

# Isolamento, caracterização e resistência a antimicrobianos de bactérias Gram-negativas aeróbias e anaeróbias facultativas de amostras de solo

Isolation, characterization, and antimicrobial resistance of Gram-negative aerobic and facultative anaerobic bacteria from soil samples.

RIALA6/1047

Paulo da SILVA<sup>1\*</sup>; Ana Maria Machado CARNEIRO; Maria Claudia CARLONI; Marta Inês Cazentini MEDEIROS; Jaqueline Otero SILVA; Silvia Helena Chinarelli RECHE; Maria Clarice ERRERA; Suzel Nogueira NEME

\* Endereço para correspondência: Laboratório I do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, Rua Minas 877 – CEP 14 085 – 410 , e-mail pdsilva@ial.sp.gov.br

<sup>1</sup> Divisão dos Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz, Lab. I de Ribeirão Preto.

Recebido: 21/09/2005 – Aceito para publicação: 19/12/2005

## RESUMO

Cerca de 7% da população bacteriana do solo está representado por bactérias Gram-negativas aeróbias/ anaeróbias facultativas. Muitas espécies são patogênicas e estão envolvidas em casos de infecções hospitalares. O potencial de patogenicidade dessas bactérias pode ser avaliado através da investigação da sua resistência a antimicrobianos. Além deste propósito, o objetivo do trabalho foi também identificar bacilos gram-negativos (BGN) isolados do solo. Para isso, 18 amostras de solo foram semeadas em caldo de Hajna. A obtenção de colônias isoladas seguiu-se em Mc Conkey ágar e Mueller Hinton ágar com 5% de sangue de carneiro. Foram repicadas 283 colônias com diferentes características morfológicas, em meio de IAL. Na triagem, obteve-se BGN fermentadores e não fermentadores, cuja identificação se fez pela metodologia convencional. Identificou-se 94,35% de enterobactérias e 5,65% BGN não fermentadores. A resistência bacteriana foi mais expressiva aos antibióticos ampicilina, cefalotina, cefoxitina, amoxicilina com ácido clavulânico e tetraciclina, variando entre 49,82% a 87,28%. Todos os isolados bacterianos foram resistentes a pelo menos um antibiótico, o que demonstra considerável potencial patogênico por constituírem um reservatório de resistência. A associação entre solo e resistência antimicrobiana precisa ser mais estudada. Observações e experimentos adicionais possibilitarão conhecer melhor essa relação e os processos que possam contribuir para a emergência de bactérias resistentes.

**Palavras-Chave.** bacilos gram-negativos, solo, resistência a antimicrobianos.

## ABSTRACT

Gram-negative aerobic bacteria are found in nearly 7% of soil resident-bacteria population. Many bacteria species are pathogenic, and they are responsible for nosocomial infections. Antimicrobial drugs resistance is relevant for assessing the potential pathogenic features of circulating bacteria strains. The aim of the present study was to identify Gram-negative bacilli (GNB) isolated from soil, and to test the antimicrobial resistance. Eighteen soil samples were inoculated into Hajna's broth for enrichment. Bacterial isolation was done on Mc Conkey agar and Müeller Hinton blood agar. Isolated bacteria colonies (283) were inoculated onto modified Rugai medium for screening the fermentative GNB and non-fermentative GNB, and followed by identification by means of conventional methodology. Most of them (94.35%) belonged to *Enterobacteriaceae*, and 5.65% were non-fermentative GNB. High rates of bacterial resistance were evidenced to ampicillin, cefalotin, cefoxitin, amoxicillin+clavulanic acid, and tetracycline, varying from 49.82% to 87.28%. All of the isolated bacteria showed resistance to at least one antibiotic. These results provide remarkable data on pathogenic potential as a constituent of a resistance reservoir. Further studies on the relationship between soil and antimicrobial resistance needs to be performed. Then the advanced experiments and observations will provide best understanding on the mechanism and the process associated with the emergence of environmental drug-resistant bacteria.

**Key Words.** Gram-negative bacilli , soil, antimicrobial resistance.

## INTRODUÇÃO

A população de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas do solo é formada na sua maioria por bactérias heterotróficas, pertencentes à ordem *Eubacteriales*<sup>1</sup>. Cerca de 93% é representada pelas bactérias Gram-positivas e o restante pelas Gram-negativas<sup>2</sup> que são classificadas como bacilos e cocos Gram-negativos, aeróbios/microaerófilos, não fermentadores e bacilos Gram-negativos anaeróbios facultativos, fermentadores.

