

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**SAMARA REGINA MENDES DE MORAES**

**ESTUDO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DA MICROBIOTA  
AERÓBIA DO INTESTINO DE JUNDIÁ COMO POSSÍVEL  
BIOINDICADOR DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR  
ANTIMICROBIANOS**

*(STUDY OF AEROBIC GUT BACTERIA OF JUNDIÁ AS POSSIBLE  
ANTIMICROBIAL BIOINDICATORS OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION)*

**SÃO JOSÉ DOS PINHAIS**

**2015**

**SAMARA REGINA MENDES DE MORAES**

**ESTUDO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DA MICROBIOTA  
AERÓBIA DO INTESTINO DE JUNDIÁ COMO POSSÍVEL  
BIOINDICADOR DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR  
ANTIMICROBIANOS**

*(STUDY OF AEROBIC GUT BACTERIA OF JUNDIÁ AS POSSIBLE  
ANTIMICROBIAL BIOINDICATORS OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION)*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Maciel França Madeira.

**SÃO JOSÉ DOS PINHAIS**

**2015**

**TERMO DE APROVAÇÃO**  
**(Responsabilidade da Secretaria do PPGCA)**

**(Entregue pela secretaria)**

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	viii
<b>FORMATO DA DISSERTAÇÃO.....</b>	x
<b>RESUMO GERAL.....</b>	xi
<b>ABSTRACT.....</b>	xii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	xiii
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	xiv
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	xv
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	1
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	4
2.1 ANTIBIÓTICOS.....	4
2.1.1 Definições e breve histórico.....	4
2.1.2 Classificação dos antimicrobianos.....	5
2.1.3 Resistência a antibióticos.....	6
2.1.4 Uso de antibióticos.....	8
2.1.5 Antibióticos no meio ambiente.....	9
2.2 ASPECTOS HIDROLÓGICOS DA RMC.....	10
2.2.1 Locais de coleta dos peixes utilizados neste trabalho.....	10
2.2.1.1 Rio Barigui .....	11
2.2.1.2 Rio Pequeno .....	12
2.2.1.3 Laboratório de Pesquisa e Piscicultura - LAPEP .....	12
2.3 BIOLOGIA DO JUNDIÁ .....	13
2.4 MICROBIOTA INTESTINAL .....	15
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>3 UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO INTESTINO DE JUNDIÁ (<i>Rhamdia quelen</i>) COMO BIOINDICADORAS DA PRESENÇA DE ANTIMICROBIANOS NA ÁGUA.....</b>	18
Resumo.....	18
Abstract.....	19

3.1 INTRODUÇÃO.....	20
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.2.1 Coletas de peixes e amostras de água.....	21
3.2.2 Retirada do conteúdo intestinal.....	22
3.2.3 Diluição e plaqueamento do conteúdo intestinal e da água coletada...	22
3.2.4 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	23
3.2.5 Análise Estatística.....	24
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
3.4 CONCLUSÃO.....	35
<b>CAPÍTULO 4</b>	
<b>4 COMPARAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS NOS ANOS DE 2010 E 2013 A PARTIR DE AMOSTRAS DO INTESTINO DE JUNDIÁ (<i>Rhamdia quelen</i>) E DA ÁGUA ORIUNDAS DE AMBIENTES NATURAIS E DE CRIAÇÃO.....</b>	<b>36</b>
Resumo.....	36
Abstract.....	37
4.1 INTRODUÇÃO.....	38
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.2.1 Coleta e eutanásia dos animais.....	40
4.2.2 Isolamento bacteriano.....	41
4.2.3 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	42
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.4 CONCLUSÃO.....	46
<b>CAPÍTULO 5</b>	
<b>5 CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>
<b>APÊNDICES E ANEXOS.....</b>	<b>60</b>

Dedico este trabalho à minha filha Alícia Sarah de Moraes Boer, ao meu marido Leonardo Boer e a todas as pessoas que enxergam a pesquisa como uma forma de entender e melhorar o mundo em que vivemos.

“Deus dá a todos uma estrela. Uns fazem dela um sol. Outros nem conseguem vê-la” Helena Kolody.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, por tudo que representa na minha vida.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, por oportunizar o mestrado com direito a bolsa de estudos para funcionários.

Ao meu orientador, Dr. Humberto Maciel França Madeira, por aceitar-me como orientanda, cooptando com minha transformação em pesquisadora e ativando meu espírito de cientista. Por seu apoio financeiro, com recursos próprios, para o meu e outros projetos de colegas, dando assim a chance de realizarmos nossas pesquisas. Grata também por disponibilizar as instalações do Laboratório Genoma para o desenvolvimento do trabalho e a realização de todas as análises. Finalmente, por sua atitude compatível com a de um pai para seu filho, alimentando ainda mais a força de prosseguir para nos tornarmos mestres.

Às companheiras de trabalho, Daniela Romani Bonotto e Marlise Teresinha Mauerwerk. Por terem sido de imensa ajuda, companheiras para todos os desafios e conquistas, ficando horas a fio no laboratório, muitas vezes sem dormir, sempre animando cada fase dos trabalhos, dando força e discutindo os porquês do projeto. Agradeço às duas de coração!

À colega de trabalho Daiane Rodrigues Cabral, que apesar do pouco tempo que nos conhecemos, ajudou-me com o serviço de rotina, liberando-me para que eu pudesse finalizar o mestrado, além do incentivo e ânimo no trabalho de todos os dias.

Aos colegas de trabalho Carlos Murakami, Márcio Zukowski e Robson dos Santos, por toda ajuda, além de serem meus verdadeiros “anjos da guarda” em Curitiba. Também aos demais colegas de trabalho que me ajudaram no serviço, para que eu pudesse desenvolver as atividades vinculadas ao mestrado.

À professora e amiga Kung Darh Chi, pelo companheirismo, pelos ensinamentos de microbiologia proporcionados antes do início do mestrado e pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Microbiologia da Unidade Hospitalar de Animais de Companhia da PUCPR, onde iniciei meus estudos nesta área e que me levaram posteriormente a buscar uma nova etapa: o mestrado.

À professora Ana Paula Baldan e demais colaboradores do Laboratório de Pesquisa em Piscicultura da PUCPR – LAPEP, bem como ao colega Rafael Pinto, pela ajuda com a coleta de peixes no LAPEP e empréstimo de equipamentos para

medição de parâmetros ambientais dos locais de coleta e também pelos ensinamentos sobre piscicultura, métodos de pesca e abate.

A todos os PIBICs que ajudaram direta ou indiretamente no projeto, dentre eles: Elisa Santos de Andrade, William Klassen de Oliveira, Eloisa Canziani, Giovanna Cesaro, Dâmaris Cristine Marios dos Santos, e Paola Vitalino.

Ao meu gestor, Jaison Renato Elesbão, por flexibilizar minha dedicação ao serviço de forma a permitir a realização do mestrado, assim como pelo apoio em prosseguir.

À Elaine Cristina Malisak, pela ajuda constante, tanto no trabalho como nas horas de confidências - e muitas vezes desabafos - me apoiando e ajudando em tudo que pode. Obrigada pelo carinho e paciência.

À Irenice, por colaborar com o uso das instalações do laboratório NIMA para fazer a quantificação das amostras de DNA.

Ao Professor Saulo Weber, por toda a ajuda com as análises estatísticas, se empenhando muito em me fazer encontrar as respostas a partir dos dados, seu apoio teórico sobre escolha dos testes e o porquê de cada análise realizada.

À minha mãe, Liliam Gusso, meu tio José Francisco Gusso, meu irmão Thiago Vitor Mendes de Moraes, por todo apoio que me deram, seja na hora de pescar os peixes - a qualquer hora, em qualquer lugar - ou me ajudando com o material de pesca, com os veículos, e permanecendo comigo até altas horas, até conseguirmos o número ideal de peixes em cada coleta.

Agradeço novamente à Marlise Teresinha Mauerwerk, seu marido Fabio e sua filha Kelly, por participarem das coletas bem-sucedidas e malsucedidas também.

Ao aluno Marcus Pissaia e seu pai Darci Pissaia, por cederem um lugar para pesquisar em seu terreno particular e por me ajudarem com a pesca no local.

Agradeço imensamente ao meu marido Leonardo Boer, pelas noites que passou acordado comigo, pela força no dia-a-dia, por sempre estar do meu lado e me apoiar.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que me ajudaram, mesmo aqueles que por ventura eu tenha esquecido de nominar. A todos vocês, meu muito obrigado!



## **FORMATO DA DISSERTAÇÃO**

A presente dissertação é composta por capítulos.

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral dos objetivos de estudo desta dissertação.

O capítulo 2 trata-se de revisão de literatura.

O capítulo 3 e 4 são artigos que serão submetidos para publicação em periódico científico.

O Capítulo 5 finaliza esta dissertação com conclusões gerais deste trabalho e com sugestões para estudos futuros.

As referências de todos os capítulos se encontram em lista única ao final da dissertação.

## RESUMO GERAL

O aumento de bactérias resistentes a antibióticos é um problema mundial grave. Bactérias resistentes têm sido encontradas fora do ambiente hospitalar, estão sendo encontradas no meio ambiente. Os ambientes aquáticos representam um dos principais focos de contaminação. Este trabalho foi realizado para observar se existe a presença de bactérias resistentes a antibióticos na água, utilizando a microbiota intestinal de peixes jundiá (*Rhamdia quelen*), pescados em três locais distintos: Rio Pequeno, Rio Barigui e Laboratório de Pesquisa em Piscicultura da PUCPR. Para cada bactéria isolada desses peixes, foi realizado o teste de susceptibilidade pela técnica de disco-difusão (Kirby-Bauer), foram testados dez antibióticos: ampicilina, gentamicina, ertapenem, ácido nalidíxico, sulfametoxazol/trimetoprima, cefalotina, cefoxitina, ceftriaxona, cefepime e tetraciclina. A leitura dos halos foi interpretada utilizando o manual internacional CLSI (2013). Os resultados indicam que ao observar a microbiota intestinal do jundiá, há uma grande parcela de resistência bacteriana aos antibióticos testados, tendo em vista que, para cada um dos dez antibióticos, houve resistência observada em pelo menos dois dos três pontos de coleta estudados. Pode-se concluir que a microbiota intestinal do jundiá pode ser utilizada como possível bioindicadora da presença de antibiótico ou de bactéria resistente a ele na água, e que o perfil de susceptibilidade pode variar ao longo dos anos no mesmo rio.

**Palavras-chave:** Resistência a antibiótico, antibiótico na água, contaminação por antibiótico, jundiá.

## ABSTRACT

The resistant bacteria is a global problem. The aquatic environments are a major source of contamination. This work was carried out to see if there is the presence of antibiotic resistant bacteria on water, using the intestinal microbiota of catfish (*Rhamdia quelen*), fished in three places: Pequeno River, Barigui River and Research Laboratory of Fish Farming at PUCPR. For each bacteria isolated was through susceptibility testing with disk diffusion technique (Kirby-Bauer) of international handbook CLSI (2013), ten antibiotics were tested: ampicillin, gentamicin, ertapenem, nalidixic acid, sulfamethoxazole-trimethoprim, cephalothin, ceftiofuran, ceftiofuran, ceftriaxone, cefepime and tetracycline. The results indicate that there is a large proportion of bacterial resistance to antibiotics, considering that for each of the ten tested antibiotics was observed resistance to them in two of the three sampling points. Analyzing the results of this study, we conclude that the intestinal microbiota of catfish can be used as bio-indicator that there is the presence of the drug or resistant bacteria on water, and bacterial resistance to antibiotics in the environment can be changed to over the years.

**Keywords:** Antibiotic resistance, antibiotic in the water, antibiotic contamination, catfish.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Ampicilina
CFL	Cefalotina
CFO	Cefoxitina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPM	Cefepime
CRO	Ceftriaxona
ETP	Ertapenem
FAO	Food and Agriculture Organization
GEN	Gentamicina
IAP	Instituto Ambiental do Paraná
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
LAPEP	Laboratório de Pesquisa e Piscicultura da PUCPR
NAL	Ácido nalidíxico
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SUT	Sulfametoxazol-trimetoprima
TET	Tetraciclina
UFC	Unidades formadoras de colônia
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
GPS	Global Positioning System

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
Tabela 1. Data de coleta e parâmetros biométricos de peixes jundiás ( <i>Rhamdia quelen</i> ) coletados no Laboratório de Pesquisa e Piscicultura da PUCPR – LAPEP, Rio Barigui e Rio Pequeno.....	25
Tabela 2. Contagem de colônias de bactérias cultivadas em placas com ágar BHI inoculadas com conteúdo intestinal de peixes coletados no Rio Pequeno, Rio Barigui e Laboratório de Pesquisa em Piscicultura da PUCPR – LAPEP.....	26
Tabela 3. Relação de microrganismos da família Enterobacteriaceae intrinsecamente resistentes aos antibióticos ampicilina, cefalotina e tetraciclina.....	33

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Mapa hidrográfico das sub-bacias do Alto Iguaçu (Setas indicam o Rio Pequeno, o Rio Barigui e local aproximado do Rio Arujá).....	11
Figura 2. Mapa hidrográfico de São José dos Pinhais, com seus principais rios e afluentes com o Rio Pequeno e o Rio Arujá marcados por setas vermelhas.....	13
Figura 3. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas do intestino de jundiá ( <i>Rhamdia quelen</i> ) e da água, coletados no Rio Pequeno, em dezembro de 2013.....	26
Figura 4. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas do intestino de jundiá ( <i>Rhamdia quelen</i> ) e da água, coletados no Rio Barigui, em novembro de 2013.....	28
Figura 5. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas do intestino de jundiá ( <i>Rhamdia quelen</i> ) e da água, coletados no Laboratório de Pesquisa em Piscicultura da PUCPR – LAPEP, em julho de 2013.....	29
Figura 6. Ocorrência relativa de resistência antimicrobiana em amostras de bactérias isoladas do intestino de jundiá, oriundas do Laboratório de Pesquisa em Piscicultura da PUCPR – LAPEP, Rio Pequeno e Rio Barigui, no ano de 2013.....	30
Figura 7. Ocorrência relativa de resistência antimicrobiana de amostras de bactérias isoladas da água, oriundas do Laboratório de Pesquisa em Piscicultura da PUCPR – LAPEP, Rio Pequeno e Rio Barigui, no ano de 2013.....	31
Figura 8. Ocorrência relativa de resistência antimicrobiana de amostras de bactérias isoladas do intestino de jundiá, oriundas do Laboratório de Pesquisa em Piscicultura da PUCPR – LAPEP, Rio Pequeno e Rio Barigui, nos anos de 2010 e 2013.....	43

Figura 9. Ocorrência relativa de resistência antimicrobiana de amostras de bactérias isoladas da água, oriundas do Laboratório de Pesquisa em Piscicultura da PUCPR – LAPEP, Rio Pequeno e Rio Barigui, nos anos de 2010 e 2013..... 44

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO

O primeiro antibiótico descoberto foi a penicilina, por Alexander Fleming, em 1928 (Fleming, 1929). Em 1942, o método de purificar a penicilina é descoberto (Abraham e Chain, 1942; Florey e Jennings, 1942). Inicialmente, a penicilina passou a ser produzida em larga escala por indústrias inglesas e norte-americanas apenas para militares e, em 1944, para a população civil (Aminov, 2010). Durante a Segunda Guerra Mundial, os soldados feridos dificilmente sobreviviam por causa das infecções bacterianas, porém, com o uso da penicilina muitos soldados sobreviveram às infecções, provando a eficácia do antibiótico (Pereira e Pita, 2005).

A presença de alguns indícios de resistência bacteriana observados após os primeiros usos clínicos de sulfonamidas e da penicilina sugeriram que a resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos podia ser uma característica natural das espécies de bactérias, ou ser adquirida por cepas individuais dentro de uma população sensível (Tavares, 2000). Fleming (1929) descreveu em seu artigo da descoberta da penicilina que bactérias do grupo coli-tifoide e *Pseudomas aeruginosa* não eram inibidas pelo antibiótico.

O surgimento de bactérias multirresistentes foi um fenômeno que preocupou clínicos e a indústria farmacêutica, pois, era uma das principais causas de insucesso no tratamento de doenças infecciosas (Hirakata et al., 1998). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), dois terços de todos os antibióticos vendidos mundialmente, são vendidos sem prescrição, através de mercados privados não regulamentados. Quanto aos doentes, muitos deles não recebem a prescrição correta do medicamento, ou se recebem não cumprem o tratamento como prescrito (OMS, 2010).

Lançado pela OMS em 2014, o documento intitulado *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance* aponta que a resistência aos antimicrobianos em todo o mundo é uma ameaça crescente para o tratamento de uma gama cada vez maior de infecções causadas por bactérias, protozoários, vírus e fungos. A magnitude do problema da resistência antimicrobiana e do seu impacto sobre o setor de saúde e no âmbito social em todo o mundo ainda são desconhecidos.



A aceleração do fenômeno da resistência decorre do uso de drogas antimicrobianas ao longo das décadas, tanto para tratamento de doenças em humanos, como para prevenção e tratamento de doenças em animais de produção, favorecendo a seleção e a propagação de elementos genéticos de resistência aos antimicrobianos. Isto tem tornado os tratamentos disponíveis atualmente pouco eficientes ou muitas vezes ineficazes. Como consequência disso, urge aumentar rapidamente as opções de tratamento disponíveis. O problema é tão grave que no prefácio do documento já é citado: “Cada vez mais os governos de todo o mundo estão começando a prestar atenção a um problema tão grave que ameaça a medicina moderna: a era pós-antibiótico na qual ferimentos comuns e infecções leves poderão levar a óbito. Longe de ser uma fantasia apocalíptica, é uma possibilidade muito real para o século 21”. (WHO, 2014, tradução livre).

A água é um meio de disseminação de microrganismos resistentes, pois efluentes oriundos da ação humana, tais como nas formas de esgoto domiciliar e hospitalar, e da criação intensiva de animais de produção, são lançados constantemente no ambiente aquático. A resistência bacteriana a antibióticos tem sido observada nos mais diversos meios aquáticos: águas superficiais e costeiras, lagoas, oceanos, esgoto hospitalar e esgoto humano, além de água potável e de sedimento (Baquero et al., 2008). Concentrações subinibitórias de antibióticos na água podem levar ao aparecimento de resistências a eles em bactérias comensais do intestino humano, do intestino dos peixes, ou mesmo por bactérias aquáticas, com a possível disseminação de genes de resistência em diversas populações bacterianas (Gordon et al., 2007 e Gastalho et al., 2014).

