al., 1995).

A exposição ambiental ou endógena é constante, e a maior parte das infecções é secundária ao comprometimento das defesas do hospedeiro (HIRSH e ZEE, 2003). Sendo assim, Oliveira (2000) relata que dessa forma a infecção pode ocorrer através de ferimentos ou processos cirúrgicos.

Tanaka et al. (2002) confirma que a *Pseudomonas* spp está relacionada à várias manifestações clínicas no homem e em animais. Nos animais domésticos, o agente tem sido descrito em diferentes afecções, incluindo otite, cistite, endometrite, laminite, encefalite, linfadenite, mastite, dermatite, cólica, abscessos, pneumonia, enterite, conjuntivite e septicemia.

Segundo Trabulsi e Alterthum (2008), as *Pseudomonas* spp são naturalmente resistente à maioria dos antibióticos usados no tratamento das infecções causadas por outras bactérias Gram negativas. Além disso, pode adquirir resistência de maneira relativamente fácil aos antibióticos após exposição prévia. Principalmente, pela ação de um dos fatores de virulência conhecido como biofilme, o qual garante o estabelecimento de um sistema de comunicação que coordena as atividades metabólicas em benefício mútuo, assim como a produção simultânea de fatores de virulência que facilitam a disseminação no hospedeiro. Estruturalmente, o biofilme confere proteção contra o sistema de defesa do hospedeiro como linfócitos, fagócitos, ação ciliar do trato respiratório, anticorpos e complemento. A formação de biofilme também dificulta a difusão de antibióticos e desinfetantes conferindo menor suscetibilidade de que uma forma de vida unicelular. Outra propriedade conferida pelo biofilme é o intercâmbio de material genético.

CONCLUSÃO

O organismo está sempre presente no ambiente, por conseguinte, os determinantes de doença relacionam-se amplamente com os hospedeiros e seu ambiente imediato. Em um hospital veterinário, porém, várias situações favorecem a seleção deste organismo. As causas predisponentes e as fontes de infecção devem ser identificadas e, quando possível eliminadas. As *Pseudomonas* spp são extremamente resistentes a vários antibióticos, e testes de sensibilidade devem ser feitos nos isolados sempre que possível para evitar maior grau de resistência desse gênero na medicina veterinária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

MURRAY, P.R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 6.ed. Washington: American Society of Microbiology Press, 1995.

OLIVEIRA, S.J. **Microbiologia Veterinária** – guia bacteriológico prático. 2.ed. Canoas: Editora ULBRA, 2000.

TANAKA, E.M. et al. Tris-EDTA no teste de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* em amostras de *Pseudomonas aeruginosa*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.54, n.3. 2002.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

VALLE, A.G. et al. **Microbiologia Médica**. Zaragoza: Universidad de Zaragoza, s/d.

VASCONCELOS, U.; CALAZANS, G.M.T. Antibiogramas de linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de diferentes ambientes aquáticos. **Revista de Patologia Tropical**, Goiás, v.35, n.3, p.241-244, set/dez. 2006.