Com relação à morfologia e fisiologia, as bactérias Gram-negativas encontradas no solo são muito heterogêneas. São reconhecidos como bacilos Gram-negativos não fermentadores os gêneros *Acetobacter*; *Acidovorax*; *Achromobacter*; *Acinetobacter*; *Agrobacterium*; *Alcaligenes*; *Brevundimonas*; *Azotobacter*; *Beijerinckia*; *Burkholderia*; *Chryseomonas*; *Comamonas*; *Cupriavidus*; *Derxia*; *Ensifer*; *Flavimonas*; *Flavobacterium*; *Janthylobacterium*; *Methylobacterium*; *Methylovorus*; *Paracoccus*; *Pedobacter*; *Pseudomonas*; *Ralstonia*; *Rhizobacter*; *Sphingobacterium*; *Sphingomonas* e *Stenotrophomonas*,<sup>3,4,5,6</sup> enquanto que, entre os bacilos Gram-negativos fermentadores são consideradas, principalmente, as espécies da família *Enterobacteriaceae*.

Estas bactérias estão largamente dispersas na natureza, ocupando vários nichos ecológicos distribuídos pelo solo, água, frutas, vegetais, grãos, plantas, flores e trato intestinal dos animais e dos seres humanos. Muitas espécies estão associadas com abscessos, pneumonia, meningite, septicemia, feridas, infecções urinárias e intestinais, além de estarem envolvidas em casos de infecções hospitalares<sup>4,7,8</sup>.

A ocorrência de bactérias Gram-negativas no solo é pouco estudada e geralmente, são investigadas quanto a sua habilidade em realizar alterações químicas específicas como a decomposição da celulose, proteínas e herbicidas, assimilação do nitrogênio e resistência a antimicrobianos<sup>9</sup>.

O estudo da resistência de bactérias isoladas do meio ambiente é de fundamental importância em saúde pública, para avaliar as cepas circulantes quanto ao potencial de patogenicidade, devido à pressão seletiva exercida pelo uso de antibióticos<sup>1</sup>.

A utilização de maneira indiscriminada dos agentes antimicrobianos nas práticas médicas, veterinárias e agrícolas é um dos fatores que leva a emergência de bactérias multirresistentes que são selecionadas e lançadas no meio ambiente<sup>11</sup>. Este fato, associado à transferência genética de fatores de resistência entre microrganismos representa um grande problema no tratamento de doenças infecciosas, especialmente, em pacientes hospitalizados<sup>10</sup>.

O objetivo deste trabalho foi identificar bactérias Gram-negativas aeróbias e anaeróbias facultativas isoladas de solo e investigar sua resistência a antimicrobianos.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Obtenção e preparo das amostras de solo:** as amostras foram obtidas de solo do tipo cerrado, na região de Barretos, São Paulo, Brasil. O solo encontrava-se arado, adubado, adicionado de cal e cultivado com leguminosas e gramíneas. Foram colhidas 18 amostras da camada superior do solo em uma profundidade de até 20cm, que levadas ao laboratório foram peneiradas e acondicionadas em sacos plásticos sem uso, selados e estocados a  $-20^{\circ}$  C, até o momento dos procedimentos laboratoriais. Para enriquecimento de bactérias Gram-negativas semeou-se 10g de cada amostra em 90mL de caldo de Hajna<sup>5</sup>. Essas amostras assim preparadas foram incubadas a  $35 - 37^{\circ}$  C por até 48 horas para a seguir serem inoculadas em meios sólidos, obedecendo à técnica de semeadura quantitativa<sup>8</sup>.

**Isolamento bacteriano:** partiu-se de diluições seriadas do caldo de Hajna<sup>12</sup> ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) em solução tampão. Tendo identificado a diluição ideal como sendo  $10^{-6}$ , utilizou-se o volume de 10  $\mu$ L, com alça bacteriológica calibrada, para inoculação em placas de ágar Mc Conkey e ágar Muller Hinton (Difco), este último foi adicionado de 5% de sangue desfibrinado de carneiro. As placas inoculadas foram incubadas a  $35 - 37^{\circ}$  C por até 48 horas<sup>8</sup>. Foram selecionadas várias colônias de diferentes tipos morfológicos e inoculadas no meio de Rugai modificado por Pessoa e Silva (IAL)<sup>13</sup>. Após incubação a  $35 - 37^{\circ}$  C, por até 24 horas identificou-se bacilos Gram-negativos fermentadores e não fermentadores, no total de 283 amostras. Cada isolado foi conservado em Ágar Nutriente inclinado, para os demais procedimentos.