Mauerwerk observou em seu trabalho sobre resistência em bactérias intestinais de peixes a antibióticos comparando ambientes naturais e de criação, que locais mais poluídos, ou seja, rios com maior ação antrópica ao seu entorno tendem a apresentar maior resistência bacteriana a antibióticos, e que o tipo de poluição parece ter influência no perfil de resistência bacteriana (Mauerwerk, 2012).

Os peixes são componentes dos ecossistemas aquáticos que podem refletir os distúrbios que ocorrem nesses ambientes, sendo vistos como excelentes indicadores das condições ambientais (Freitas e Souza, 2009). A hipótese do projeto onde se insere este trabalho é de que as bactérias da microbiota intestinal de peixes podem servir como bioindicadores da presença de antibióticos ou de bactérias resistentes na água. O jundiá é um peixe onívoro, de hábito bentônico, se alimentando das mais

diferentes fontes alimentares presentes no meio, incluindo o lodo. Seu contato permanente com a água e alimentos contendo antibióticos ou bactérias resistentes, pode contribuir para a ocorrência de resistência a antimicrobianos em sua microbiota intestinal, podendo esta servir de bioindicador da contaminação do ambiente aquático por esses agentes.

O objetivo deste trabalho foi o de comparar a resistência da microbiota intestinal de jundiá a dez antibióticos entre três locais de coleta: o Rio Pequeno, o Rio Barigui e o Laboratório de Pesquisa e Piscicultura da PUCPR – LAPEP, localizados na Região Metropolitana de Curitiba e que representam, respectivamente, um rio com pouca ação antrópica no seu entorno, elevada ação antrópica no entorno e um local de criação de peixes, no ano de 2013. Além disso, objetivou-se comparar esses resultados com os resultados da resistência da microbiota intestinal de jundiá a antibióticos observados em 2010, (Mauerwerk,2012), nesses mesmos locais, para observar a evolução do perfil de susceptibilidade no período. O trabalho pressupõe que o grau de ação antrópica no entorno do rio deve se refletir no grau de contaminação da água por antibióticos e, conseqüentemente, a presença de resistência a eles na microbiota intestinal dos peixes coletados.

## CAPÍTULO 2

### 2 REVISÃO DA LITERATURA

#### 2.1 – ANTIBIÓTICOS

##### 2.1.1 – DEFINIÇÃO E BREVE HISTÓRICO

Antimicrobianos são produtos elaborados durante o metabolismo microbiano que são capazes de inibir parcial ou totalmente a multiplicação e crescimento de microrganismos. (Campos et al., 2012; Melo et al., 2012, Barros et al., 2008).

Após a descoberta da penicilina por Fleming, a sua produção em larga escala foi possível graças aos avanços obtidos por Howard Florey e Ernest Chain, que a purificaram e demonstraram a validade de suas propriedades (Pereira e Pita, 2005).

Em meados da década de 1940, após ser inicialmente produzida apenas para uso em militares, a penicilina passou a ser produzida em larga escala por indústrias inglesas e norte-americanas também para a população civil (Aminov, 2010).

A penicilina juntamente com o salvarsan e o prontossil serviram de exemplo para configurar os paradigmas para futuras pesquisas de descobertas de novas drogas, o período entre 1950 e 1970 foi a época de ouro para a descoberta de novas classes de antibióticos, depois desse período houve um declínio da taxa de descoberta, onde o desenvolvimento de novas drogas para tratar organismos resistentes tem sido a modificação de antibióticos existentes (Chopra et al., 2002).

A busca por novos antibióticos é contínua e, como exemplo, recentemente, Ling e colaboradores descobriram um novo inibidor de parede celular extraído do microrganismo não cultivável *Eleftheria terrae*. A molécula se chama teixobactin, apresentando bons resultados contra bactérias Gram-positivas, mesmo para multirresistentes como o *Staphylococcus aureus* resistente a metilina – MRSA (Ling et al., 2015). A integração de uma equipe multidisciplinar com domínio de conhecimentos em microbiologia, química e bioinformática é necessária para a descoberta de novos agentes antimicrobianos de importância médica (Donadio et al., 2010).

O que se preconiza na utilização dos novos antimicrobianos é seu uso racional, a fim de não induzir a padrões de resistência, reservando-os para pacientes que não podem ser tratados com as terapias convencionais, por problemas de toxicidade e

hipersensibilidade, ou resistência documentada a outros fatores específicos (Caierão et al., 2004).

### 2.1.2 – CLASSES DE ANTIMICROBIANOS

Usualmente os antimicrobianos são classificados em grupos a partir de critérios como organismo-alvo, origem, tipo de efeito mecanismo de ação e estrutura química.

No que se refere a organismos-alvo, os antimicrobianos dividem-se em grandes classes de microrganismos susceptíveis, incluindo antibacterianos, antifúngicos, antivirais e antiparasitários (Barros et al., 2008). Os antibióticos podem ser de pequeno ou amplo espectro de ação. Os de pequeno espectro são ativos contra um ou apenas alguns microrganismos. a exemplo da vancomicina, que é usada para inibir o crescimento de cocos gram-positivos, principalmente estafilococos e enterococos. Os de amplo espectro são ativos contra vários grupos de microrganismos, a exemplo, das tetraciclina, que são ativas contra diversos bacilos gram-negativos, clamídias, micoplasmas e *Rickettsia* (Levinson, 2010).

A classificação de antimicrobianos quanto à origem abrange os antibióticos e os quimioterápicos. Antibióticos são moléculas produzidas por microrganismos capazes de agir na lise ou inibição de crescimento de outros microrganismos. Quimioterápicos são substâncias químicas sintéticas ou de origem vegetal, que possuem pequena toxicidade para as células normais do hospedeiro e elevado poder lesivo sobre os agentes patogênicos (Batista e Gomes, 2010).

A classificação dos antimicrobianos em bactericidas, que causam a morte das bactérias, e bacteriostáticos, que inibem o seu crescimento, referem-se ao tipo de efeito. Nomenclatura semelhante é utilizada no controle de fungos e vírus: fungicidas e fungistáticos, virucidas e virustáticos, respectivamente (Barros et al., 2008).

A classificação dos antibióticos por mecanismo de ação refere-se à forma como interferem nos processos metabólicos dos microrganismos, incluindo ação sobre a parede celular, membrana citoplasmática e a replicação cromossômica, bem como inibição da síntese proteica e inibição do metabolismo intermediário (Barros et al., 2008).

Os antibióticos são produtos químicos de origem natural ou artificial e também podem ser divididos em diferentes classes de acordo com a estrutura molecular, tais

como aminoglicosídeos, quinolonas, tetraciclina, macrolídeos, sulfonamidas e  $\beta$ -lactâmicos (Kümmerer, 2009)

A toxicidade seletiva, ou seja, a inibição seletiva do crescimento do microrganismo sem danos ao hospedeiro, é um dos fatores mais importantes na terapia antimicrobiana (Levinson, 2010). Outro fator importante a ser considerado, é que para que o antimicrobiano exerça sua atividade, ele deve atingir a concentração ideal no local da infecção, ser capaz de atravessar de forma passiva ou ativa a parede celular, apresentar afinidade por sítios de ligação no interior da bactéria, e permanecer tempo suficiente para exercer seu efeito inibitório (Anvisa, 2015).

O rim é o órgão mais importante para a excreção dos fármacos e seus metabólitos na urina pelos processos de filtração glomerular, secreção tubular ativa e reabsorção tubular passiva. As substâncias excretadas nas fezes são predominantemente fármacos ingeridos por via oral que não foram absorvidos, ou metabólitos dos fármacos excretados na bile ou secretados diretamente no trato intestinal e que não foram reabsorvidos (Brunton et al., 2012)

### **2.1.3 – RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS**

A resistência de um microrganismo à determinada droga pode ser classificada inicialmente como intrínseca ou adquirida. Aquela que faz parte das características naturais, fenotípicas do microrganismo, transmitida apenas verticalmente é chamada de resistência intrínseca, fazendo parte da herança genética do microrganismo. Por outro lado, a resistência adquirida, ocorre quando há o aparecimento de resistência em uma espécie bacteriana anteriormente sensível a droga em questão; é uma “nova” característica manifestada na espécie bacteriana, características essas ausentes nas células progenitoras. Essa nova propriedade é o resultado de alterações estruturais e bioquímicas da célula bacteriana, determinada por alterações genéticas cromossômicas ou extracromossômicas (plasmídeos). Uma simples alteração genética pode levar ao aparecimento de um exemplar muito resistente, que normalmente não perde viabilidade e patogenicidade (Fio et al., 2000).

O conceito de resistência bacteriana pode ser muito amplo, em especial se considerados os aspectos clínicos e laboratoriais do uso de antibióticos. A expressão “resistente” (a partir de resultado laboratorial do teste do antibiótico contra a bactéria) significa que o germe tem a capacidade de crescer *in vitro* em presença da

concentração que essa droga atinge no sangue, ou seja, o conceito é dose-dependente. No entanto, a concentração sanguínea de vários antibióticos é muito inferior à concentração alcançada pelo mesmo antibiótico em outros líquidos ou tecidos corpóreos, como a urina. Assim, uma bactéria pode ser “resistente” a um determinado antibiótico quando ela está presente na corrente sanguínea, mas “sensível” quando está nas vias urinárias. O inverso também pode ocorrer quando uma bactéria “sensível” se localiza em uma região anatômica na qual o antibiótico não alcança a concentração adequada (Barros et al., 2008).

A aquisição de resistência pode aparecer por mutação, resistência transferível, transformação, transdução, conjugação e transposição. A partir desses mecanismos, as bactérias podem adquirir e transferir resistência a outras bactérias, passando a elas a propriedade de defesa contra determinada droga. Não há necessidade de patogenicidade do microrganismo para que carregue genes de resistência, ao contrário, bactérias da microbiota normalmente são as que carregam maior quantidade de genes de resistência a uma ou mais drogas (Fio et al., 2000).

Segundo (SBI, 2010) “Anualmente, dois milhões de pessoas são infectadas por bactérias multirresistentes nos Estados Unidos, o que resulta em 88 mil mortes por ano. Além disso, são gastos US\$ 4,4 bilhões para controlar a disseminação dessas bactérias”. O mesmo autor discorre sobre a disseminação de bactérias multirresistentes no Brasil e cita que, a mutação genética e a aquisição de genes por transferência têm contribuído para o aparecimento de resistência aos antimicrobianos.

O uso indiscriminado e irresponsável de antibióticos seja na terapêutica ou profilaticamente, tanto para uso veterinário quanto humano tem favorecido a pressão de seleção e a predominância cada vez maior de bactérias cada vez mais resistentes (Fio et al., 2000).

Estudos recentes têm apontado para a microbiota gastrintestinal como sítio de disseminação de resistência a antimicrobianos. A transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos no trato digestivo foi inicialmente comprovada em humanos, envolvendo resistência à tetraciclina em *Bacteroides* spp. (Shoemaker et al., 2001).

A exposição a antibióticos em concentrações subinibitórias pode, também, levar ao aparecimento de resistência em bactérias comensais do intestino humano, em bactérias do intestino de peixes e aquáticas com possível disseminação de genes

de resistência em diversas populações bacterianas (Gordon et al., 2007). As bactérias comensais podem transferir a sua resistência para bactérias patogênicas servindo como reservatórios de genes de resistência (Aarestrup, 2006).

#### **2.1.4 – USO DE ANTIBIÓTICOS**

O uso excessivo de antibióticos na produção animal, na saúde humana e na saúde animal vem se tornando um dos principais problemas de saúde pública e o uso de antibióticos nos últimos 50 anos tem resultado em um aumento de bactérias comensais e patogênicas resistentes a compostos antimicrobianos (Rivera-Tapia, 2003).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos causa importante impacto econômico. Infecções causadas por bactérias resistentes estão relacionadas com o maior tempo de permanência dos pacientes nos hospitais, maiores custos hospitalares e taxas elevadas de mortalidade, quando comparadas com as infecções causada por bactérias sensíveis (Shales et al., 1997).

O comércio de antibióticos movimentou no Brasil R\$1,6 bilhões em 2009. O uso indiscriminado de antibióticos em países em desenvolvimento para o tratamento de infecções agudas das vias respiratórias aumenta em média 36% os custos do tratamento. Os países poderiam reduzir em cinco por cento suas despesas com saúde se reduzissem os gastos supérfluos com medicamentos. A venda de antibióticos sem prescrição médica, feita por mercados privados não regulamentados chega a dois terços de todos os antibióticos vendidos no mundo (OMS, 2010).

No Brasil, não havia maior controle na comercialização e uso de antibióticos, até que, em 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) estabeleceu que deve haver a obrigatoriedade da apresentação e retenção da receita médica do paciente na venda do produto. Em casos de uso prolongado do medicamento o consumidor deve voltar à farmácia mensalmente para obter o medicamento, não podendo adquirir toda a quantidade necessária do antibiótico de uma só vez. Ao fim da validade da receita, o paciente deve passar por uma nova consulta a fim de avaliar a necessidade de continuidade do tratamento. Em 2013, as farmácias passaram a alimentar obrigatoriamente uma base de dados única com detalhes da receita e do tratamento, além do nome do médico e do paciente para avaliações futuras sobre o uso de antibióticos no país (Stephens, 2014).

Dados não publicados de Mauerwerk (2012) apontam para a influência do nível antrópico na região de influência de cursos d'água sobre a presença de resistência a antimicrobianos de cepas aeróbias isoladas do trato digestório de peixes de água doce. Amostras dos rios Pequeno, Barigui, e de criatório de peixes, na Região Metropolitana de Curitiba, representando diferentes níveis de poluição foram analisados, e dos antibióticos testados, a ampicilina apresentou o maior número de cepas resistentes, enquanto o cefepime não apresentou nenhuma cepa resistente. Quanto aos grupos taxonômicos, a família *Pleisiomonadaceae* apresentou maior ocorrência de resistência, enquanto que a *Aeromonadaceae* foi a que apresentou menor ocorrência.

### **2.1.5 – ANTIBIÓTICOS NO MEIO AMBIENTE**

A resistência aos antibióticos tem sido observada em rios e em vários ambientes aquáticos como águas superficiais, águas costeiras, lagoas, oceanos, água potável, sedimentos, esgoto hospitalar e esgoto humano. A água constitui um meio de disseminação de organismos resistentes aos antibióticos entre populações humana e animal (Baquero et al., 2008). Os antibióticos exercem uma pressão seletiva no meio aquático, podendo permanecer nesse ambiente por longos períodos (Cabello, 2006).

É estimado que 70% dos antibióticos são liberados na urina sem serem metabolizados no organismo do paciente. Os efluentes contaminados com essas descargas de antibiótico são rotineiramente descartados no esgoto. Os efluentes hospitalares são comprovadamente compostos por resíduos de antibióticos, mas os efluentes domésticos também contêm antibióticos e são despejados nos rios (Kümmerer, 2004).

Em 1998 na Alemanha do total de 412 toneladas de antibióticos utilizadas, calcula-se que 305 toneladas foram emitidas para as águas residuais, excretadas inalteradamente no ambiente, ou seja, na forma de compostos ainda ativos dos quais 92 toneladas foram provenientes de hospitais (Kümmerer & Henninger, 2003; Kümmerer, 2009). A ampicilina foi encontrada em concentrações entre 20 e 80 mg/L no efluente de um grande hospital alemão (Kümmerer, 2001)

O consumo anual de antibióticos está estimado entre 100.000 e 200.000 toneladas em nível global (Kümmerer, 2003). A principal via de entrada de antibióticos



no meio ambiente se dá pelo uso de fármacos em criações intensivas de animais de produção (bovinos, suínos e aves) e na aquicultura, podendo ocasionar a contaminação tanto de ambientes aquáticos quanto ambientes terrestres. É estimado que 70% dos produtos veterinários utilizados na produção animal sejam antibióticos (Reginato e Leal, 2010).

## **2.2 – ASPECTOS HIDROLÓGICOS DA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA - RMC**

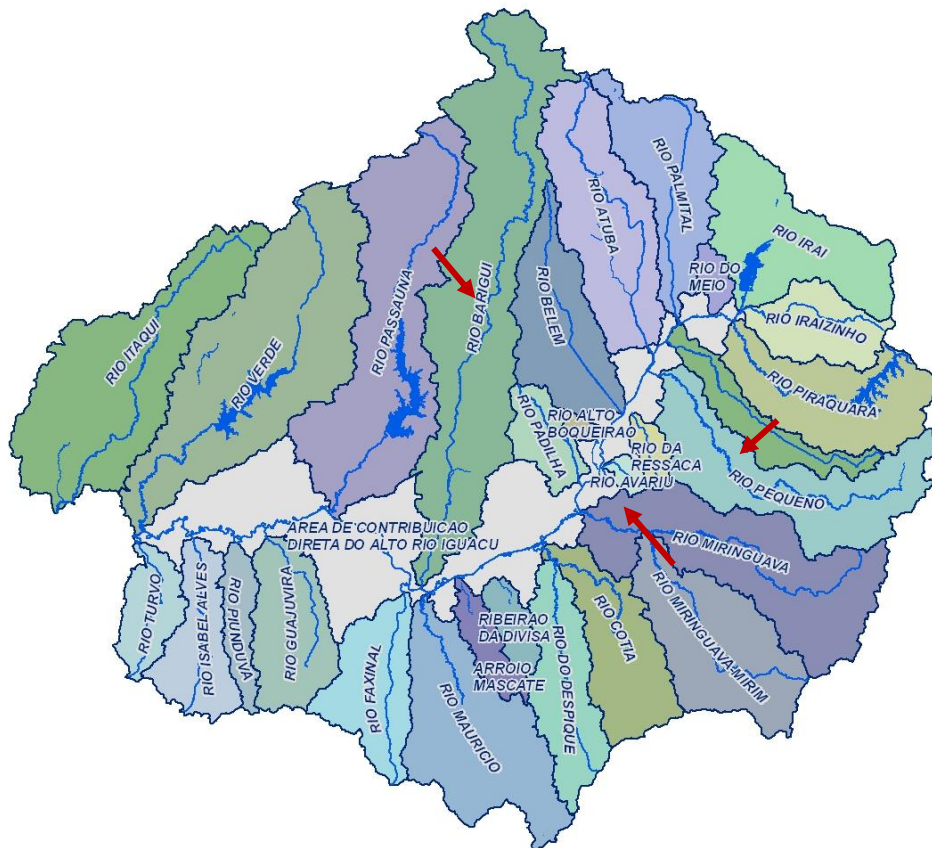
A Região Metropolitana de Curitiba (RMC) está localizada próxima as cabeceiras da Bacia do Iguaçu, na Serra do Mar, que é o seu principal manancial de abastecimento. (Andreoli et al., 2000). A RMC é composta por 29 Municípios, com 16.581,21 km<sup>2</sup> de extensão, e 3.223.836 habitantes (COMEC, 2015).

As principais bacias que abastecem a RMC são as bacias do Alto e Altíssimo Iguaçu. A Bacia do Alto Iguaçu é constituída pelos Mananciais: Miringuava, Rio de Campina e Cerro Azul, Rio Cotia/Despique, Rio Alto Maurício, Rio das Onças (Mandirituba), Rio Faxinal, Rio das Onças (Contenda), Rio Guajuvira, Rio Pianduva, Rio Passauna, Rio Verde, e Rio Itaqui. Já A Bacia do Altíssimo Iguaçu é constituída pelos mananciais: Irai, Iraizinho, do Meio, Palmital, Itaqui, Pequeno e Piraquara (Andreoli et al., 2000).

### **2.2.1 – LOCAIS DE COLETA DOS PEIXES UTILIZADOS NESTE TRABALHO**

O Rio Barigui e o Rio Pequeno e o Rio Arujá (que abastece o Laboratório de Pesquisa em Piscicultura da PUCPR – LAPEP) encontram-se na Bacia do Alto-Iguaçu. A figura 1 mostra o mapa das sub-bacias do Alto Iguaçu com os dois rios indicados por setas vermelhas.

**Figura 1. Mapa hidrográfico das sub-bacias do Alto Iguaçu. (Setas indicam o Rio Pequeno, o Rio Barigui e local aproximado do Rio Arujá).**



Fonte: Adaptado de Sudehrsa (2000).

### 2.2.1.1 – RIO BARIGUI

Segundo SUDERHSA (2002), o Rio Barigui é afluente do Rio Iguaçu, tendo suas nascentes no Município de Almirante Tamandaré (ao norte da Região Metropolitana de Curitiba). A bacia do Rio Barigui tem área de 267 km<sup>2</sup> abrangendo parte dos Municípios de Almirante Tamandaré, Curitiba e Araucária. Na região montante da Bacia do Barigui, no Município de Almirante Tamandaré predomina o uso rural do solo com a ocorrência de alguns núcleos urbanos. Em Curitiba a ocupação urbana é predominante, sendo os principais usos da água o residencial, por comércio e serviços. Na região sul do rio, margeada pelo município de Araucária, predomina o uso industrial das águas. A extremidade Jusante da Bacia é de uso predominantemente rural.

Conforme portaria SUREHMA N°020/92 de 12 de maio de 1992, Artigo 2º, inciso VII, o Rio Barigui pertence a classe 3 do CONAMA 357. O Rio Barigui percorre 66 km desde sua nascente em Almirante Tamandaré até sua foz no rio Iguaçu. Em Curitiba passa pelos parques Aníbal Khury, Tanguá, Tingui e Barigui e nele ocorrem diferentes influências urbanas: de estação de tratamento de esgoto, aterro sanitário e de efluentes industriais e domésticos, estes muitas vezes clandestinos (Dellatorre et al., 2014).

Alguns dos principais gêneros da atividade industrial presentes em sua área de abrangência estão os produtos minerais não metálicos, metalurgia, mecânica, materiais elétricos, de transporte e de comunicação, química, papel, têxtil, editorial e gráfica. A Bacia do Rio Barigui reflete os efeitos impactantes dos processos de ocupação do solo (Villa, 2005).

#### 2.2.1.2 – RIO PEQUENO

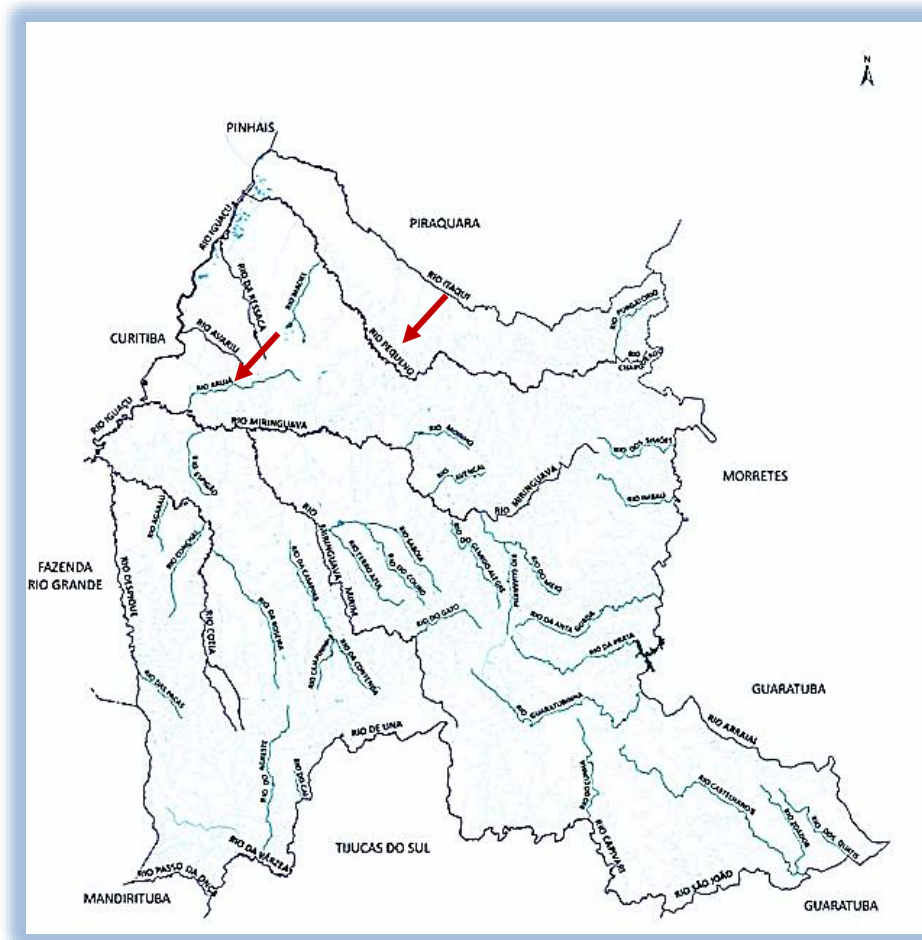
A bacia do rio Pequeno está localizada no Primeiro Planalto Paranaense, no Município de São José dos Pinhais, na RMC. Apresenta área total de drenagem de 134 km<sup>2</sup>, com as nascentes localizadas na encosta ocidental da Serra do Mar, desaguando no rio Iguaçu. Possui áreas de preservação permanente correspondente a mata ciliar com área de 21 km<sup>2</sup> que equivale a 20% da área total da bacia (Santos e Kobiyama, 2008).

#### 2.2.1.3 – LAPEP – Laboratório de Pesquisa em Piscicultura da PUCPR

O Laboratório de Pesquisa e Piscicultura da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (LAPEP/PUCPR) possui a localização GPS (25°34'55"S e 49°13'19"W), é um criatório de peixes, abastecido pelo rio Arujá que desemboca no Rio Miringuava.

O LAPEP desenvolve projetos de pesquisa e produção de espécies nativas com enfoque especial no jundiá (*Rhamdia quelen*) desde o ano de 2001.

**Figura 2. Mapa hidrográfico de São José dos Pinhais com os principais rios e afluentes com o Rio Pequeno e o Rio Arujá marcados por setas vermelhas.**



Fonte: Adaptado de Prefeitura Municipal de São José dos Pinhais (2015).

### **2.3 – BIOLOGIA DO JUNDIÁ**

O peixe jundiá é um animal euritérmico (Chippari Gomes, 1998) e onívoro, no ambiente natural tem como fontes alimentares crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos (Guedes, 1980), entre outras, com forte tendência a piscivoria (Gomes et al., 2000; Gomiero et al., 2007). É uma espécie generalista na escolha pelo alimento, não se restringindo apenas ao habitat bentônico dos rios. Possui hábito noturno e habita locais profundos dos rios, preferindo os ambientes de água mais calma junto à margem e vegetação dos rios com fundo de areia e lama (Guedes, 1980). É uma espécie ovulípara, os cardumes costumam desovar em locais do rio com fundo pedregoso e com água rasa, limpa e pouco corrente (Godinho et al., 1978). O período reprodutivo pode variar a cada ano e de um lugar para outro (Godinho et

al., 1978). A maturidade sexual é atingida por volta de um ano de idade nos dois sexos, os machos iniciam o processo de maturação gonadal com 13,4 cm e as fêmeas com 16,5 cm. Acima de 16,5 cm e 17,5 cm machos e fêmeas estão potencialmente aptos para reprodução (Narahara et al., 1985). Tem um desenvolvimento embrionário rápido de 3 a 5 dias (Gomes et al., 2000). É uma espécie estuarina, os alevinos suportam até 9 g/l de sal na água por 96 horas e suportam pH na faixa de 4,0 a 8,5 (Marchioro, 1997), o melhor crescimento das larvas desta espécie se dá na faixa de pH entre 8,0 e 8,5 (Lopes, 1998). A taxa de crescimento dos machos é maior do que o das fêmeas até o terceiro ou quarto ano de vida, quando as fêmeas passam a crescer mais rapidamente. O comprimento assintótico das fêmeas é de 65,5 cm e dos machos 52 cm. O tempo de vida teórico das fêmeas é de 21 anos enquanto que o dos machos é de 11 anos (Weis, 1980). É uma espécie de distribuição neotropical, encontrado do sudoeste do México até o Sul da Argentina (Silfvergrip, 1996).

O jundiá possui a capacidade de armazenar o alimento por um período mais longo do que outros peixes. Carneiro e Mikos (2005) demonstraram em seu experimento com frequência alimentar de jundiá, que não importa se ele é alimentado uma ou quatro vezes durante o dia, os resultados em ganho de peso são muito próximos nos dois casos.

São peixes que suportam diferentes concentrações de oxigênio dissolvido. Mafezzolli e Nuñez (2006) testaram diferentes concentrações de oxigênio dissolvido no crescimento de alevinos. O crescimento desses peixes em peso e comprimento tem relação direta com o aumento da concentração de oxigênio dissolvido e relação inversa para a conversão alimentar, 5,4 mg/L de Oxigênio dissolvido na água foi segundo o estudo a concentração que proporcionou os melhores efeitos sobre o desenvolvimento do jundiá. Outro fator importante a ser lembrado neste estudo foi que mesmo em concentrações baixas de oxigênio dissolvido na água o consumo de alimentos foi o mesmo do que o consumo em altas concentrações, porém, em baixa concentração o crescimento dos alevinos foi menor.

## 2.4 – MICROBIOTA INTESTINAL

A composição, diversidade e colonização microbiana do trato digestório de peixes é complexa, podendo ser um reflexo da composição da água de criação, da dieta, e do ambiente onde o animal vive (Ringo et al., 2006; Fjellheim et al., 2007). É composta por bactérias aeróbias, anaeróbias facultativas e anaeróbias obrigatórias (Ringo e Olsen, 1999). As funções da microbiota intestinal de peixes não são tão estudadas quanto a microbiota intestinal de humanos e de animais homeotérmicos (Hovda et al., 2007). Porém presume-se que a microbiota intestinal de peixes, desempenhe funções semelhantes aos animais homeotérmicos e terrestres, mesmo que a densidade populacional de peixes seja menor do que nos outros animais (Navarret et al., 2010).

Existe uma relação simbiótica entre a microbiota intestinal residente e o hospedeiro (Hooper e Gordon, 2001), alguns dos benefícios incluem o metabolismo de nutrientes e substratos orgânicos e a resistência a colonização por microorganismos estranhos (Bauer et al., 2006).

O trato digestório de peixes no momento da eclosão dos ovos é escasso em populações bacterianas, porém após a eclosão é rapidamente colonizado por bactérias presentes na água e no sedimento (Austin, 2002).

O trato digestório dos peixes é colonizado por um grande número de bactérias heterotróficas (Cahill 1990; Hansen 1999; Sugita et al 1997, e Trust et al 1979). Em geral os organismos mais frequentes do trato de peixes de água doce são *Aeromonas* spp, *Flavobacterium* e *Pseudomonas* spp. (Ringo e Birkbeck, 1999). A maioria das bactérias encontradas em estudos da microbiota intestinal de peixes são bactérias Gram-negativas (Makino et al., 2012, Ringo e Gatesoupe, 1998), porém a presença de Gram-positivas também é comum, incluindo diferentes espécies de bactérias ácido lácticas (Ringo e Gatesoupe, 1998). Segundo Hagi et al (2004) existem alterações sazonais na comunidade de bactérias ácido lácticas no trato gastrointestinal de peixes de água doce. Os gêneros *Bifidobacteria*, *Bacteroides*, e *Eubacterium* típicos de animais endotérmicos são raros ou ausentes em peixes (Isolauri et al., 2004).

Mauerwerk (2012) encontrou 31 espécies de bactérias isoladas do intestino de jundiá, e identificadas por kit de identificação fenotípica: *Aeromonas hydrophila*, *Bergeyella zoohelcum*, *Bordetella bronchiseptica*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Chromobacterium violaceum*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter*

*amalonaticus*, *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella ozeanae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Kluyvera kriocrescens*, *Morganella morganii*, *Pleisiomonas shigelloides*, *Proteus vulgaris*, *Providencia alcalifaciens*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Rahnella aquatilis*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis* biotipo *paratyphi A*, *Salmonella* grupo 3a, *Serratia liquefaciens*, *Shigella sonnei*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Vibrio parahaemolyticus*. Austin (2002) em seu artigo de microflora de peixe citou uma gama de microrganismos associados ao trato digestório de peixes de água doce: *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Eikenella*, *Bacteroides*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*, *Cytophaga/Flexibacter*, *Bacillus*, *Listeria*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Moraxella* e *Pseudomonas*.

Geralmente, a densidade populacional de bactérias é maior no intestino dos peixes do que na água circundante, o número de bactérias totais presentes é variável, como exemplo, peixes de profundidade podem conter segundo Austin (2002) entre  $1,1 \times 10^6$  a  $3,6 \times 10^8$  UFC g<sup>-1</sup>. A microbiota intestinal de peixes é importante, pois, possui um efeito simbiótico que ajuda na nutrição e saúde do hospedeiro, o trato gastrointestinal também pode ser uma das principais vias de infecção dos peixes (Burr et al., 2005). Nutricionalmente, a microbiota pode estar associada à síntese de vitaminas e outros nutrientes, e a maior eficiência na digestão (Ringo e Birkbeck, 1999). Bactérias intestinais residentes podem produzir enzimas extracelulares que auxiliam o processo de decomposição alimentar (Cahil, 1990).

Há fortes motivos para acreditar que a resistência a antibióticos da microbiota do trato gastrointestinal de peixes pode ser utilizada como um bioindicador da carga de antibióticos utilizada por adensamentos populacionais humanos.

Estudando o lago de aquicultura marinha contendo peixe robalo (*Dicentrarchus labrax*), ostras (*Crassostrea gigas*) e mexilhões de Manila (*Ruditapes philippinarum*), e utilizando a dieta do robalo que continha o antibiótico ácido oxolínico, um quinolônico de primeira geração, monitorou o aumento da resistência ao antibiótico por *Vibrio* spp. Os resultados mostraram que a seleção no sentido de aumentar a resistência ao ácido oxolínico foi observada no intestino do peixe, mas não nos bivalvos ou no sedimento do lago (Giraud et al., 2006). Em um trabalho que avaliou o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nylo, foi utilizada a microbiota intestinal de três peixes com peso médio de 300g e

água dos tanques, para comparar a presença de resistência a antibióticos em tanques de alvenaria, tanques de terra escavado com arraçoamento e tanques de terra escavado sem arraçoamento, testando os antibióticos: ampicilina (10µg), cefuroxima (30µg), cloranfenicol (30µg), eritromicina (5µg), gentamicina (10µg), nitrofurantoína (300µg), norfloxacina (10µg), tetraciclina (30µg) e sulfonamidas (300µg), e pôde chegar a conclusão de que provavelmente a alimentação das tilápias e o tipo do tanque de cultivo não influenciaram o perfil de resistência dos microrganismos (Carneiro et al., 2007).

Martins (2005) observou a proliferação de *Aeromonas* no Rio Bacanga em São Luiz/Maranhão, utilizando amostras de água e peixes: Bagre (*Pimelodus maculatus*), Tainha (*Mugil cephalus*), Solha (*Pleuronectes platessa*), Prata (*Hemigrammus rodwayi*) e Sardinha (*Opisthonema oglinum*), concluindo o trabalho que o estuário do rio Bacanga encontra-se contaminado com *Aeromonas* em razão de atuar como uma bacia de recepção de esgotos da cidade, e ao avaliar o perfil de susceptibilidade das *Aeromoas* aos antibióticos: ampicilina (AMP) (10µg), tetraciclina (TET) (30µg), cefotaxima (CTX) (30µg), lincomicina (LIN) (2µg), cloranfenicol (CLO) (30µg), gentamicina (GEN) (10µg), cefalotina (CFL) (30µg), sulfazotrin (SUT) (25µg), ácido pipemídico (PIP) (20µg), vancomicina (VAN) (30µg), oxacilina (OXA) (1µg) e eritromicina (ERI) (15µg). Encontrou de um modo geral cepas de *Aeromonas* sensíveis a antibióticos, mas, 100% das cepas testadas apresentaram resistência a ampicilina.



## CAPÍTULO 3

### UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DO INTESTINO DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) COMO BIOINDICADORAS DA PRESENÇA DE ANTIMICROBIANOS NA ÁGUA

*(Utilization of catfish gut bacterial as an antibiotic bioindicator on water)*

#### RESUMO

A contaminação ambiental por antibióticos se dá principalmente em ambientes aquáticos através do despejo de efluentes de criação intensiva de animais de produção, domésticos e hospitalares contaminados com antibióticos ou bactérias resistentes. O objetivo deste artigo foi tentar observar se a microbiota intestinal de peixe jundiá (*Rhamdia quelen*) pode ser usada como bioindicadora de contaminação ambiental por antimicrobianos na água. Para tanto foram coletados peixes jundiá (*Rhamdia quelen*) de três rios, localizados no Paraná, Brasil: Rio Barigui, Rio Pequeno e um criatório de peixes, para comparar se há bactérias do intestino desses peixes que apresentem resistência a antibióticos, para indicar se esses pontos estão contaminados com antibióticos ou bactérias resistentes na água. Os antibióticos testados foram ampicilina, gentamicina, ácido nalidíxico, sulfametaxazol-trimetoprim, tetraciclina, ertapenem, cefalexina, ceftioxina, cefepime e ceftriaxona. O método usado para avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, foi o método de disco-difusão (Kirby-Bauer), realizado e interpretado segundo as normas do manual internacional CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute (2013). Os resultados indicam que existe resistência antimicrobiana das bactérias do intestino dos peixes analisados nos 3 pontos coletados. E que de todos os antibióticos analisados, foram encontradas bactérias resistentes a todos eles em pelo menos dois pontos de coleta.