**Identificação dos isolados bacterianos:** foi realizada por testes bioquímicos padronizados e adotados pelo Instituto Adolfo Lutz, com a utilização de esquemas de classificação bacteriana descritos em manuais de sistemática e microbiologia clínica<sup>4,8,10</sup>. A identificação dos bacilos Gram-negativos com características de serem fermentadores da glicose foi direcionada como para enterobactérias<sup>7</sup> e aqueles com características de não fermentadores foram submetidos a testes reconhecidos para a sua identificação<sup>3,4,5,6,8,14</sup>.

**Análise numérica comparativa:** criou-se um banco de dados reunindo em uma tabela as características fenotípicas das bactérias, cujos resultados das reações foram registrados como positivo (P) ou negativo (N). Uma outra tabela com as características fenotípicas, definidas para cada provável suspeito, também foi elaborada, de acordo com Sneath (1984)<sup>15</sup>. A análise dos dados foi realizada através de comparações entre as tabelas, estabelecendo a similaridade entre as características fenotípicas apresentadas pelas bactérias estudadas com as das bactérias determinadas na literatura. Determinou-se a espécie bacteriana quando a similaridade entre os registros das tabelas foi  $\geq 90\%$ .

### Testes de sensibilidade a antimicrobianos

Foram utilizados grupos de drogas antimicrobianas sugeridas para bactérias Gram-negativas, fermentadoras e não fermentadoras, com os respectivos limites de sensibilidade estabelecidos pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) para o teste de disco-difusão<sup>16,17</sup>. O inóculo bacteriano foi preparado em solução fisiológica esterilizada equivalente à concentração de 0,5 da escala de Mac Farland (1x10<sup>8</sup> UFC/mL), a partir de um crescimento de 18 horas em placa de ágar Mac Conkey. Com auxílio de um “swab”, fez-se a inoculação da amostra bacteriana em placa de ágar Mueller Hinton, onde posteriormente foram colocados os discos dos antibióticos: amicacina (AMI), amoxicilina+ácido clavulânico (AMC), ampicilina (AP), ácido nalidíxico (AN), cefalotina (CF), cefoxitina (CFO), cefotaxima (CTX), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CO), gentamicina (GN), imipenem (IPM), levofloxacina (LVX), polimixina B (PLB), sulfametoxazol+trimetoprim (SUT), tetraciclina (TT), ticarcilina+ácido clavulânico (TIM) e tobramicina (TB)<sup>18</sup>. A leitura do antibiograma foi realizada após 24 horas de incubação a 37°C. Os halos de inibição foram medidos e os resultados avaliados de acordo com NCCLS. Foram utilizadas as cepas padrões de *Staphylococcus aureus*

ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922 para o controle de qualidade<sup>16,17</sup>.

### RESULTADOS

Na tabela 1 estão listadas as 283 bactérias convencionalmente identificadas, sendo a grande maioria (94,35%) formada por membros da família *Enterobacteriaceae*, pertencentes principalmente ao gênero *Enterobacter* (62,19%). Os restantes dos isolados (5,65%) foram classificados como bacilos Gram-negativos não fermentadores.

Na figura 1 é demonstrada a frequência da resistência aos 17 agentes antimicrobianos testados, podendo-se observar a ocorrência de níveis de resistência bacteriana acima de 40% para ampicilina, cefalotina, cefoxitina, amoxicilina+ácido clavulânico e tetraciclina.

Na Tabela 2 são apresentadas as diferentes espécies bacterianas isoladas e as porcentagens individuais das resistências aos antimicrobianos testados. Observou-se entre as 28 espécies de bactérias identificadas, que 24 (85,71%) apresentaram multirresistência (resistência a quatro antibióticos

**Tabela 1.** Porcentagens das diferentes espécies de bacilos Gram-negativos isolados de solo.

Fermentadores	BACILOS GRAM-NEGATIVOS ISOLADOS DE SOLO		Não Fermentadores	Isolados	
	Isolados			Nº	%
	Nº	%		Nº	%
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	6	2,12	<i>Acinetobacter</i> sp.	3	1,06
<i>Citrobacter braakii</i>	2	0,71	<i>Achromobacter</i> sp.	5	1,77
<i>Citrobacter freundii</i>	2	0,71	<i>Ralstonia pickettii</i>	6	2,12
<i>Citrobacter intermedius</i>	3	1,06	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	0,71
<i>Citrobacter koseri</i>	3	1,06			
<i>Citrobacter sedlakii</i>	8	2,83			
<i>Citrobacter youngae</i>	2	0,71			
<i>Enterobacter aerogenes</i>	21	7,42			
<i>Enterobacter amnigenus</i>	1	0,35			
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	3	1,06			
<i>Enterobacter cloacae</i>	94	33,22			
<i>Enterobacter gergoviae</i>	6	2,12			
<i>Enterobacter intermedius</i>	2	0,71			
<i>Enterobacter</i> sp.	49	17,31			
<i>Erwinia rhapontici</i>	1	0,35			
<i>Escherichia coli</i>	10	3,53			
<i>Hafnia alvei</i>	3	1,06			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	4,24			
<i>Klebsiella</i> sp.	1	0,35			
<i>Raoultella terrigena</i>	3	1,06			
<i>Serratia liquefaciens</i>	7	2,47			
<i>Serratia marcescens</i>	18	6,36			
<i>Serratia odorifera</i>	9	3,18			
<i>Serratia rubidae</i>	1	0,35			
<b>TOTAL</b>	<b>267</b>	<b>94,35</b>	<b>TOTAL</b>	<b>16</b>	<b>5,65</b>