**Palavras-chave:** Resistência a antibiótico, antibiótico na água, contaminação por antibiótico, antimicrobiano, jundiá.

## ABSTRACT

Bacterial antibiotic resistance is a major global problem because of failure in the treatment of infectious diseases, the therapeutic failure of antibiotics against resistant bacteria. Environmental contamination by antibiotics is mainly in aquatic environments through the dumping or eviction of farm animal waste, domestic and hospital waste contaminated with antibiotics. The purpose of this article was to try to see if the intestinal tract of catfish fish (*Rhamdia quelen*) can be used as bio-indicator of environmental contamination by antibiotics in the water. Therefore, we collected catfish fish (*Rhamdia quelen*) Three Rivers, located in Parana, Brazil: Rio Barigui, Little River and breeding of fish, to compare if there are bacteria in the gut those fish showing resistance to antibiotics, to indicate whether these spots are contaminated with antibiotic-resistant bacteria, or in water. Antibiotics tested were ampicillin, gentamicin, nalidixic acid, trimethoprim sulfamethoxazole, tetracycline, ertapenem, cephalexin, ceftiofur, cefepime and ceftriaxone. The method used to evaluate the profile of antimicrobial susceptibility, was the disk-diffusion method (Kirby-Bauer), performed and interpreted according to the rules of international manual CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (2013). The results indicate antimicrobial resistance of fish gut bacteria examined in three points listed. And what of all antibiotics analyzed were found bacteria resistant to all of them in at least two collection points.

**Keywords:** Antibiotic resistance, antibiotic in the water, antibiotic contamination, catfish.

### 3.1 INTRODUÇÃO

O advento da era dos antibióticos se iniciou com a descoberta da penicilina, sua comprovação de eficácia, sua purificação e produção em larga escala. Desde então, dezenas de outros antibióticos vêm sendo produzidos e utilizados massivamente. Por causa do uso descontrolado de antimicrobianos, os índices de resistência bacteriana aumentaram, se tornando hoje em um dos principais problemas para cura terapêutica de infecções bacterianas, pois, muitas vezes, o tratamento com antibióticos se torna ineficiente pela presença de bactérias multirresistentes (Caierão et al. 2004). A resistência bacteriana aos antimicrobianos se tornou um problema tão sério que a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou, em 2014, no seu relatório anual de vigilância sobre resistência a antibióticos, que estamos próximos de viver a “era pós antibiótico”, onde ferimentos comuns e infecções leves poderão levar a morte (WHO, 2014).

O meio ambiente tem sido um reservatório de microrganismos resistentes. Muitos dos antibióticos administrados em animais não são plenamente metabolizados, sendo excretados os compostos originais ou parcialmente metabolizados na urina e nas fezes (Reginato e Leal, 2010). Além disso, uma parte significativa dos fármacos utilizados por humanos são lançados no esgoto. Estima-se que entre 50% a 90% de uma dosagem do fármaco é excretada inalterada na urina, persistindo no meio ambiente (Bila e Dezotti, 2003). Resíduos de agentes antimicrobianos e bactérias resistentes são encontradas em efluentes da indústria farmacêutica e de hospitais (Gordon et al., 2007). Muitos resíduos de fármacos resistem a vários processos de tratamento convencional de água, não sendo completamente removidos nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) (Bila e Dezotti, 2003).

Não existe ainda um levantamento adequado sobre a destinação dos efluentes gerados em instituições de saúde. O que se sabe é que em via de regra esses efluentes são lançados diretamente na rede pública coletora de esgoto sem qualquer tipo de tratamento (Abreu et al., 2010). As quantidades de substâncias poluentes emitidas por hospitais são frequentemente negligenciadas em relação aos padrões estabelecidos pelas legislações, sendo que descargas sanitárias e os resíduos das análises laboratoriais representam as principais fontes de eliminação de materiais patogênicos em um hospital (Kümmerer, 2001). Os microrganismos multirresistentes

são considerados uma ameaça substancial para a saúde pública (Spelberg, et al., 2008). Além disso, os antimicrobianos não são usados somente para tratar ou prevenir doenças nos animais e no homem, mas também são utilizados para acelerar o crescimento e desempenho dos animais de produção, incluindo os ambientes aquáticos de criação (aquicultura) (Kümmerer, 2004). A grande utilização de antimicrobianos em aquicultura tem aumentado a possibilidade de contaminação do meio ambiente tanto para animais quanto para o homem com bactérias resistentes (Cabello, 2006), representando um risco à saúde pública (Schmidt et al., 2000). A constatação de casos de doenças que foram geradas direta ou indiretamente por lançamentos inadequados de efluentes tem sido cada vez mais explícita, afetando a saúde da população (Abreu et al., 2010).

O objetivo deste estudo foi identificar a presença de bactérias no intestino de jundiá (*Rhamdia quelen*) resistentes a antibióticos, a partir de amostras coletadas em três locais com níveis diferentes de ação antrópica, bem como comparar amostras de intestino e da água, dentro de um mesmo local.

## **3.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.2.1 COLETA DE PEIXES E AMOSTRAS DE ÁGUA**

Foram escolhidos três locais de coleta que representassem diferentes perfis de ação antrópica no entorno. Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da PUCPR, registro N<sup>o</sup>: 756/2012. A autorização de pesca para finalidade científica foi concedida pelo SISBIO/ICMBio N<sup>o</sup> 22324-2/2013. Os três locais de coleta escolhidos foram:

- Rio Pequeno – no bairro Costeira, localizado na zona rural do município de São José dos Pinhais (Coordenadas geográficas -49.109580/-25.566395 - longitude/latitude). Este local apresenta pouca ação antrópica em seu entorno.
- Rio Barigui - dentro do Parque Barigui, em Curitiba (Coordenadas geográficas -49.308770/-25.427735 - longitude/latitude). Este local apresenta intensa ação antrópica em seu entorno.

- Laboratório de Pesquisa e Piscicultura da PUCPR – LAPEP, localizado na zona urbana do município de São José dos Pinhais, abastecido com a água do rio Arujá, afluente do rio Miringuava (Coordenadas geográficas -49.222162/-25.582593 - longitude/latitude). – Este local é um ambiente de produção de peixes.

As coletas foram realizadas nos dias 23/07/2013 (LAPEP), 20/11/2013 (Rio Barigui), e 14/12/2013 (Rio Pequeno). Para pescar os animais foram utilizadas varas de bambu com linhada para bagre. Os peixes coletados foram medidos com ictiômetro para determinação do comprimento total e comprimento padrão, e sua massa determinada em balança.

O abate foi realizado logo após a pesca, por anestesia em água e gelo, seguida por secção medular. Os peixes foram então armazenados em gelo e levados para o Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Agropecuária da PUCPR, localizado na Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR, em São José dos Pinhais, BR 376, km14, onde foram realizadas todas as análises. Adicionalmente, foram coletadas amostras de água dos três pontos de coleta. Um volume de 500 ml foi transferido para frasco estéril e imediatamente transportado para o laboratório.

### 3.2.2 RETIRADA DO CONTEÚDO INTESTINAL

Foi realizada uma secção longitudinal na porção ventral do animal com o auxílio de material cirúrgico estéril para a retirada dos órgãos internos. O intestino foi removido, medido seu comprimento com ictiômetro e aberto longitudinalmente com um bisturi. O conteúdo da luz intestinal foi coletado com uma espátula, pesado em balança e transferido para tubos de centrífuga tipo Falcon contendo 9 mL de solução salina fosfatada (PBS 1X) estéril na presença de bolas de vidro de 4 mm de diâmetro e, em seguida homogeneizado por 3 a 5 min segundo o método de Molinari et al., (2003).

### 3.2.3 DILUIÇÃO E PLAQUEAMENTO DO CONTEÚDO INTESTINAL E DA ÁGUA COLETADA

Os conteúdos intestinais obtidos após a homogeneização e a água de cultivo foram diluídos serialmente até a concentração de  $10^{-4}$  em 9 mL de solução salina

(NaCl) estéril 0,9%. Em seguida, alíquotas de 100 µl das diferentes diluições foram semeadas em placas de Petri contendo ágar MacConkey (Himedia-India) e ágar sangue (Himedia-India), em duplicata, e incubadas a 37 °C por 24 h (Murray et al., 1995). Além dessas diluições, foi adicionado 1ml da diluição zero em 9 ml de água peptonada por 24h a 37 °C e, em seguida, repicadas para placas de Petri contendo ágar MacConkey (Himedia-India) e ágar sangue (Himedia-India) em duplicata, também em diluições até a concentração de 10<sup>-4</sup>, e novamente incubadas a 37 °C por 24 h.

Após a incubação, as colônias bacterianas foram triadas por características fenotípicas como morfologia (forma e tamanho), coloração de Gram, reação da catalase e da oxidase. Cada isolado foi repicado para um tubo contendo 5ml de caldo BHI estéril e colocado em estufa a 37°C por 24 horas, para dar sequência ao teste de susceptibilidade.

### 3.2.4 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

O teste de susceptibilidade a antibióticos foi realizado pela técnica de disco difusão (Kirby-Bauer) em ágar Muller Hinton para todos os isolados bacterianos, utilizando o manual internacional “Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013), documento M100-S23 como referência.

Os antibióticos testados e suas respectivas concentrações foram: ampicilina (amp; 10µg), gentamicina (gen; 10µg), ertapenem (etp; 10µg), ácido nalidíxico (nal; 30µg), sulfametoxazol/trimetoprima (sut; 25µg), cefalotina (cfl; 30µg), cefoxitina (cfo; 30µg), ceftriaxona (cro; 30µg), cefepime (cpm; 30µg) e tetraciclina (tet; 30µg). A escolha dos antibióticos foi feita com base no seu uso clínico e por representatividade das classes: beta-lactâmicos – ampicilina (classe: penicilina), cefalotina, cefoxitina, ceftriaxona, cefepime (cefalosporinas de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração) e ertapenem (classe: carbapenêmico); aminoglicosídeo – gentamicina; quinolona – ácido nalidíxico; sulfonamidas - sulfametoxazol/trimetoprima; e tetraciclina (classe: tetraciclina).

O controle de qualidade do método foi realizado utilizando-se as cepas de referência *Escherichia coli* ATCC 25922, e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. A interpretação dos dados foi realizada comparando os halos de inibição obtidos com os de referência indicados no manual do CLSI (2013) para a classificação dos microrganismos como sensível (S), intermediário (I) ou resistente (R), a interpretação

dos halos foi feita utilizando os valores de referência dos halos para a família Enterobacteriaceae, dado que não foi realizada identificação prévia dos isolados.

### 3.2.5 ANALISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados de antibiograma para classificação dos isolados em sensível (S), intermediário (I) ou resistente (R), foram utilizados o teste de Qui<sup>2</sup> e o teste de Kolmogorov-Smirnov.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das biometrias dos animais coletados estão representados na tabela 1.

**Tabela 1. Data de coleta e parâmetros biométricos de peixes jundiás (*Rhamdia quelen*) coletados no Laboratório de Pesquisa e Piscicultura da PUCPR – LAPEP, Rio Barigui e Rio Pequeno**

Local/ Data coleta	Peixe	CT (cm)	CP (cm)	Peso (g)	Conteúdo intestinal (g)	CI (cm)
<b>Rio Pequeno 12/12/2013</b>	13	22,5	18,5	135	1,8	20
	14	32	26,5	405	8,5	30
<b>Rio Barigui 20/11/2013</b>	7	42	35,5	766	7,4	56
	8	35	30	498	2,3	33
	9	26	21	186	0,85	23,5
	10	27	23	111	1,1	22
	11	23	19,5	104	2,7	26
	12	20,1	16,5	85	2,6	23
<b>LAPEP 23/07/2013</b>	1	24	20	146,4	3,2	31
	2	26	22	199,3	5,5	42
	3	24	20	189	4,8	37
	4	22,5	18,5	144,3	3,6	37
	5	22,5	18,5	142	3,5	34
	6	22,5	18,5	122,2	3,1	26

CT = comprimento total; CP = comprimento padrão CI = comprimento do intestino.

Todos os peixes coletados apresentam comprimento total superior a 17,5 cm (Tab. 1). Segundo Gomes et al. (2000), tanto machos como fêmeas que apresentem comprimento acima de 17,5 cm estão aptos para a reprodução e têm idade aproximada de um ano.

A Tabela 2 apresenta a população bacteriana cultivada em ágar BHI, a partir de inóculos de conteúdo intestinal de peixes de cada ponto de coleta.

**Tabela 2: Contagem de colônias de bactérias cultivadas em placas com ágar BHI inoculadas com conteúdo intestinal de peixes coletados no Rio Pequeno, Rio Barigui e Laboratório de Pesquisa em Piscicultura da PUCPR – LAPEP.**

Rio Pequeno		
	SAP	CAP
	UFC.g <sup>-1</sup>	UFC.g <sup>-1</sup>
Peixe 13	5,35 . 10 <sup>5</sup>	4,5 . 10 <sup>4</sup>
Peixe 14	3,55 . 10 <sup>5</sup>	4,14 . 10 <sup>3</sup>

Rio Barigui		
	SAP	CAP
	UFC.g <sup>-1</sup>	UFC.g <sup>-1</sup>
Peixe 7	6,79 . 10 <sup>4</sup>	6,36 . 10 <sup>5</sup>
Peixe 8	1,30 . 10 <sup>6</sup>	2,43 . 10 <sup>6</sup>
Peixe 9	4,44 . 10 <sup>4</sup>	3,41 . 10 <sup>5</sup>
Peixe 10	3,47 . 10 <sup>6</sup>	2,03 . 10 <sup>6</sup>
Peixe 11	1,05 . 10 <sup>6</sup>	2,34 . 10 <sup>6</sup>
Peixe 12	1,09 . 10 <sup>4</sup>	2,76 . 10 <sup>6</sup>

LAPEP		
	SAP	CAP
	UFC.g <sup>-1</sup>	UFC.g <sup>-1</sup>
Peixe 1	1,97 . 10 <sup>4</sup>	7,24 . 10 <sup>5</sup>
Peixe 2	9,79 . 10 <sup>4</sup>	3,98 . 10 <sup>4</sup>
Peixe 3	3,34 . 10 <sup>4</sup>	6,27 . 10 <sup>4</sup>
Peixe 4	1,11 . 10 <sup>5</sup>	2,24 . 10 <sup>5</sup>
Peixe 5	6,75 . 10 <sup>4</sup>	8,59 . 10 <sup>4</sup>
Peixe 6	6,20 . 10 <sup>3</sup>	5,51 . 10 <sup>5</sup>

SAP = amostras sem manutenção prévia em água peptonada, inoculadas em ágar BHI. CAP = amostras com manutenção prévia em água peptonada, inoculadas em ágar BHI. UFC.g<sup>-1</sup> = unidades formadoras de colônia por grama de conteúdo intestinal.

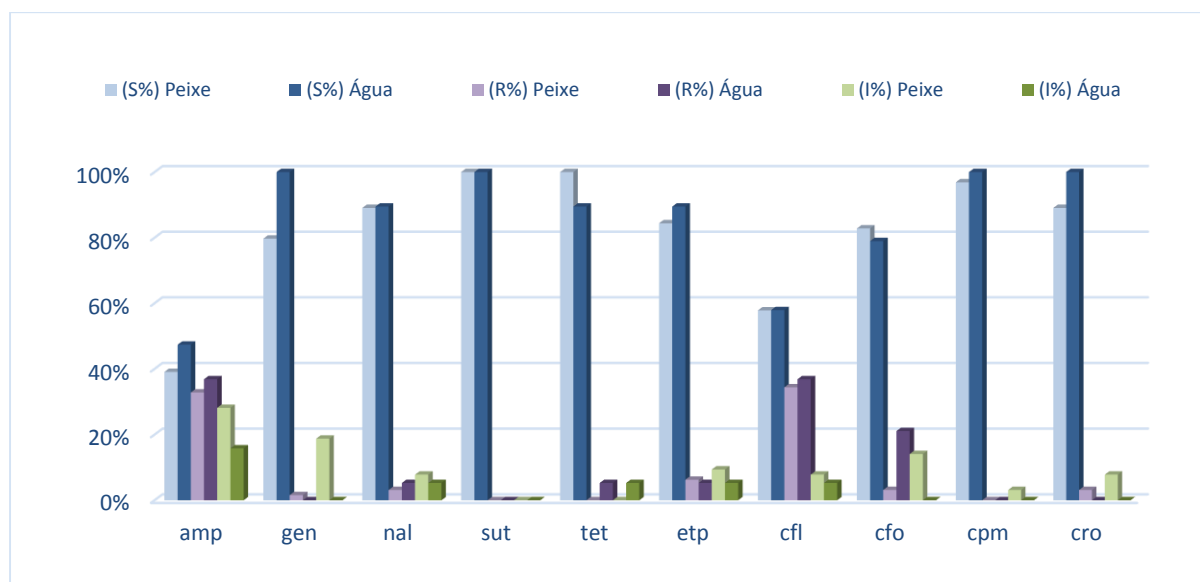


Na Tabela 2 é possível notar que de um modo geral houve um crescimento maior de colônias nas placas de ágar BHI que foram previamente enriquecidas com água peptonada (CAP) antes da inoculação no ágar BHI, conforme esperado. Com relação às contagens de colônias, o número de bactérias totais do intestino de peixes de profundidade varia de  $1,1 \times 10^6$  a  $3,6 \times 10^8$  UFC g<sup>-1</sup> segundo Austin (2002), e os valores encontrados a isso ou um pouco abaixo.

Foram obtidos 386 isolados bacterianos do conteúdo intestinal, sendo 94 isolados do intestino de peixes pescados no Rio Pequeno, 157 isolados do intestino de peixes pescados no Rio Barigui e 102 isolados do intestino dos peixes pescados no LAPEP.

Dos dois jundiás pescados no Rio Pequeno, foram encontrados 94 isolados bacterianos, e da água do rio foram encontrados 22 isolados bacterianos. A figura 3 apresenta os valores do perfil de susceptibilidade antimicrobiana encontrados na amostra de água e do intestino dos peixes.

**Figura 3. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas do intestino de jundiá (*Rhamdia quelen*) e da água, coletados no Rio Pequeno, em dezembro de 2013.**

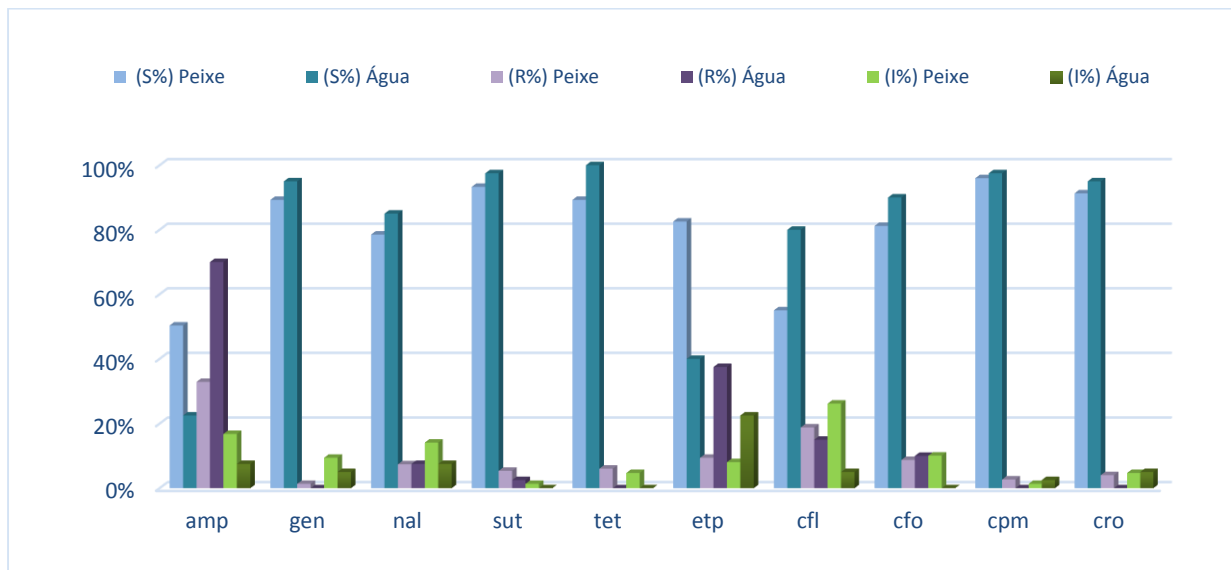


S% = porcentagem de isolados sensíveis ao antibiótico. R% = porcentagem de isolados resistentes ao antibiótico. I% = porcentagem de isolados intermediários em resistência ao antibiótico. amp = ampicilina, gen = gentamicina, nal= ácido nalidíxico, sut = sulfametoxazol- trimetoprima, tet = tetraciclina, etp = ertapenem, cfl = cefalotina, cfo = cefoxitina, cpm = cefepime, cro = ceftriaxona.

No Rio Pequeno os resultados mostraram resistência bacteriana da microbiota intestinal a 7 dos 10 antibióticos testados, e resistência bacteriana a 6 antibióticos quando analisado a microbiota isolada da água do Rio. Houve uma leve diferença nos resultados de resistência (mostrados em azul no gráfico) entre a água e o conteúdo intestinal do mesmo rio, onde os antibióticos ampicilina, ácido nalidíxico, ertapenem, cefalotina e cefoxitina apresentaram resultados de resistência tanto na água quanto no peixe. Os antibióticos gentamicina e ceftriaxona apresentaram resultados de resistência apenas quando analisadas as bactérias do intestino dos peixes, a tetraciclina apresentou resultados de resistência apenas quando analisadas as bactérias da água do rio; e o antibiótico sulfametaxazol-trimetoprim apresentou 100% de sensibilidade antimicrobiana tanto nos peixes quanto na água. E por fim o antibiótico cefepime apresentou 100% de sensibilidade antimicrobiana quando analisada as bactérias da água do Rio Pequeno, mas quando analisada a microbiota intestinal dos peixes, apesar de não ser encontrada a resistência ao antibiótico, foi encontrado alguns exemplares intermediários, indicando que pode estar começando uma tendência a resistência a este fármaco.

Dos seis jundiás pescados no Rio Barigui, foram encontrados 157 isolados bacterianos do intestino dos peixes, e 44 isolados bacterianos oriundos da água deste rio. A figura 4 demonstra o perfil de susceptibilidade antimicrobiana relativa ao Rio Barigui.

**Figura 4. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas do intestino de jundiá (*Rhamdia quelen*) e da água, coletados no Rio Barigui, em novembro de 2013.**

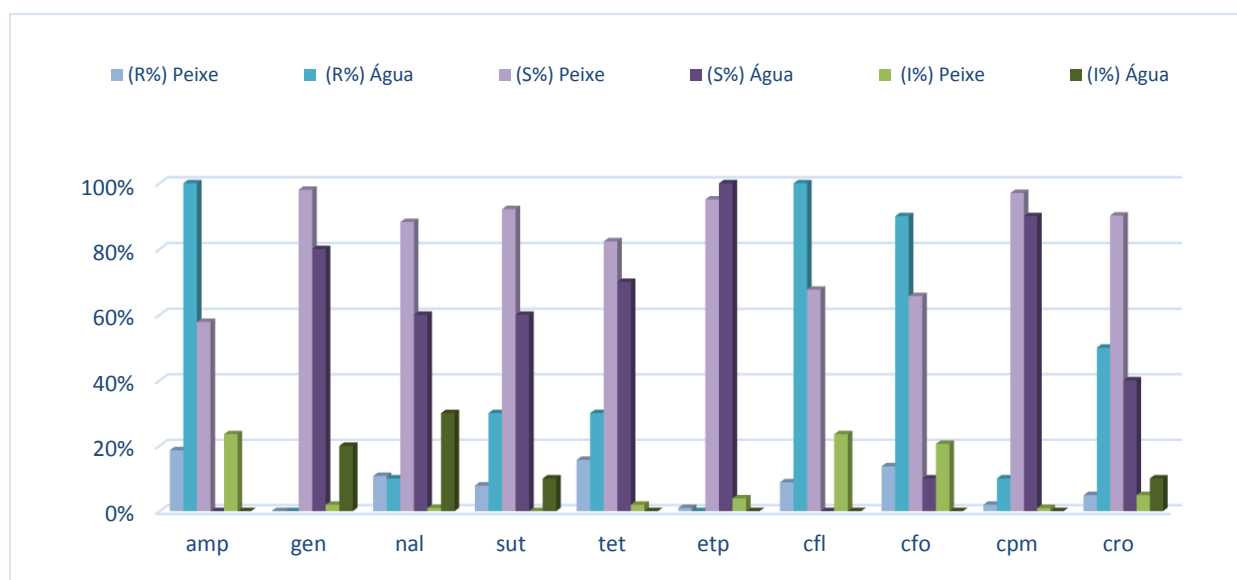


S% = porcentagem de isolados sensíveis ao antibiótico, R% = porcentagem de isolados resistentes ao antibiótico, I% = porcentagem de isolados intermediários em resistência ao antibiótico. amp = ampicilina, gen = gentamicina, nal = ácido nalidíxico, sut = sulfametoxazol-trimetoprima, tet = tetraciclina, etp = ertapenem, cfl = cefalotina, cfo = cefoxitina, cpm = cefepime, cro = ceftriaxona.

No Rio Barigui é interessante notar que todos os antibióticos testados apresentaram alguma porcentagem de resistência bacteriana a eles. Mas que as porcentagens de resistência não chegaram a 40%, a ampicilina que foi o antibiótico com maior porcentagem de resistência neste rio chegou a 33%. Já se analisarmos as bactérias crescidas na água deste rio apenas seis antibióticos (ampicilina, ácido nalidíxico, sulfametaxazol-trimetoprima, ertapenem, cefalotina e cefoxitina) apresentaram resultados de resistência antimicrobiana a eles. Mas com valores mais altos, a porcentagem de resistência a ampicilina das bactérias isoladas da água chegou a 70%. Além disso quando observados os resultados obtidos com a água, o antibiótico tetraciclina apresentou 100% de sensibilidade antimicrobiana, e quando comparado as bactérias intestinais dos peixes foi observado 6% de resistência. Os antibióticos gentamicina, cefepime e ceftriaxona apresentaram valores de sensibilidade antimicrobiana acima de 90%, não apresentaram resistência, apenas algumas cepas com valores intermediários de resistências a estes antibióticos quando analisada as bactérias da água do Rio Barigui.

Dos seis jundiás pescados no LAPEP, foram encontrados 102 isolados bacterianos do conteúdo intestinal dos peixes e 29 isolados bacterianos da água coletada do tanque onde os peixes foram pescados, conforme a figura 5.

**Figura 5. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas do intestino de jundiá (*Rhamdia quelen*) e da água, coletados no Laboratório de Pesquisa em Piscicultura da PUCPR – LAPEP, em julho de 2013**



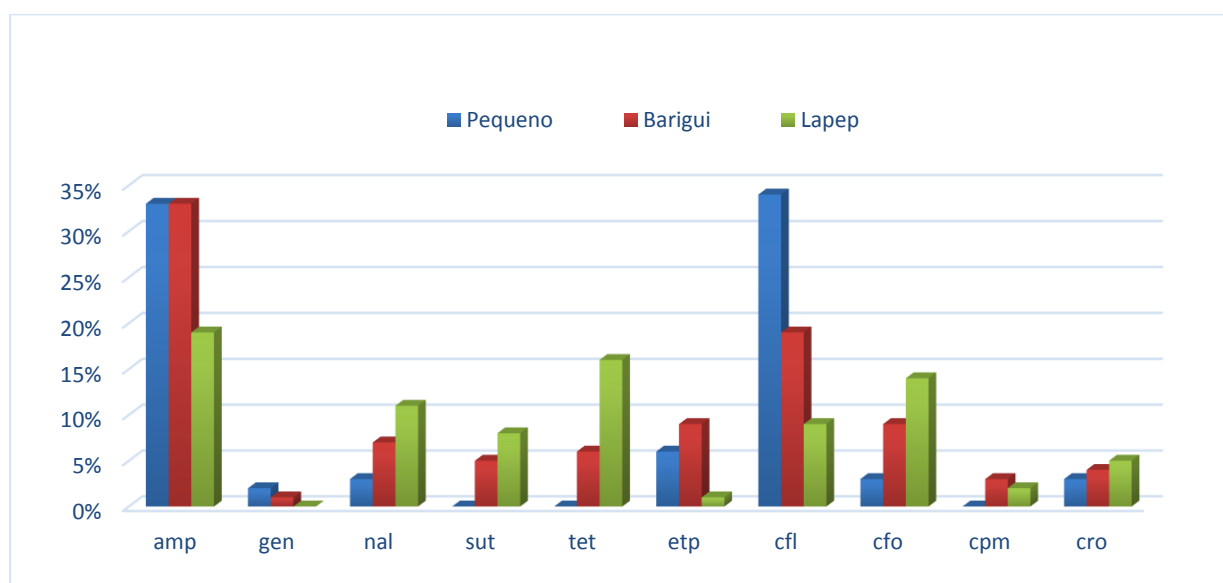
S% = porcentagem de isolados sensíveis ao antibiótico, R% = porcentagem de isolados resistentes ao antibiótico, I% = porcentagem de isolados intermediários em resistência ao antibiótico. amp = ampicilina, gen = gentamicina, nal= ácido nalidíxico, sut = sulfametoxazol- trimetoprima, tet = tetraciclina, etp = ertapenem, cfl = cefalotina, cfo = ceftioxita, cpm = cefepime, cro = ceftriaxona.

Observando os dados da figura 5 nota-se que das bactérias isoladas do intestino dos peixes, nove apresentaram resistência, sendo eles ampicilina, ácido nalidíxico, sulfametaxazol-trimetoprim, tetraciclina, ertapenem, cefalotina, ceftioxita, cefepime e ceftriaxona. Quando analisada as bactérias isoladas da água com exceção do ertapenem os mesmos antibióticos apresentaram resistência antimicrobiana, com a diferença de que as porcentagens de resistência foram muito maiores na água do que das bactérias dos peixes. A ampicilina e a cefalotina apresentaram 100% de resistência quando analisada a água e apenas 19% e 9% respectivamente quando analisado as bactérias isoladas dos peixes. A gentamicina foi o único antibiótico que não apresentou resistência tanto na água quanto nas bactérias provenientes dos peixes, apresentando a diferença entre os resultados de 98% de sensibilidade quando analisado bactérias isoladas dos peixes e 80% quando

analisado bactérias isoladas da água. O ertapenem apresentou 100% de sensibilidade antimicrobiana das bactérias isoladas da água.

A figura 6 foi montada somente com as porcentagens de resistência bacteriana aos antibióticos testados de cada um dos três pontos amostrados: Rio Pequeno, Rio Barigui e LAPEP.

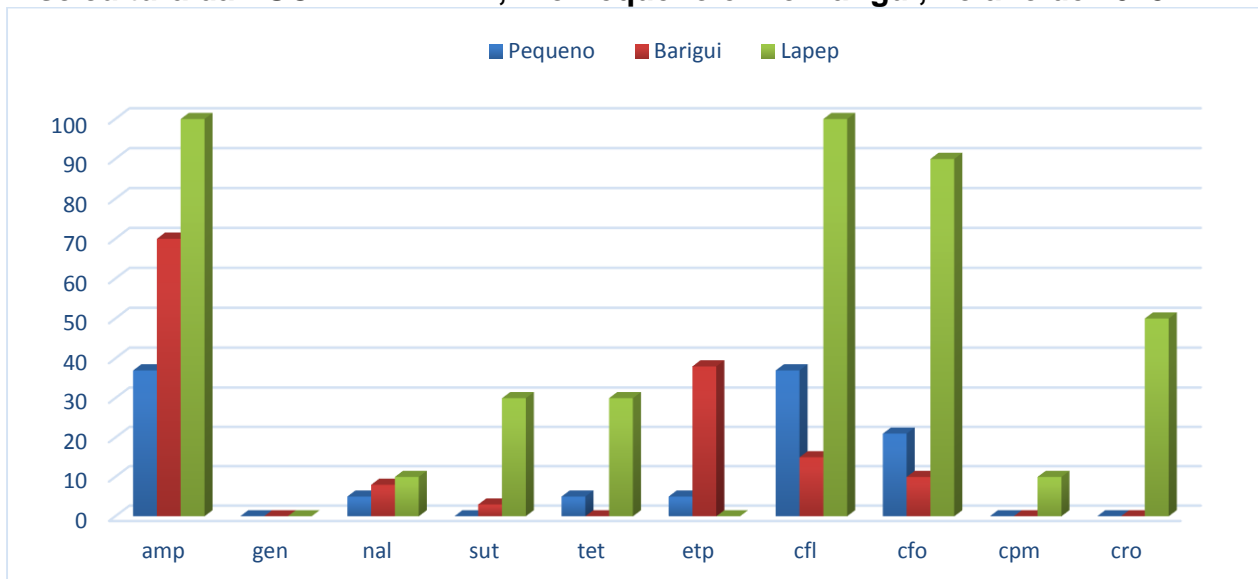
**Figura 6. Ocorrência relativa de resistência antimicrobiana em amostras de bactérias isoladas do intestino de jundiá, oriundas do Laboratório de Pesquisa em Piscicultura da PUCPR – LAPEP, Rio Pequeno e Rio Barigui, no ano de 2013.**



Comparação entre os três pontos de coleta (Pequeno, Barigui e LAPEP), comparando somente a resistência aos antibióticos. amp =ampicilina, gen = gentamicina, nal= ácido nalidíxico, sut = sulfametoxazol- trimetoprima, tet = tetraciclina, etp = ertapenem, cfl = cefalotina, cfo = ceftioxina, cpm = cefepime, cro = ceftriaxona.

Analisando apenas as resistências dos três locais Rio Pequeno, Rio Barigui e LAPEP, pode-se observar que a ampicilina, a cefalotina, a ceftioxina e a tetraciclina foram os antibióticos que apresentaram maior porcentagem de resistência, porém, não houve diferença significativa pelo método Kolmogorov-Smirnov quando comparado os totais de resistência de bactérias isoladas dos peixes. Analisando a figura 7 sobre os totais de resistência antimicrobiana das águas coletadas dos três pontos amostrados (Rio Pequeno, Rio Barigui e LAPEP), nota-se uma sensível diferença comparando os resultados com os resultados de totais de resistência encontrados nas bactérias intestinais dos peixes.

**Figura 7. Ocorrência relativa de resistência antimicrobiana em amostras de bactérias isoladas da água, oriundas do Laboratório de Pesquisa em Piscicultura da PUCPR – LAPEP, Rio Pequeno e Rio Barigui, no ano de 2013.**



Comparação entre os 3 pontos de coleta (Pequeno, Barigui e LAPEP), comparando somente a resistência aos antibióticos. amp =ampicilina, gen = gentamicina, nal= ácido nalidixico, sut = sulfametoxazol- trimetoprima, tet = tetraciclina, etp = ertapenem, cfl = cefalotina, cfo = cefoxitina, cpm = cefepime, cro = ceftriaxona.

Se for analisada a figura 7, pode-se notar que há uma porcentagem maior de resistência nas bactérias isoladas da água do que das bactérias isoladas do intestino de peixes. Apesar de aparecer algumas porcentagens maiores de resistência na água do que nos peixes, como é o caso da ampicilina, não houve diferença significativa pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Há, no entanto, quatro antibióticos que apresentaram diferença significativa nos resultados, são eles: ertapenem, cefalotina, cefoxitina e ceftriaxona.

O Ertapenem apresentou maior resistência em bactérias isoladas da água do Rio Barigui com 38% de resistência, as bactérias isoladas da água do LAPEP não apresentaram resistência ao ertapenem, e as bactérias isoladas do Rio Pequeno apresentaram apenas 5% de resistência a este antibiótico. Já os antibióticos cefalotina, e cefoxitina apresentaram resultados maiores de porcentagem de resistência bacteriana em bactérias isoladas da água do LAPEP do que do Rio Barigui e Rio Pequeno. E o antibiótico ceftriaxona, só apresentou resistência antimicrobiana (50%) em bactérias isoladas da água do LAPEP. O LAPEP é um criatório de peixe e essa elevada porcentagem de resistência provavelmente é devida a grande quantidade de antimicrobianos utilizados em aquicultura, e segundo Cabello et al.,

(2006) a grande utilização de antimicrobianos em aquicultura aumenta a possibilidade de contaminação do meio ambiente com bactérias resistentes.

Observando esses dados pode-se responder o primeiro objetivo deste estudo, o de que existe sim bactérias do intestino do jundiá, resistentes a antibióticos nos pontos três pontos amostrados.

Outra hipótese deste trabalho é a de que os peixes podem servir de bioindicadores de contaminação ambiental por antibióticos na água, e pelos resultados observados. Há motivos para acreditar que provavelmente eles podem servir a este propósito, porém, o cuidado que deve ser tomado com essa resposta é que a resistência observada não serve para confirmar a presença de antibióticos na água, pois, existem bactérias intrinsecamente resistentes a alguns antibióticos, e sem a identificação elas não podem ser excluídas dos resultados e nem quantificar a concentração desses fármacos na água, mas pode servir como bioindicadora para uma pré-avaliação da carga de antimicrobianos ou bactérias resistentes na água, com uma técnica de baixo custo, para poder focar estudos futuros com antibióticos nos locais onde os peixes foram amostrados.