ou mais), principalmente nos gêneros *Enterobacter*, *Serratia* e em bacilos gram-negativos não fermentadores.

*Enterobacter cloacae* foi a enterobactéria que apresentou maior porcentagem de resistência aos antimicrobianos, principalmente a amicacina, amoxicilina com ácido clavulânico, ampicilina, cefalotina e cefoxitina, enquanto a maioria das enterobactérias foi totalmente sensível a ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, com exceção da *Serratia marcescens* que demonstrou 5,6% de resistência a gentamicina e levofloxacina.

*Citrobacter koseri*, *Enterobacter amnigenus*, *Klebsiella* sp e *Serratia rubidae* foram sensíveis a cefoxitina, sendo que os outros isolados apresentaram resistência a este agente variando de 16,7% a 100%.

A resistência aos aminoglicosídeos foi menos prevalente entre os isolados, enquanto que aos betalactâmicos foi a que mais prevaleceu. Todas as espécies de *Enterobacteriaceae* identificadas apresentaram resistência no mínimo a três dos cinco betalactâmicos testados, exceto *E. amnigenus*, *Klebsiella* sp, *Raoutella terrigena* e *Serratia rubidae*. A maioria das cepas apresentou resistência às cefalosporinas de primeira (CF) e segunda geração (CFO) e sensibilidade à cefalosporina de terceira geração (CTX).

Foram utilizados os antimicrobianos amoxicilina e ticarcilina com ácido clavulânico como associações de betalactâmicos e inibidores de betalactamases. Dezenove espécies de BGN fermentadores no total foram resistentes para

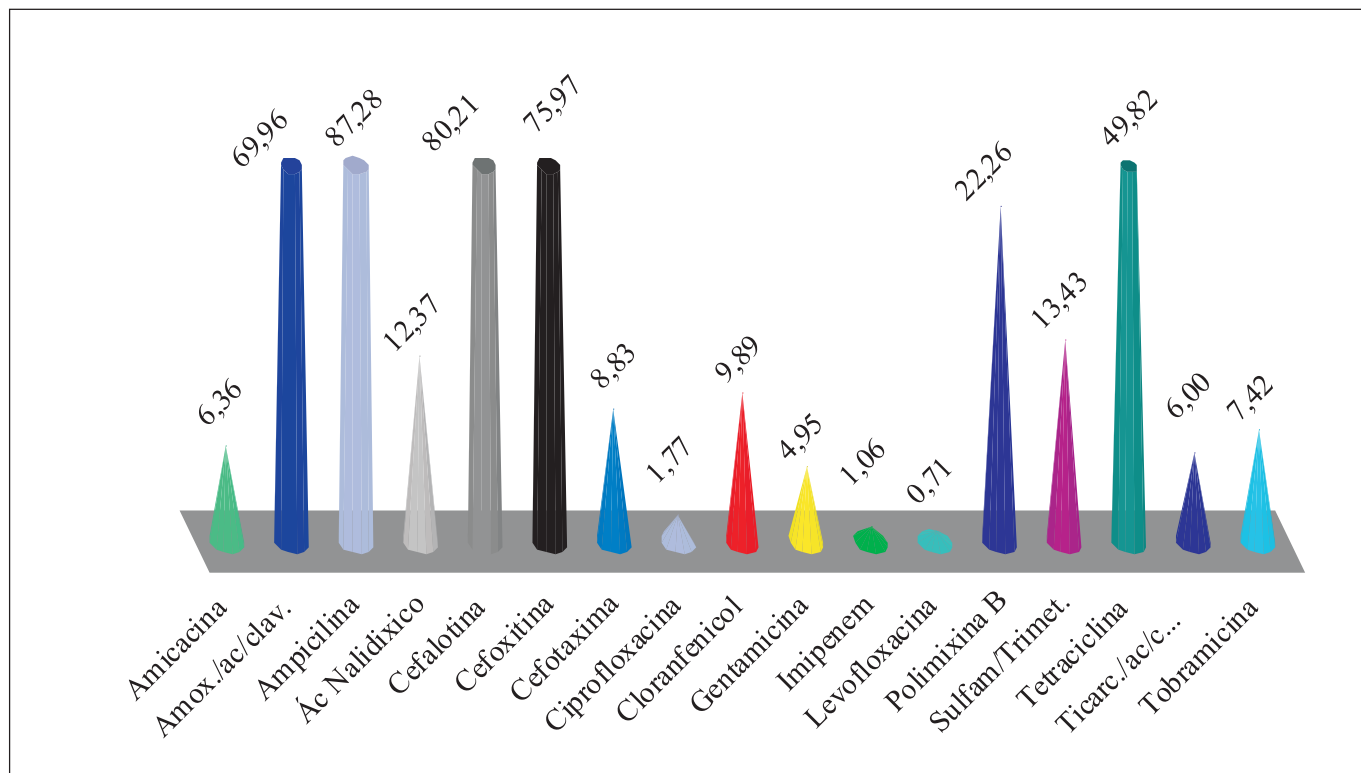
amoxicilina+ácido clavulânico, já com ticarcilina+ácido clavulânico houve resistência em oito espécies de enterobactérias.