Como houve algumas diferenças entre os resultados da água coletada e os resultados das bactérias do intestino do peixe, o ideal é que não sejam utilizados somente os peixes, mas também a água do local que se quer avaliar. Além disso ao observarmos resultados de bactérias resistentes a antibióticos do intestino de peixes, deve-se tomar o cuidado de observar que existe resistência intrínseca da família Enterobacteriaceae a alguns antibióticos, e dos antibióticos estudados neste artigo, existe resistência intrínseca a ampicilina, tetraciclina e cefalotina. Os organismos que apresentam resistência intrínseca a estes antibióticos estão listados na Tabela 3.

**Tabela 3. Relação de microrganismos da família Enterobacteriaceae intrinsecamente resistentes aos antibióticos ampicilina, cefalotina e tetraciclina.**

Microrganismo	ANTIBIÓTICO		
	amp	cfl	tet
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	
<i>Citrobacter koseri</i>	R		
<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	
<i>Escherichia coli</i>	*	*	
<i>Escherichia hermannii</i>	R		
<i>Hafnia alvei</i>	R	R	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R		
<i>Morganella morganii</i>	R	R	R
<i>Proteus mirabilis</i>	*	*	R
<i>Proteus penneri</i>	R	R	R
<i>Proteus vulgaris</i>	R	R	R
<i>Providencia rettgeri</i>	R	R	R
<i>Providencia stuartii</i>	R	R	R
<i>Salmonella spp.</i>	*	*	
<i>Shigella spp.</i>	*	*	
<i>Serratia marcescens</i>	R	R	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	R	R	

amp = ampicilina; cfl = cefalotina; tet = tetraciclina. R= resistência comprovada. \*= não há resistência intrínseca para beta-lactâmicos neste microrganismo. (Adaptado de CLSI, 2013).

Também pode ser observado neste estudo que há uma diferença entre os locais coletados, com relação a resistência, ocorreu maior resistência a antibióticos de bactérias isoladas do LAPEP, em seguida do Rio Barigui, e o Rio Pequeno foi o que apresentou menor resistência aos antibióticos testados. Isso vem enfatizar a ideia de que o tipo e a quantidade da pressão antrópica ao entorno do rio tem influência sobre o perfil de resistência bacteriana encontrada no rio, onde há mais resistência em criatório de peixes, em seguida há maior resistência bacteriana em águas onde existe um maior grau de ação antrópica do que em águas onde existe um menor grau de ação antrópica. Os dados de Mauerwerk (2012) apontavam para isso, pois estudando os mesmos rios também foram encontrados resultados de que a ação antrópica interferiu no perfil de resistência a antibióticos na água e em bactérias intestinais de peixes.

Ao observar os resultados e responder aos objetivos desta pesquisa é possível observar um dado importante, todos os antibióticos testados apresentaram



resistência antimicrobiana em pelo menos dois dos três locais amostrados. Isso mostra a gravidade da contaminação ambiental por antibióticos, independentemente do tipo de rio. Basta notar que até para o Ertapenem que segundo Brunton et al., (2012) é um carbapenem, beta-lactâmico com maior ação do que as penicilinas em geral, apresentando resistência a um grupo variado de beta-lactamases, apresentou uma pequena porcentagem de resistência a ele.

A resistência antimicrobiana a antibióticos é um problema global (OMS, 2010), muito se fala sobre o uso indiscriminado de antibióticos que tem causado este problema, a OMS lançou um documento em 2014 em que cita a “era pós antibiótico”, onde pessoas poderão morrer por infecções simples pela ineficiência no tratamento com antibióticos (WHO, 2014).

Porém, existe um outro problema maior que não está ganhando a importância que deveria, o tratamento dos esgotos de hospitais, e de esgotos domiciliares contra antibióticos e microrganismos resistentes. Pois, segundo Bila e Dezotti (2003) 50 a 90% de um fármaco pode ser excretado de forma inalterada na urina, e segundo Kümmerer (2004) é estimado que 70% dos antibióticos são liberados na urina sem serem metabolizados pelo organismo do paciente. Além disso muitos fármacos residuais resistem ao processo convencional de tratamento de água em estações de tratamento de esgoto, não sendo completamente removidos (Bila e Dezotti, 2003).

Os efluentes da indústria farmacêutica e de hospitais apresentam resíduos de agentes antimicrobianos e bactérias resistentes (Gordon, et al., 2007). Muito se fala e com razão de que se deve controlar melhor o uso de antibióticos. Em 2011 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu por meio de uma resolução que deveria haver obrigatoriedade da apresentação da receita médica do paciente para poder vender antibiótico (Stephens, 2014). Porém nada se fala em tratar o resíduo de hospitais, ou mesmo os esgotos industriais e urbanos. E com isso, a chance de o antibiótico ir parar no rio e conseqüentemente causar impacto no meio ambiente e na saúde pública é grande. Segundo Baquero et al., (2008) a água constitui um meio de disseminação de organismos resistentes aos antibióticos entre populações humanas e animais. E com isso o meio ambiente tem sido um reservatório de microrganismos resistentes (Reginato e Leal, 2010).

A resistência a antibióticos constitui uma grande ameaça para a saúde pública e deve ser reconhecida como tal, de forma mais ampla do que é reconhecida atualmente (Kümmerer, 2004). Por isso, além de controlar o uso de antibióticos, seria

ideal controlar o despejo de resíduos, os peixes poderiam ser utilizados como bioindicadores de contaminação dos rios por esses resíduos. Como exemplo de utilização de peixes como bioindicadores pode-se observar o trabalho de Martins (2005) que utilizou amostras de água e peixes (*Pimelodus maculatus*, *Mugil cephalus*, *Pleuronectes platessa*, *Hemigrammus rodwayi*, e *Opisthonema oglinum*) para observar a proliferação de *Aeromonas* no Rio Bacanga em São Luiz/ Maranhão. E o trabalho de Carneiro et al., (2007) que utilizou o peixe para avaliar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-Nilo.

### **3.4 CONCLUSÃO**

Ao avaliar o perfil de susceptibilidade da microbiota intestinal de jundiá, pode ser observado que existem bactérias resistentes a antibióticos. As bactérias intestinais dos peixes têm potencial de servir como bioindicadores de contaminação da água como uma pré-avaliação de quais são os antibióticos que tem a maior probabilidade de estar no rio ou tanque de cultivo, não servindo para quantificar os antibióticos presentes na água. Os resultados da água e dos peixes coletados do mesmo rio apresentam leves diferenças no perfil de susceptibilidade indicando que o ideal é utilizar o peixe e a água para observar a presença de resistência a antibiótico na água.

## CAPÍTULO 4

### COMPARAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS NOS ANOS DE 2010 E 2013 A PARTIR DE AMOSTRAS DO INTESTINO DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) E DA ÁGUA ORIUNDAS DE AMBIENTES NATURAIS E DE CRIAÇÃO

*(Comparison of susceptibility testing of bacteria isolated from the gut of Jundiá (Rhamdia quelen) and water from natural environments and fishfarm between the years 2010 and 2013).*

#### RESUMO

A resistência a antibiótico é um problema global grave, a água é um meio de disseminação de organismos resistentes. Neste trabalho foram coletados no ano de 2010 e no ano de 2013 peixes jundiás (*Rhamdia quelen*), em três locais: Rio Pequeno, Rio Barigui e Laboratório de Pesquisa em Piscicultura da PUCPR - LAPEP. A microbiota intestinal desses peixes foi utilizada para observar o perfil de susceptibilidade das bactérias intestinais dos peixes, utilizando a técnica de antibiograma por disco/difusão (Kirbi-Bauer). O objetivo do trabalho foi avaliar se houve diferença no perfil de susceptibilidade da microbiota intestinal de peixes coletados em 2010 comparados com peixes coletados em 2013 nos mesmos pontos de coleta (Rio Pequeno, Rio Barigui e LAPEP). Os resultados mostram que houve uma mudança no perfil de susceptibilidade para os antibióticos ampicilina, ertapenem e cefalotina avaliando a microbiota intestinal de jundiá.

**Palavras-chave:** Multirresistência, peixe, bioindicador, microrganismos intestinais, dejetos.

## **ABSTRACT**

The antibiotic resistance is a major global problem, water is a means of spread of resistant organisms. In this paper we were collected in 2010 and in 2013 silver catfish (*Rhamdia quelen*) in three locations: Pequeno River, Barigui River and Fish Farming Research Laboratory of PUCPR - LAPEP. The intestinal microbiota of these fish was used to observe the susceptibility profile of intestinal bacteria of fish, using the antibiogram technique for disc/diffusion (Kirbi -Bauer). The objective was to assess whether there were differences in the susceptibility profile of the intestinal microbiota of fish collected in 2010 compared with fish collected in 2013 in the same collection points (Pequeno River, Barigui River and LAPEP). The results show that there was a change in susceptibility profile to the antibiotic ampicillin, cephalothin ertapenem and evaluating the intestinal tract of catfish.

**Keywords:** Catfish, antibiotic resistance, intestinal bacteria.

## 4.1 INTRODUÇÃO

Atualmente a resistência bacteriana a antibióticos é um problema mundial muito sério. Segundo a OMS dois terços de todos os antibióticos vendidos mundialmente são vendidos sem prescrição através de mercados privados não regulamentados. Quanto aos doentes, muitos deles não recebem a prescrição correta do medicamento ou se recebem não cumprem o tratamento como prescrito (OMS, 2010).

O consumo de antibióticos per capita, bem como os tipos de antibióticos utilizados variam entre os países. Taxas de prescrição e o consumo sem receita médica também variam conforme a localidade (Mölstad et al., 2002), e parecem ser influenciados pela escolha da prescrição, sistema de saúde, economia, nível de conhecimento, comportamento do paciente e expectativas do médico e do paciente (McNulty e Francis, 2010).

Concentrações subinibitórias de antibióticos na água podem levar ao aparecimento de resistências a eles em bactérias comensais do intestino humano, do intestino dos peixes, ou mesmo por bactérias aquáticas, com a possível disseminação de genes de resistência em diversas populações bacterianas (Gordon et al., 2007; Gastalho et al., 2014; Guardabassi et al., 2010).

Não há necessidade de patogenicidade do microrganismo para que carregue genes de resistência, ao contrário, bactérias de microbiota normal são as que carregam maior quantidade de genes de resistência a uma ou mais drogas. A aquisição de resistência pode aparecer por mutação, resistência transferível, transformação, transdução, conjugação e transposição. (Fio et al., 2000).

Os antibióticos são amplamente utilizados na medicina humana e animal, e como promotores de crescimento para animais de produção (Chee-Sanford et al., 2009; Larson, 2007; Jensen e Hayes, 2014; Kumar et al., 2012;), resultando no aumento do número de bactérias comensais e patogênicas resistentes aos antimicrobianos, o que vem se tornando um dos maiores problemas de saúde pública mundial (Sorum e Abée-Lund, 2002; Rivera-Tapia, 2003; Baquero, 2008; Pruden et al., 2013).

Estudos apontam que níveis elevados de antimicrobianos e bactérias resistentes a estes compostos são encontrados em ambientes distintos. Frequências

elevadas de resistência aos antibióticos têm sido relatadas em bactérias isoladas de áreas onde os antibióticos foram amplamente utilizados pelos seres humanos, bem como ambientes terrestres e aquáticos sujeitos a criação intensiva de animais (Lee et al., 1993; DePaola et al., 1995). Antibióticos têm sido detectados na faixa de mg/L em esgotos municipais, no efluente de estações de tratamento de esgoto (ETEs), em águas de superfície e em solos (Zuccato et al., 2000; Kolpin et al., 2002).

Em 1998, na Inglaterra, de todas as drogas utilizadas, 50% se destinavam a uso humano e 50% ao agroveterinário. Da fração de drogas usadas em humanos, 20% foram utilizadas em hospitais e 80% pela comunidade sendo que de 20% a 50% não eram necessárias. Para o uso veterinário os dados são mais alarmantes, pois cerca de 20% foram utilizadas terapêuticamente e até 80% para uso profilático e promoção de crescimento (Wise et al., 1998). Em 2003 o consumo anual de antibióticos, a nível global, tem sido estimado, entre 100.000 a 200.000 toneladas, o uso de antibióticos pela população relatado no Reino Unido foi de 95% e nos Estados Unidos de 75%. Já na Alemanha aproximadamente 75% do total foi utilizado pela comunidade e apenas 25% nos hospitais (Kümmerer, 2003). Na China, em 2007 foram produzidas cerca de 210.000 toneladas de antibióticos, dos quais 46,1% foram utilizados em animais (Hvistendahl, 2012).

O meio ambiente tem sido um reservatório de microrganismos resistentes, muitos dos antibióticos administrados em animais, não são plenamente metabolizados, sendo excretados na forma original ou parcialmente metabolizado na urina e nas fezes desses animais (Reginato e Leal, 2010). Uma parte significativa dos fármacos utilizados por humanos são excretados no esgoto, sendo que há a probabilidade de 50 a 90% de uma dosagem do fármaco ser excretada inalterada na urina, persistindo no meio ambiente (Bila e Dezotti, 2003). Resíduos de agentes antimicrobianos e bactérias resistentes são encontradas em efluentes da indústria farmacêutica e de hospitais (Gordon et al., 2007).

A água constitui um meio de disseminação de organismos resistentes aos antibióticos entre populações humanas e animal (Baquero et al., 2008).

Estudos têm apontado para a microbiota gastrointestinal como sítio de disseminação de resistência a antimicrobianos. A transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos no trato digestivo foi inicialmente comprovada em humanos, envolvendo resistência à tetraciclina em *Bacteroides* spp. (Shoemaker et al., 2001).

Para encontrar uma forma de identificar a resistência a antibióticos na água surge então a ideia de utilizar bactérias do intestino de jundiá (*Rhamdia quelen*) que é um peixe onívoro com tendência a piscivoria, de hábito alimentar generalista que é uma espécie de distribuição neotropical, encontrado do Norte do México até o Sul da Argentina (Gomes et al., 2000). Além de ser um peixe nativo e de distribuição neotropical, o jundiá é um peixe que suporta tanto quantidades baixas, quanto quantidades altas de oxigênio dissolvido (Mafezzolli e Nuñez, 2006), possui a capacidade de armazenar a comida por um tempo mais longo que outros peixes (Carneiro e Mikos, 2005), e é um animal que possui hábito noturno e habita locais profundos dos rios, preferindo os ambientes de água mais calma junto à margem e vegetação dos rios com fundo de areia e lama (Gomes et al., 2000). O fato de preferir as margens da vegetação dos rios torna mais fácil de pescá-lo.

A microbiota intestinal dos peixes é influenciada pela dieta, composta por bactérias aeróbias, anaeróbias facultativas e anaeróbias obrigatórias (Ringo e Olsen, 1999). Colonizado por um grande número de Bactérias heterotróficas (Cahill 1990; Hansen 1999; Sugita et al., 1997, e Trust et al., 1979).

O objetivo deste artigo é comparar os resultados do teste de susceptibilidade a antibióticos realizado no ano de 2010 e no ano de 2013, para observar se houve mudança no perfil de resistência ao longo de 3 anos, bem como correlacionar diferentes níveis de ação antrópica com o perfil de resistência bacteriana aos antibióticos.

## **4.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.2.1 Coleta e eutanásia dos animais**

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da PUCPR registro Nº: 756/2012. E a autorização de pesca para finalidade científica foi concedida pelo SISBIO/ICMBio Nº 22324-2/2013. Peixes da espécie *Rhamdia quelen*, foram capturados com auxílio de rede de arrasto e anzóis nos anos de 2010 e 2013. Em cada ano a coleta foi feita em três locais: Laboratório de Pesquisa e Piscicultura da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (LAPEP/PUCPR), sendo este considerado como local de produção intensiva, e em dois rios, Barigui e Pequeno,

considerados como intensa e pouca ação antrópica respectivamente. Estes rios pertencem à bacia hidrográfica do Rio Iguaçu.

Os animais capturados em 2010 foram sacrificados por eutanásia utilizando superdosagem do anestésico benzocaína (etil-aminobenzoato) que foi adicionado a água. Os animais capturados em 2013 foram sacrificados pelo método de insensibilização em gelo seguido de secção de medula. Após o abate os peixes foram colocados em caixa térmica contendo gelo e imediatamente transportados ao Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Agropecuária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Amostras de água de todos os pontos foram coletadas para análises microbiológicas.

#### 4.2.2 Isolamento bacteriano

No laboratório os peixes foram abertos longitudinalmente na porção ventral e os órgãos internos retirados com auxílio de material cirúrgico estéril. Para a coleta do conteúdo gastrintestinal, o intestino foi aberto com bisturi, o conteúdo da luz intestinal foi coletado com espátula e transferido para tubos de centrífuga tipo Falcon contendo 9 mL de solução salina fosfatada (PBS 1x) estéril na presença de bolas de vidro de 4 mm de diâmetro, e, em seguida, homogeneizado por 3 a 5 min segundo o método de Molinari (Molinari et al., 2003), este tubo foi chamado de diluição zero.

Os conteúdos intestinais obtidos após a homogeneização, e a água de cultivo foram diluídos até a concentração de  $10^{-4}$  em 9 mL de solução salina (NaCl) estéril 0,9%. Em seguida, alíquotas de 100 µl das diferentes diluições foram semeadas em placas de Petri contendo ágar MacConkey (Himedia-India) e ágar sangue (Himedia-India), em duplicata, e incubadas a 37 °C por 24 h (Murray et al., 1995).

Nas amostras de 2013 ainda foi inoculado além das diluições citadas acima, 1ml da diluição zero em 9 ml de água peptonada por 24h a 37 °C e, em seguida, repicadas para placas de Petri contendo ágar MacConkey (Himedia-India) e ágar sangue (Himedia-India) em duplicata, também em diluições até a concentração de  $10^{-4}$ , e novamente incubadas a 37 °C por 24 h.

Após a incubação, as colônias bacterianas foram triadas por características fenotípicas como: morfologia (forma e tamanho), coloração de Gram, catalase e oxidase. Cada isolado foi repicado para um tubo contendo 5ml de caldo BHI estéril e



colocado em estufa a 37°C por 24 horas, para dar sequência ao teste de susceptibilidade.

#### 4.2.3 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

O teste de susceptibilidade a antibióticos foi realizado pela técnica de disco difusão (Kirby-Bauer) em ágar Muller Hinton para todos os isolados bacterianos utilizando o manual internacional "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), documento M100-S20 para amostras de 2010; e CLSI documento M100-S23 para amostras de 2013.

Os antibióticos testados e suas respectivas concentrações foram: ampicilina (AMP; 10µg), gentamicina (GEN; 10µg), ertapenem (ETP; 10µg), ácido nalidíxico (NAL; 30µg), sulfametoxazol/trimetoprima (SUT; 25µg), cefalotina (CFL; 30µg), cefoxitina (CFO; 30µg), ceftriaxona (CRO; 30µg), cefepime (CPM; 30µg) e tetraciclina (TET; 30µg).

O controle de qualidade do método foi realizado utilizando-se as cepas de referência *Escherichia coli* ATCC 25922, e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. A interpretação dos dados foi realizada comparando os halos de inibição obtidos com os de referência do manual do CLSI respectivo a cada ano de coleta, para a classificação dos microrganismos como sensível (S), intermediário (I) ou resistente (R). (CLSI, 2013).

Para a análise dos resultados da frequência de resistência bacteriana aos antibióticos dos isolados bacterianos de 2010, cepas que possuem resistência natural ou intrínseca foram desconsideradas, de acordo com dados de (Livermore e colaboradores, 2001; CLSI, 2013).

Para comparar os dados obtidos, foram utilizados dois métodos estatísticos: teste estatístico Qui-Quadrado para saber se há diferença entre o total de resistência encontrada em cada rio, entre cada ano. Em seguida foi realizado o teste estatístico de Komogorov-Smirnof para verificar se há diferença estatística entre as proporções de SRI encontradas para cada antibiótico de cada rio entre os anos de 2010 e 2013.

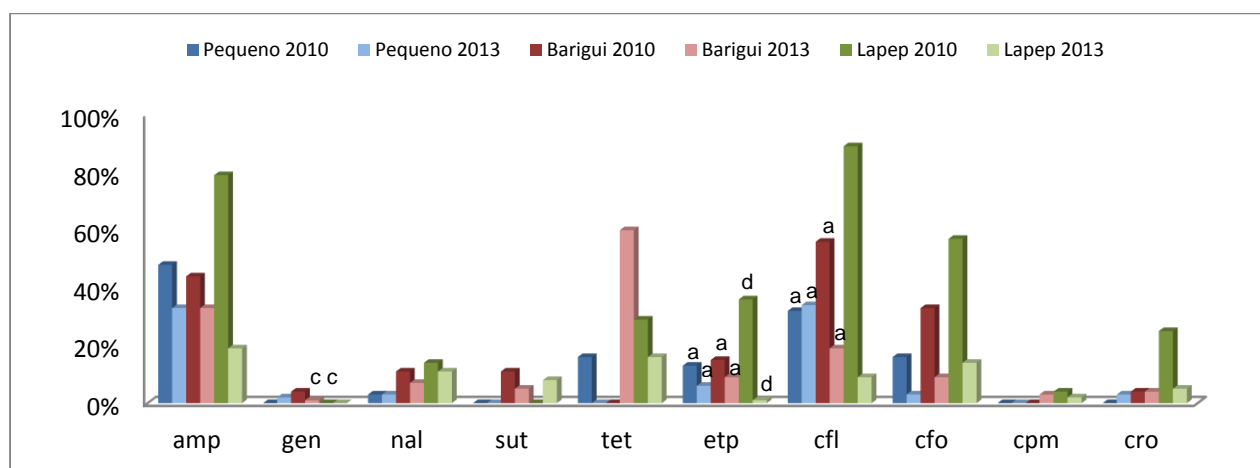
### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na coleta do ano de 2010 foi possível isolar 86 colônias bacterianas a partir do conteúdo intestinal dos peixes, enquanto das amostras de água foram isoladas 30, totalizando 116 isolados bacterianos. Na coleta de 2013 foram isoladas 353 bactérias do intestino dos peixes, e 95 colônias isoladas das amostras de água totalizando 448 isolados.

O teste de qui quadrado mostrou que houve diferença significativa do perfil de resistência tanto para o total de isolados bacterianos encontrados na água, quanto para o total de bactérias intestinais de peixes entre os anos de 2010 e 2013.

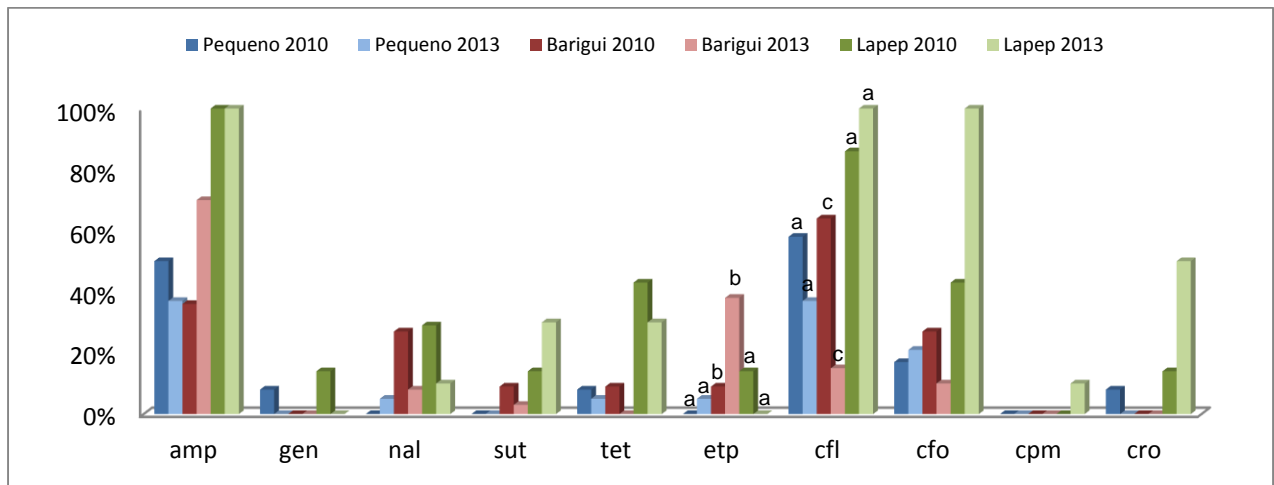
Utilizando o teste estatístico Kolmogorov-Smirnov com relação ao local de coleta, o único ponto de coleta que apresentou diferença significativa do ano de 2010 para o ano de 2013 no perfil de resistência bacteriano quando avaliado as bactérias isoladas do intestino dos peixes, foi o LAPEP com os antibióticos ampicilina, gentamicina, ertapenem e cefalotina Figura 8. E o Rio Barigui quando avaliado bactérias isoladas da água dos pontos de coleta com os antibióticos ertapenem e cefalotina Figura 9. Os outros antibióticos apesar de possuírem resistência bacteriana a eles, não mudaram significativamente o perfil de sensibilidade de 2010 para 2013.

**Figura 8. Ocorrência relativa de resistência antimicrobiana de amostras de bactérias isoladas do intestino de jundiá, oriundas do Laboratório de Pesquisa em Piscicultura da PUCPR – LAPEP, Rio Pequeno e Rio Barigui, nos anos de 2010 e 2013.**



Valores de resistência aos antibióticos testados em porcentagem. (\*) = valores com diferença estatística significativa, obtida pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Amp =ampicilina, gen = gentamicina, nal= ácido nalidíxico, sut = sulfametoxazol- trimetoprima, tet = tetraciclina, etp = ertapenem, cfl = cefalotina, cfo = ceftioxina, cpm = cefepime, cro = ceftriaxona.

**Figura 9. Ocorrência relativa de resistência antimicrobiana de amostras de bactérias isoladas da água, oriundas do Laboratório de Pesquisa em Piscicultura da PUCPR – LAPEP, Rio Pequeno e Rio Barigui, nos anos de 2010 e 2013.**



Valores de resistência aos antibióticos testados em porcentagem. (\*) = valores com diferença estatística significativa, obtida pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Amp = ampicilina, gen = gentamicina, nal = ácido nalidíxico, sut = sulfametoxazol- trimetoprima, tet = tetraciclina, etp = ertapenem, cfl = cefalotina, cfo = cefoxitina, cpm = cefepime, cro = ceftriaxona.

Para o local que representa o ambiente de criação de peixes LAPEP foi observado uma mudança no perfil de resistência para os antibióticos ampicilina (AMP), ertapenem (ETP), e cefalotina (CFL). Em todos eles houve uma diminuição da resistência a estes fármacos. A gentamicina (GEN), apesar de apresentar os mesmos valores para resistência (0%), possui proporções de SRI diferentes, apresentando um número muito maior de isolados classificados como intermediários a resistência, e essa mudança na proporção apresentou pelo teste de Kolmogorov-Smirnov diferença significativa.

Um dos fatores pelo qual pode ter ocorrido a mudança no perfil de resistência pode ter sido a técnica de abate, pois, em 2010, o abate foi realizado utilizando o anestésico benzocaína, e em 2013 foi realizado com gelo e secção de medula. Groppo et al. (2003) que estudou a atividade antimicrobiana *in vitro* de preparações anestésicas tópicas, dentre elas a benzocaína, conclui seu trabalho dizendo que as preparações anestésicas dentro das quantidades possíveis de serem utilizadas clinicamente, podem reduzir significativamente o grupo de *Streptococcus mutans*, *oralis* e *salivaris*. O jundiá ao ser mergulhado em balde com superdosagem de benzocaína, pode engolir o medicamento, fazendo com que ele vá para o trato gastrointestinal, e que seja cultivado junto com as bactérias, quando o conteúdo foi

extraído, diluído e plaqueado, fazendo com que cresça um maior número de bactérias resistentes já que as sensíveis não teriam crescido em placa por terem sido inibidas pelo anestésico. A cefalotina é uma cefalosporina de primeira geração que por definição possui boa atividade contra bactérias Gram-positivas com exceção do *Staphylococcus aureus* resistente a metilicilina, *Staphylococcus epidermidis* e enterococos (Brunton et al., 2012) e apresentou 89% de resistência em 2010 e apenas 9% de resistência em 2013, por isso a suspeita de que o método de abate possa ter interferido um pouco nos resultados.

Outro fator que pode ter influenciado para esta diminuição de resistência é o fato de que no Brasil, a partir de 2011, começou a haver um rigor maior na venda de antibióticos. Segundo Stephens (2014) a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) decretou em 2011 que os antibióticos só poderiam ser vendidos com a retenção da receita médica do paciente. Além disso, quando houvesse casos onde haveria o uso prolongado dos antibióticos, não poderia ser vendido toda a quantidade necessária para o tratamento, ao fim da validade da receita, o paciente deveria passar por uma nova consulta médica para avaliar a necessidade de continuar o tratamento com antibiótico.

Um dos objetivos deste artigo foi observar se houve mudança no perfil de resistência bacteriana do ano de 2010 para o ano de 2013, e realmente houve mudança significativa para os antibióticos ampicilina, gentamicina, ertapenem e cefalotina. Segundo Baquero et al., (2008) a água constitui um meio de disseminação de organismos resistentes aos antibióticos entre populações humana e animal. Os antibióticos exercem uma pressão seletiva no meio aquático, podendo permanecer nesse ambiente por longos períodos (Cabello, 2006).

O segundo objetivo deste artigo foi correlacionar diferentes níveis de ação antrópica com o perfil de resistência bacteriana aos antibióticos. Os resultados deste estudo mostram que existe uma leve tendência de que o ambiente de criação animal (LAPEP) obtenha uma porcentagem maior de bactérias resistentes, do que o Rio Barigui que representa um rio com intensa ação antrópica no seu entorno, e que esses dois locais apresentem porcentagem maior de resistência do que o Rio Pequeno que representa um rio com pouca ação antrópica no seu entorno. De uma maneira geral o LAPEP apresentou uma porcentagem muito maior de bactérias resistentes do que o Rio Pequeno e o Rio Barigui. Isso provavelmente ocorreu porque a principal via de entrada de antibióticos no meio ambiente se dá pelo uso de fármacos na aquicultura

e em criações intensivas de animais de produção, pois, dos produtos veterinários utilizados na criação animal, estima-se que 70% deles sejam antibióticos (Reginato e Leal, 2010).

A resistência a antibióticos tem sido observada em rios e em vários ambientes aquáticos (Baquero et al., 2008). Há estudos que mostram que até na água do mar existem bactérias resistentes, Caumo et al., (2010) citam que “mais de 90% dos isolados bacterianos originados da água do mar são resistentes a pelo menos um antibiótico e que 20% são resistentes a pelo menos 5”. Ao observarmos os resultados de resistência deste artigo, todos os antibióticos apresentaram resistência bacteriana a eles em pelo menos um ponto de coleta amostrado. Por isso os cuidados com o uso abusivo de antibióticos são essenciais para que não aconteça a “era pós antibiótico” preconizada pela organização mundial da saúde (WHO, 2014).

#### **4.4 CONCLUSÃO**

A água é o principal veículo para disseminar a resistência no meio ambiente, as atividades que ocorrem no entorno dos rios têm ligação direta com o perfil de resistência das bactérias estudadas, o que indica que devem ser tomados cuidados maiores com a utilização e despejo de antibióticos ou produtos derivados de antibióticos no meio ambiente. Houve uma alteração no perfil de resistência das bactérias do intestino de jundiá observadas do ano de 2010 para o ano de 2013. Há um leve indício de que a benzocaína possa ter tido algum efeito antimicrobiano sobre o resultado das bactérias do intestino dos peixes. E para finalizar, o controle do uso indiscriminado de antibióticos, juntamente com o controle de efluentes lançados nos rios e diminuição da utilização de antibióticos na criação animal serão essenciais para que exista uma alternativa terapêutica para tratar infecções. Apesar do cenário futuro parecer apocalíptico, se forem tomados esforços agora, a disseminação de bactérias resistentes poderá ser melhor controlada.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSÃO GERAL

Esta dissertação foi realizada com o objetivo de observar se a microbiota intestinal de jundiá (*Rhamdia quelen*) pode servir de bioindicadora de contaminação ambiental por antimicrobianos na água. Ao analisar os resultados de antibiograma pode-se observar que há uma relação positiva entre as atividades ao entorno do corpo d'água e a resistência a antibióticos encontrada. Foi observada uma mudança no perfil de resistência das bactérias estudadas ao longo de três anos (entre 2010 e 2013), onde houve uma diminuição da porcentagem de resistência bacteriana a alguns antibióticos. Com estes resultados podemos concluir que há uma tendência da microbiota intestinal de peixes servir de bioindicadora da carga de contaminação ambiental por antimicrobianos na água, ou bactérias resistentes na água.

Para estudos futuros seria interessante pesquisar o lodo dos rios, pois podem haver muitos compostos lá, como antibióticos, e fármacos de um modo geral que causam danos ao meio ambiente. Seria bom, quantificar a quantidade de antibióticos na água, identificar as fontes poluidoras do rio, e mapeá-las. Assim, posteriormente poderão ser criados modelos matemáticos, que abastecidos com dados sobre o perfil de ação antrópica ao entorno do rio e quantidades de poluentes na água, possam marcar pontos críticos de contaminação, para poder ser criado um plano de ação de descontaminação do rio, ou diminuição da carga antimicrobiana, bem como para controlar melhor o despejo de efluentes que contenham antibióticos ou bactérias resistentes, o que não ocorre atualmente.

## REFERÊNCIAS

Aarestrup FM. The origin, evolution, and local and global dissemination of antimicrobial resistance. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Washington, D. C. 2006. 339–360.

Abraham EP, Chain E. Purification and some physical and chemical properties of penicillin. British Journal of Experimental Pathology. 1942; 23: 103-115.

Abreu ET, Pretto JA, Caleare AO, Tavares CRG, Nakamura CV. Avaliação de resistência a antibiótico de bactérias isoladas do efluente hospitalar. Acta Scientiarum. 2010; 32:1-5.

Andreoli CV, Dalarimi O, Lara AI, Andreoli FN. Limites ao desenvolvimento da Região Metropolitana de Curitiba, impostos pela escassez de água. Revista Técnica da Sanepar. 2000; 12: 31-42.

Anvisa - Antimicrobianos, bases teóricas e usos clínicos. [Internet]. Anvisa; 2015 [citado em 08 de fevereiro de 2015]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/rm\\_controlere/opas\\_w eb/modulo1/bibliografia.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_w eb/modulo1/bibliografia.htm).

Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. Frontiers in Microbiology. 2010; 1:134.

Araújo AA. Desenvolvimento do sistema sensorial do jundiá *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) (Dissertação de Mestrado). Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná; 2011.

Austin B. The bacterial microflora of fish. The Scientific World Journal. 2002; 2: 558-572.

Baquero F, Martinez JL, Canton R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Current Opinion in Biotechnology. 2008; 19: 260-265.

Barros E, Machado A, Bittencourt H, Caramori ML, Sprinz E. Antimicrobianos: consulta rápida. Porto Alegre. 2008.

Batista RS, Gomes AP. Antimicrobianos guia prático. 2ª ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2010.

Bauer E, Williams BA, Smidt H, Verstegen MW, Mosenthin R. Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 2006; 7: 35-52.

Bila DM, Dezotti M. Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*. 2003; 26: 21945-21970.

Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman*. 12º ed. Porto Alegre: AMGH; 2012.

Burr G, Gatlin D, Rickes S. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*. 2005; 36: 425-436.

Cabello FC. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health for environment. *Environmental Microbiology*. 2006; 8: 1137-1144.

Cahill MM. Bacterial microbiota of fishes: a review. *Microbial Ecology*. 1990; 19: 265-280.

Caierão J, Antunes AG, Stefens M, Marco M, Azevedo PD. Novos Antimicrobianos: realidades e perspectivas. *NewsLab*. 2004; 66: 80-90.

Campos MJA, Nishiyama AS, Nakano V. Beta lactamases: Sua importância na resistência Bacteriana. [Internet] Departamento de Microbiologia Universidade de São Paulo. 2012 [citado em 02 de agosto de 2012]. Disponível em: [http://www3.icb.usp.br/bmm/mariojac/index.php?option=com\\_content&view=article&id=47&Itemid=57&lang=br](http://www3.icb.usp.br/bmm/mariojac/index.php?option=com_content&view=article&id=47&Itemid=57&lang=br)

Carneiro PCF, Mikos JD. Frequencia alimentar e crescimento de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*. *Ciência Rural*. 2005; 35: 187:191.



Carneiro DO, Figueiredo HCP, Pereira Jr DJ, Leal CAG, Logato PVR. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2007; 59: 869-876.

Caumo K, Duarte M, Cargnin ST, Ribeiro VB, Tasca T, Macedo AJ. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicação na clínica hospitalar. Revista Liberato. 2010; 11: 89-97.