Os isolados de bacilos Gram-negativos não fermentadores apresentaram um alto índice de resistência aos betalactâmicos testados, mesmo com associação de inibidores. Podemos observar que *Achromobacter* sp e *Stenotrophomonas maltophilia* foram 100% resistentes a ticarcilina+ácido clavulânico e amoxicilina+ácido clavulânico. Ainda neste grupo bacteriano nota-se que levofloxacina foi a quinolona mais ativa, seguida por ciprofloxacina e ácido nalidixico. Resistência aos aminoglicosídeos só não foi observada em *Acinetobacter* sp, que mostrou 100% de sensibilidade a estes antibióticos, enquanto que a resistência foi de 100% ao sulfametoxazol+trimetoprim.

*Stenotrophomonas maltophilia* exibiu seu padrão de resistência típica, incluindo susceptibilidade às quinolonas, sulfametoxazol+trimetoprim e alto índice de resistência ao imipenem, sendo o único bacilo Gram negativo não fermentador que apresentou 100% de sensibilidade ao cloranfenicol. Todos os isolados de não fermentadores apresentaram resistência à ampicilina, cefalotina, cefoxitina, cefotaxima e polimixina B.

## DISCUSSÃO

O uso extensivo de antibióticos é considerado um importante fator na emergência de bactérias resistentes aos



**Figura 1.** Porcentual da resistência aos agentes antimicrobianos testados, encontrada entre as 283 amostras de bacilos Gram-negativos isolados do solo.

**Tabela 2.** Porcentagem da resistência dos bacilos Gram-negativos isolados de solo aos agentes antimicrobianos testados.

ISOLADOS	Agentes antimicrobianos testados em bacilos gram-negativos, de acordo com NCCLS 2003, tabelas M100-S13																
	Betalactâmicos						Aminoglicosídeos				Quinolonas				Diversos		
	AP	CF	CFO	CTX	IPM	AMC	TIM	AMI	GN	TB	AN	CIP	LVX	TT	SUT	PLB	CO
<b>FERMENTADORES</b>																	
<i>Citrobacter amalonaticus</i> (6)	100	83,4	16,7	0	0	50	16,7	0	0	0	0	0	0	33,4	16,7	0	0
<i>Citrobacter brakii</i> (2)	50	100	100	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
<i>Citrobacter freundii</i> (2)	100	50	50	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	50
<i>Citrobacter intermedius</i> (3)	100	66,7	66,7	0	0	66,7	0	0	0	33,4	0	0	0	33,3	0	0	0
<i>Citrobacter koseri</i> (3)	100	33,3	0	0	0	33,3	0	0	0	0	0	0	0	33,3	0	0	0
<i>Citrobacter sedlakii</i> (8)	100	100	100	0	0	100	0	12,5	0	2,5	0	0	0	50	0	0	0
<i>Citrobacter youngae</i> (2)	0	50	100	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i> (21)	81	81	76,2	4,76	0	66,7	14,3	0	0	14,3	0	0	0	28,6	19,0	14,3	14,3
<i>Enterobacter amnigenus</i> (1)	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cancerogenus</i> (3)	100	66,7	100	0	0	66,7	0	0	0	0	0	0	0	66,7	33,3	33,3	0
<i>Enterobacter cloacae</i> (94)	96,8	86,2	87,2	4,3	1,1	85,1	3,2	96,8	1,1	2,12	8,51	2,12	1,1	44,7	14,9	12,8	8,5
<i>Enterobacter gergoviae</i> (6)	66,8	100	66,7	0	0	83,3	0	0	0	16,7	0	0	0	50	0	16,7	16,7
<i>Enterobacter intermedius</i> (2)	100	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter</i> sp (49)	81,6	84,7	89,8	6,1	0	79,6	8,2	2	0	8,2	0	0	0	40,8	12,2	6,1	2
<i>Erwinia rhapontici</i> (1)	100	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> (10)	60	60	30	0	0	20	10	0	0	10	0	0	0	50	0	20	0
<i>Hafnia alvei</i> (3)	100	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (12)	41,7	8,3	58,3	0	0	16,7	0	8,3	0	16,7	0	0	0	58,3	8,3	33,3	0
<i>Klebsiella</i> sp (1)	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Raoultella terrigena</i> (3)	100	0	66,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	66,7	0	0	0
<i>Serratia liquefaciens</i> (7)	100	71,4	57,1	0	0	71,4	14,3	0	0	0	0	0	0	57,1	0	57,1	0
<i>Serratia marcescens</i> (18)	88,9	100	38,9	0	0	88,9	0	0	5,6	27,8	0	0	5,6	100	33,3	100	16,7
<i>Serratia odorifera</i> (9)	77,8	100	77,8	11,1	0	88,9	0	0	0	0	0	0	0	100	0	88,9	11,1
<i>Serratia rubidaea</i> (1)	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
<b>NÃO FERMENTADORES</b>																	
<i>Achromobacter</i> sp (5)	100	100	100	100	0	0	100	100	80	100	40	0	0	40	0	40	60
<i>Acinetobacter</i> sp (3)	100	100	100	100	0	66,7	66,7	0	0	66,7	0	0	0	100	66,7	66,7	66,7
<i>Ralstonia pickettii</i> (6)	100	100	100	100	0	0	0	100	100	100	16,7	0	0	33,4	0	16,7	83,3
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (2)	100	100	100	100	100	100	0	50	50	0	0	0	0	100	50	100	0

AMI: amicacina, AMC: amoxicilina com ácido clavulânico, AN: ácido nalidíxico, AP: ampicilina, CF: cefalotina, CFO: cefoxitina, CTX: cefotaxima, CIP: ciprofloxacina, CO: cloranfenicol, GN: gentamicina, IPM: imipenem, LVX: levofloxacina, PLB: polimixina B, SUT: sulfametoxazol com trimetoprim, TT: tetraciclina, TIM: ticarcilina com ácido clavulânico e TB: tobramicina.<sup>15,17</sup>



antimicrobianos, principalmente para as enterobactérias, que fazem parte de diferentes nichos ecológicos, conduzindo à expansão de grupos de genes de resistência na natureza<sup>19,20</sup>.

Todos os bacilos Gram-negativos investigados apresentaram resistência a um ou mais dos 17 agentes antimicrobianos testados. Existe escassez de dados na literatura sobre o assunto, dificultando a comparação de nossos resultados. No entanto, as porcentagens de resistência encontradas podem ser comparadas com aquelas relatadas para bacilos Gram-negativos isolados de ambientes aquáticos, esgotos<sup>11,21</sup>, vegetais<sup>22</sup>, microbiota intestinal de animais<sup>23</sup> e humana<sup>24</sup> e de pacientes hospitalizados<sup>25</sup>.

De modo geral observou-se boa sensibilidade das cepas ao imipenem. Os isolados de *Enterobacter* sp foram mais resistentes a cefotaxima do que qualquer outra enterobactéria, coincidindo com dados encontrados em cepas isoladas de pacientes hospitalizados<sup>23, 25</sup>.

Outros autores relataram a resistência antimicrobiana de bactérias de diversas fontes ambientais, principalmente, aquelas que recebem dejetos humanos ou de animais<sup>20,26</sup>. Os estudos mostram que as bactérias encontradas nas fezes humanas podem ser isoladas do ambiente aquático<sup>11,21,27,28</sup>, lixo de instalações hospitalares e farmacêuticas<sup>21</sup>, solo<sup>19</sup>, rações e outros produtos para animais<sup>20</sup>, fezes de aves<sup>23</sup> e mamíferos<sup>27,20</sup>.

Comparando isolados de *Escherichia coli* do solo, avaliados neste estudo, com isolados de amostras fecais de aves<sup>23</sup>, observamos maior sensibilidade a cefotaxima, ciprofloxacina e levofloxacina do que naqueles isolados hospitalares<sup>10,23</sup>, o que ocorreu também para *Serratia marcescens* frente à ciprofloxacina<sup>25</sup>. Esse fato pode estar relacionado à pressão seletiva do uso de antibióticos no ambiente hospitalar.

A resistência das enterobactérias ao ácido nalidíxico variou de 8,2 a 33,4% e a tetraciclina de 28,6 a 100%. Resistência a estas drogas assim como aos betalactâmicos foram observadas também em isolados de água doce de afluentes urbanos<sup>11</sup> e de amostras de vegetais, onde *Enterobacter* sp também foi o isolado mais frequente, apresentando menor resistência aos antimicrobianos testados<sup>22</sup>.

Muitas espécies de bacilos Gram-negativos podem produzir betalactamases. Para restabelecer a atividade dos betalactâmicos, foram introduzidos compostos que inibem algumas destas enzimas. Desde meados dos anos 1980 têm sido usados ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam em combinação com amoxicilina e ticarcilina, ampicilina e piperacilina, respectivamente. No entanto, semelhante a outros relatos da literatura<sup>29,30</sup> encontramos espécies de *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Acinetobacter*, *Serratia* e *E. coli* resistentes a amoxicilina/ácido clavulânico, sugerindo a presença de betalactamases induzidas.

A resistência intrínseca a determinados antibióticos como cefalotina, polimixina, ampicilina e tetraciclina é uma propriedade genética de algumas espécies de bacilos Gram-negativos, especialmente, enterobactérias. Este tipo de resistência foi também observado entre os isolados bacterianos, corroborando com os resultados encontrados por Tinko e Kmeč<sup>23</sup>, em trabalho realizado com fezes de aves.

Os padrões de resistência de bacilos gram-negativos não fermentadores são diferentes daqueles dos membros da família *Enterobacteriaceae*. Estes apresentaram maiores níveis de resistência para certos antibióticos, como amicacina, ácido nalidíxico e cefotaxima. Embora o método de disco difusão não seja recomendado para bacilos gram-negativos não fermentadores, foram aplicados os padrões interpretativos para *P. aeruginosa*. No entanto, o NCCLS aconselha que seja reportado para *Stenotrophomonas maltophilia*, somente levofloxacina, sulfametoxazol+trimetoprim e ciprofloxacina<sup>3,17,31</sup>.

Os bacilos Gram-negativos não fermentadores apresentaram resistência no mínimo a 58,82% dos antimicrobianos testados. Levando-se em conta o potencial de patogenicidade destas bactérias, elas representam uma preocupação na área de saúde, pois assim como as enterobactérias, os gêneros *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Ralstonia* e *Stenotrophomonas* estão dispersos no meio ambiente. São reconhecidos como fitopatógenos, com habilidade para sobreviver em superfícies secas ou úmidas, podendo estar presentes na pele de pessoas saudáveis. Devido a isto, eles podem tornar-se importantes agentes de infecções hospitalares, principalmente em pacientes imunocomprometidos ou debilitados, que se submetem a procedimentos invasivos<sup>6,21,25</sup>.

## CONCLUSÕES

A população bacteriana estudada apresenta considerável potencial patogênico por constituir um reservatório de resistência antimicrobiana, que poderia ser transmitido para outras bactérias, inclusive aquelas de ambiente hospitalar.

A importância deste estudo reside no fato de que pouco se conhece a respeito da conexão entre solo e resistência antimicrobiana. Somente através de experimentos e observações estaremos hábeis para entender a relação e os processos que contribuem para a emergência deste problema.

Existem várias questões com relação à origem, disseminação e controle da resistência bacteriana. Para as duas primeiras já se detém razoável conhecimento, mas com relação ao controle é que se encontram as maiores dificuldades, dependendo, sobretudo, de ações educativas e políticas.

É preciso investir na conscientização das classes médica, veterinária, farmacêutica e autoridades sanitárias, para que haja a colaboração da comunidade em geral contra o uso abusivo dos antimicrobianos, pois observa-se a preocupação cada vez maior com a falta de opção terapêutica para o tratamento das infecções hospitalares.

## REFERÊNCIAS

1. Sagardoy MA, Salerno C M. Number, distribution, and characterization of heterotrophic bacteria in some Argentine soils. *An Edafol Agrobiol* 1983; 42: 269-81.

2. Cuppels D, Kelman A. Evaluation of selective media for isolation of soft-rot bacteria from soil and plant tissue. *Phytopathology* 1973; 64:468-75.
3. Gilligan PH, Whittier S. *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Brevudimonas*, *Comamonas*, and *Acidovorax*. In: Murray PR et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 7<sup>a</sup> ed. Washington: ASM Press, 1999. p. 526-38.
4. Holt JG et al. Gram-negative aerobic/microaerophilic rods and cocci. In: Krieg NR, Holt JG, Berget DH, Sneath PHA. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9<sup>a</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p. 71-174.
5. Kiska DL, Gilligan PH *Pseudomonas*. In: Murray PR et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 7<sup>a</sup> ed. Washington: ASM Press, 1999. p. 517-25.
6. Schreckenberger PC, von Graevenitz A. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Methylobacterium*, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods. In: Murray PR et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 7<sup>a</sup> ed. Washington: ASM Press, 1999. p. 539-60.
7. Farmer III J J. *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification. In: Murray PR et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 7<sup>a</sup> ed. Washington: ASM Press, 1999. p. 442-58.
8. Koneman EW et al. *Enterobacteriaceae*. In Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC. *Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido*. 2<sup>a</sup> ed. S. Paulo: Panamericana, 1993. p.61 - 132.
9. Holding AJ. The properties and classification of the predominant Gram-negative bacteria occurring in soil. *J Appl Bacteriol* 1960; 23 (3):515-25.
10. Abbott S. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, and *Serratia*. In: Murray PR et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 7<sup>a</sup> ed. Washington: ASM Press; 1999. p. 475-82.
11. Goñi-Urriza M et al. Impact of an Urban Effluent on Antibiotic Resistance of Riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66 (1):125-32.
12. Difco: DifcoManual - Medios de cultivo deshidratados y reactivos para microbiología. 10<sup>a</sup> ed. Madrid: Graficas letra, S. A., 1984. 1166 pp.
13. Pessoa GVA, Silva EAM. Meios de Rugai e Lisina-Motilidade combinados em um só tubo para identificação presuntiva de enterobactérias. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1972; 32: 97-100.
14. Koneman EW et al. Bacilos Gram negativos não fermentadores. In: Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC. *Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido*. 2<sup>a</sup> ed. S. Paulo: Panamericana, 1993. p. 133 - 97.
15. Sneath PHA. Bacterial classification. II. Numerical taxonomy. In: Krieg NR et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. p. 5-7.
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A6. NCCLS, Wayne, Pa. 1997.
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; Fourteenth Informational Supplement. Approved standard M 100-S14. NCCLS, Wayne, Pa. 2004.
18. Jorgensen JH et al. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: Murray PR et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 7<sup>a</sup> ed. Washington: ASM Press, 1999. p. 1526-43.
19. Khachatourians GG et al. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Can Med Assoc J* 1998; 59: 1129-36.
20. Meng J et al. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM isolated from animals, food, and humans. *J Food Prot* 1998; 61: 1511-4.
21. Guardabassi L et al. Antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. isolated from sewers receiving waste effluent from a hospital and a pharmaceutical plant. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64:3499-502.
22. Österblad M et al. Antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae* isolated from vegetables. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 503-9.
23. Timko J, Kmeč V. Susceptibility of *Enterobacteriaceae* from the Alpine Accentor *Prunella collaris*. *Acta Vet. Brno* 2003; 72: 285-8.
24. Calva JJ, Sufuentes-Osonio J, Ceren C. Antimicrobial resistance in fecal flora: longitudinal community-based surveillance of children from urban México. *Anticomb Agents Chemother* 1996; 40:1699-702.
25. Wenzel RP et al. In Vitro Susceptibilities of Gram-Negative Bacteria Isolated from Hospitalized Patients in Four European Countries, Canada, and the United States in 2000-2001 to Expanded-Spectrum Cephalosporins and Comparator Antimicrobials: Implications for Therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3089-98.
26. Schmidt AS et al. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 4908-15.
27. Arvanitidou M, Katsouyannopoulos V, Tsakris A. Antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from coastal bathing waters. *J Med Microbiol* 2001; 50:1001-5.
28. Lobova TI et al. Geographical and seasonal distribution of multiple antibiotic resistance of heterotrophic bacteria of Lake Shira. *Aquatic Ecology* 2002; 36: 299-307.
29. Martínez JL et al. Resistance to betalactam/clavulanate. *Lancet* 1987; 2: 147-53.
30. Page JWJ, Farmer TH, Elson SW. Hyperproduction of TEM-1 beta-lactamase by *Escherichia coli* strains. *J Antimicrob Chemother* 1989; 23: 160-1.
31. Visalli MA, Jacobs MR, Appelbaum PC. Susceptibilities of non-*Pseudomonas aeruginosa* Gram-negative nonfermentative rods to ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, D-ofloxacin, sparfloxacin, ceftazidime, piperacillin, piperacillin-tazobactam, trimethoprim-sulfamethoxazole, and imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 772-5.