Chee-Sanford I, Mackie RI, Koike S, Krapac IG, Lin YF, Yannarell AC, Maxwell S, Aminov RI. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. Journal of Environmental Quality. 2009; 28:1086-1108.

Chippari-Gomes AR. Temperaturas letais de larvas e alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824 – PISCES, PIMELODIDAE). Santa Maria – RS, 1998. 70 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Curso de Pósgraduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 1998.

Chopra I, Hesse L, O'Neill A. "Discovery and development of new anti-bacterial drugs," in Pharmacology Library. *Trends in Drug Research III*, ed. van der Goot H., editor. (Amsterdam: Elsevier Science B.V.). 2002; 32: 213–225.

COMEC – Coordenação da Região Metropolitana de Curitiba. Municípios da RMC. [Internet] COMEC. 2015 [citado 07 de abril de 2015]. Disponível em: <http://www.comec.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=89>

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third informational Supplement. M100 – S23. 2013.

Dellatorre CP, Rister DR, Monte EH, Azevedo JCR. Análise comparativa de contaminantes nas águas do Rio Barigui. [Internet]. Associação Brasileira de Recursos Hídricos. 2014 [citado em 20 de dezembro de 2014]. Disponível em: [https://www.abrh.org.br/sqcv3/UserFiles/Sumarios/17e6278b5e52a492d41ff285d638fd1b\\_f9f9d4e3b500171ce291b34899672423.pdf](https://www.abrh.org.br/sqcv3/UserFiles/Sumarios/17e6278b5e52a492d41ff285d638fd1b_f9f9d4e3b500171ce291b34899672423.pdf)

DePaola A, Peeler JT, Rodrick GE. Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of Gram-negative bacteria in catfish ponds. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995; 61: 2335-2340.

Donadio S, Maffioli S, Monciardini P, Sosio M, Jabes D. Antibiotic Discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives. *The Journal of Antibiotics*. 2010; 63: 423-430.

Fio SDF, Filho TRM, Groppo FC. Resistência bacteriana. *Revista Brasileira de Medicina*. 2000; 57: 1129-1140.

Fjellheim AJ, Playfoot KJ, Skjermo J, Vadstein O. Vibrionaceae dominates the microflora antagonistic towards *Listonella anguillarum* in the intestine of cultured Atlantic cod (*Gadus marhua* L.) larvae. *Aquaculture*. 2007; 269: 98-106.

Fleming A. On the antibacterial action of cultures of *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenza*. *British Journal of Experimental Pathology*. 1929; 10: 226-236.

Florey HW, Jennings MA. Some biological properties of highly purified penicillin. *British Journal of Experimental Pathology*. 1942; 23: 120-123.

Freitas CEC, Souza FKS. O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da bacia Amazônica. *Revista Agrogeoambiental*. 2009; 1: 39-45.

Gastalho S, Silva GJ, Ramos F. Uso de antibióticos em aquicultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. *Acta Farmacêutica Portuguesa*. 2014; 3: 29-45.

Giraud E, Douet DG, Le Bris H, Bouju-Albert A, Donnay-Moreno C, Thorin C, Pouliquen H. Survey of antibiotic resistance in an integrated marine aquaculture system under oxolinic acid treatment. *FEMS Microbiology*. 2006; 55: 439-448.

Godinho HM, Basile-Martins MA, Fenerich N, Narahara NY. Desenvolvimento embrionário e larval de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, Pimelodidae). *Revista Brasileira de Biologia*. 1978; 38: 151-156.

Gomes LC, Golombieski JI, Gomes ARC, Baldisserotto B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Ciência Rural*. 2000; 30: 179-185.

Gomiero LM, Souza UP, Braga FMS. Reprodução e alimentação de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) em rios do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, SP. *Biota Neotropical*. 2007; 7: 127-133.

Gordon L, Giraud JP, Ganière F, Armand A, Bouju-Albert N, Mangion C, LE BRIS, H. Antimicrobial resistance survey in a river receiving effluents from freshwater fish farms. *Journal of Applied Microbiology*. 2007; 102: 1167-1176.

Gropo FC, Castro FM, Volpato MC, Ranali J, Baglie RCC, Motta RHL, Baglie S. Atividade antimicrobiana, *in vitro*, de soluções anestésicas tópicas comerciais. *Revista Lecta*. 2003; 21: 15-20.

Guardabassi L, Jensen LB, Kruse H. Princípios da utilização prudente e racional de antimicrobianos em animais. *Guia de antimicrobianos em veterinária*. Artmed. Porto Alegre; 2010 p. 17-30.

Guedes DS. Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia spp*) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae). Santa Maria – RS. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 1980 p.99.

Hagi T, Tanaka D, Iwamura Y, Hoshino T. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquaculture*. 2004; 234: 335-346.

Hansen GH, Olafsen JA. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microbial Ecology*. 1999; 38: 1-26.

Hirakata Y, Izumikawa K, Yamaguchi T, Takemura H, Tanaka H, Yoshida R, Matsuda J, Nakano M, Tomoko K, Maesaki S, Kaku M, Yamada Y, Kamihira S, Kohno S. Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug –

rResistant gram negative rods carrying the metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla<sub>IMP</sub>* .  
Antimicrobial Agents Chemotherapy. 1998; 42: 2006-2011.

Hvistendahl M. China takes aim at rampant antibiotic resistance. *Science*. 2012; 336: 795.

Hooper LV, Gordon JI. Commensal hostbacterial relationships in the gut. *Science*. 2001; 292: 1115-1118.

Hovda MB, Bjorn TL, Fontanillas R, Rosnes JT. Molecular characterization of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmon salar* L.). *Aquaculture*. 2007; 272: 581-588.

Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC. Probiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2004; 18: 299-313.

Jensen HH, Hayes DJ. Impact of Denmark's ban on antimicrobials for growth promotion. *Current Opinion in Microbiology*. 2014; 19: 30-36.

Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT. Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*. 2002; 36: 1202-1211.

Kumar S, Dhankhar S, Arya VP, Yadav S, Yadav JP. Antimicrobial activity of *Salvadora oleoides* Decne against some microorganisms. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2012; 6: 2754-2760.

Kümmerer K. Drug in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere*. 2001; 45: 957-969.

Kümmerer K. Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003; 52:5–7.

Kümmerer K, Henninger A. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluents. *Clinical Microbiology and Infection*. 2003; 9: 1203-1214.

Kümmerer K. Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004; 54: 311-320.

Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part 1. *Chemosphere*. 2009; 75: 417-434.

Larson E. Community factors in the development of antibiotic resistance. *Annual Review of Public Health*. 2007; 28: 435-447.

Levinson W. *Microbiologia médica e imunologia*. Artmed. Porto Alegre. 2010.

Lee C, Langlois BE, Dawson KA. Detection of tetracycline resistance determinants in pig isolates from three herds with different histories of antimicrobial agent exposure. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993; **59**: 1467-1472.

Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, Spoering AL, Engels I, Conlon BP, Mueller A, Schaberle TF, Hughes DE, Epstein S, Jones M, Lazarides L, Steadman VA, Cohen DR, Felix CR, Fetterman KA, Millet WP, Nitti AG, Zullo AM, Chen C, Lewis K. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*. 2015; 22: 517-535.

Livermore DM, Winstanley TV, Shannon KP. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001; 48: 87-102.

Lopes JM. Influência do pH da água na sobrevivência e crescimento de larvas de jundiá *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824, PISCES, PIMELODIDAE) em duas épocas de desovas. Santa Maria – RS, 1998. 60 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 1998.

Makino LC, Faustino F, Paes MCF, Beraldo-Massoli MC, Cardoso MV, Schocken-Iturrino RP, Nakaghi LSO. Morfologia e quantificação da microbiota intestinal do curimatá (*Prochilodus lineatus*) e do cascudo cinza (*Pterygoplichthys anisitsi*) cultivados em cativeiro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2012; 64: 916-926.

Martins AGLA. Efeitos da emissão dos efluentes domésticos na proliferação de *Aeromonas* spp em águas de superfície e pescado do estuário do Rio Bacanga, São Luís – MA. (Dissertação de Mestrado). Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza; 2005.

Maffezzolli G, Nuñez APO. Crescimento de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae), em diferentes concentrações de oxigênio dissolvido. Acta Scientiarum Biological Sciences. 2006; 8: 41-45.

Marchioro MI. Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Pimelodidae) à variação de pH e salinidade da água de cultivo. Santa Maria, RS, 1997. 87p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 1997.

Mauerwerk MT. Isolamento, identificação e perfil de resistência a antibióticos de bactérias isoladas do intestino de peixes e da água oriundos de ambientes naturais e de criação (Dissertação de Mestrado). Curitiba, PR: Pontifícia Universidade Católica do Paraná; 2012.

Mc Nulty CAM, Francis NA. Optimizing antibiotic prescribing in primary care settings in the UK: findings of a BSAC multi-disciplinary workshop. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2010; 65: 2278–2284.

Melo VV, Duarte IP, Queiroz A. Guia de Antimicrobianos. Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás. 2012.

Molinari LM, Scoaris DO, Pedroso R, Bittencourt NLR, Nakamura CV, Nakamura TU. Bacterial microflora in the gastrointestinal tract of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultured in a semi-intensive system. Acta Scientiarum Biological Sciences Maringa. 2003; 25: 267 – 271.

Möstald S, Lundborg CS, Karlsson AK, Cars O. Antibiotic prescription rates vary markedly between 13 European countries. Scandinavian Journal of Infectious Diseases. 2002; 34: 366–371.

Murray PR, Tenover FC, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. American Society for Microbiology. Washington, DC. 1995.

Narahara MY, Godinho HM, Romagosa E. Estrutura da população de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelodidae). Boletim do Instituto de Pesca. 1985; 12: 123-137.

Navarrete P, Magne F, Mardones P, Riveros M, Opazo R, Suau A, Pochart P, Romero J. Molecular analysis of intestinal microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Microbiology Ecology*. 2010;71: 148-156.

Novareti MCZ, Aquino S, Piscopo MR. Controle de vendas de antibióticos no Brasil: Análise do efeito dos atos regulatórios no uso abusivo pelos consumidores. Revista Acadêmica São Marcos. 2014; 2: 25-39.

OMS. Relatório Mundial de Saúde: Financiamento dos Sistemas de Saúde. [internet]. [Local Desconhecido]: Organização Mundial da Saúde. 2010 [citado em 10 de Agosto de 2015]. Disponível em:  
<http://www.who.int/eportuguese/publications/WHR2010.pdf?ua=1>

Pereira AL, Pita JR. Alexander Fleming (1881-1955) Da descoberta da penicilina (1928) ao prêmio Nobel (1945). Revista da Faculdade de Letras. História. 2005; 6: 129-151.

Prefeitura Municipal de São José dos Pinhais. Mapa hidrográfico de São José dos Pinhais identificando os principais rios e seus afluentes [internet]. São José dos Pinhais; 2015 [citado 02 de outubro de 2015]. Disponível em:  
<http://www.sjp.pr.gov.br/hidrografia/>

Pruden A, Larsson DGJ, Amézquita A, Collignon P, Brandt KK, Graham DW, Lazorchak JM, Suzuki S, Silley P, Snape JR, Topp E, Zhang T, Zhu YG. Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. 2013; 121: 878-885.

Reginato BJ, Leal RMP. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. *Revista Brasileira de ciência do solo*. 2010; 34: 601-616.

Ringo E, Birkbeck TH. Intestinal microbiota of fish larvae and fry. *Aquaculture Research*. 1999; 30: 73-97.

Ringo E, Gatesoup FJ. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*. 1998; 160: 177-203.

Ringo E, Olsen RE. The effect of diet on aerobic bacterial microbiota associated with intestine of Artic charr (*Salvenius alpinus* L.). *Journal of Applied Microbiology*. 1999; 86: 22-28.

Ringo E, Sperstad S, Myklebust R, Refstie S, Krogdahl A. Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. *Aquaculture*. 2006; 261: 829-841.

Rivera-Tapia JA. Antibiotic resistance: public health problem. *Anales Medicos Hospital ABC*. 2003; 48: 42-47.

SBI – Sociedade Brasileira de Infectologia. Adoção de antibiótico e Crescimento da Resistência Bacteriana. [Internet]. [Citado 08 de novembro de 2010].

Santos I, Kobiyama M. Aplicação do TOPMODEL para a determinação de áreas saturadas da bacia do rio Pequeno, São José dos Pinhais, PR, Brasil. *Revista Ambiente e Água*. 2008; 3: 77-89.

Schmidt AS, Bruun MS, Dalsgaard I, Pedersen K, Larsen JL. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000; 66: 4908-4915.

Shales DM, Gerding DN, John JF Jr, Craig WA, Bornstein DL, Duncan RA, Eckman MR, Farrer WE, Greene WH, Lorian V, Levy S, McGowan JE Jr, Paul SM, Ruskin J, Tenover FC, Watanakunakorn C. *Society for healthcare epidemiology of America and*



infectious diseases society of America joint committee on prevention of antimicrobial resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospital. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 1997; 25: 584-599.

Shoemaker NB, Vlamakis H, Hayes K, Salyers AA. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001; 67: 561-568.

Silfvergrip AMC. A sistematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae). Stockholm, Sweden, 1996. 156p. (PhD Thesis) - Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, 1996.

Sorum H, Abée-Lund TM. Antibiotic resistance in food-related bacteria – a result of interfering with the global web of bacterial genetics. *International Journal of Food Microbiology*. 2002; 78: 43-56.

Spellberg B, Guidos R, Gilbert D, Bradley J, Boucher HW, Scheld WM, Bartlett JG, Edwards JJ. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 2008; 46: 155-164.

Stephens P. Para OMS, resistência de bactérias a antibióticos é “ameaça global”. *BBC News*. [Internet]. [Citado 30 de abril de 2014]. Disponível em: <[http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2014/04/140430\\_resistencia\\_antibioticos\\_r\\_b](http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2014/04/140430_resistencia_antibioticos_r_b)>.

Sugita H, Kawasaki J, Deguchi Y. Production of amylase by intestinal microbiota in culture freshwater fish. *Letters in Applied Microbiology*. 1997; 24: 105-108.

SUDERHSA. Superintendência de Desenvolvimento de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental. Mapa hidrológico das Sub-Bacias do Alto Iguaçu [internet] Paraná: Instituto das Águas do Paraná; 2000 [citado em 02 de outubro de 2015]. Disponível em: <http://www.aguasparana.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=90>

SUDERHSA. Superintendência de Desenvolvimento de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental. Capacidade do sistema atual e medida de controle de cheias. Relatório Final. Vol. 4. Dez. 2002.

Tavares W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2000; 33: 281-301.

Trust TJ, Bull LM, Currie BR, Buckley JT. Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microbiota of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), goldfish (*Carassius auratus*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of the Fisheries Research Board of Canada. 1979; 36: 1174-1179.

Villa AT. Avaliação Ambiental de qualidade da água do Lago do Parque Barigui: Potencial de Poluição Orgânica. Curitiba 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental) – Setor de tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Weis MLC. Interpretação da idade e cálculo da curva de crescimento do jundiá, *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824) do banhado de Santa Catarina - RS. Santa Maria - RS. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 1980 p.93.

Wise R, Hart T, Cars O, Streulens M, Helmuth R, Huovinen P, Sprenger M. Antimicrobial resistance - major threat to public health. British Medical Journal. 1998; 317: 609-610.

WHO. ANTIMICROBIAL RESISTANCE: Global Report on Surveillance. World Health Organization. 2014.

Zuccato, E. Calamari D, Natangelo M, Fanelle R. Presence of therapeutic drugs in the environment. The Lancet. 2000; 335: 1789-1790.

## APÊNDICES E ANEXOS

### TABELA DA LABORCLIN DO CLSI DE 2013 PARA VALIDAR ANTIBIOGRAMA COM CEPAS ATCC.

Tabela 2: Controle de Qualidade por teste de Disco Difusão.

Valores de halos inibitórios esperados para Controle de Qualidade (mm)							
Agente	Código	Concentração	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. coli</i> ATCC 35218	Observações
Acido Nalidixico	NAL	30 µg	22-28	-	-	-	
Amicacina	AMI	30 µg	19-26	20-26	18-26	-	
Amoxicilina + clavulanato	AMC	20/10 µg	18-24	28-36	-	17-22	
Ampicilina	AMP	10 µg	16-22	27-35	-	6	
Ampicilina + Sulbactam	ASB	10/10 µg	19-24	29-37	-	13-19	
Azitromicina	AZI	15 µg	-	21-26	-	-	
Aztreonam	ATM	30 µg	28-36	-	23-29	-	
Carbencilina	-	100 µg	23-29	-	18-24	-	
Cefaclor	CFC	30 µg	23-27	27-31	-	-	
Cefazolina	CFZ	30 µg	21-27	29-35	-	-	
Cefdinir	-	5 µg	24-28	25-32	-	-	
Cefepime	CPM	30 µg	31-37	23-29	24-30	-	
Cefixime	CFM	5 µg	23-27	-	-	-	
Cefmetazole	-	30 µg	26-32	25-34	-	-	
Cefalexina	CFX	30 µg	15-21	29-37	-	-	
Cefamandole	-	30 µg	26-32	26-34	-	-	
Cefalotina	CFL	30 µg	15-21	29-37	-	-	
Cefetamet	CFT	10 µg	24-29	-	-	-	
Cefonicid	-	30 µg	25-29	22-28	-	-	
Cefoperazona	-	75 µg	28-34	24-33	23-29	-	
Cefotaxima	CTX	30 µg	29-35	25-31	18-22	-	
Cefotetan	-	30 µg	28-34	17-23	-	-	
Cefoxitina	CFO	30 µg	23-29	23-29	-	-	
Cefpodoxima	-	10 µg	23-28	19-25	-	-	
Cefprozil	CEZ	30 µg	21-27	27-33	-	-	
Ceftazidima	CAZ	30 µg	25-32	16-20	22-29	-	
Ceftriaxona	CRO	30 µg	29-35	22-28	17-23	-	
Cefuroxima	CRX	30 µg	20-26	27-35	-	-	
Ciprofloxacina	CIP	5 µg	30-40	22-30	25-33	-	
Clarithromicina	CLA	15 µg	-	26-32	-	-	
Clindamicina	CLI	2 µg	-	24-30	-	-	
Cloranfenicol	CLO	30 µg	21-27	19-26	-	-	
Colistina	-	10 µg	11-17	-	11-17	-	
Doripenem	-	10 µg	27-35	33-42	28-35	-	
Doxiciclina	DOX	30 µg	18-24	23-29	-	-	
Ertapenem	-	10 µg	29-36	24-31	13-21	-	
Eritromicina	ERI	15 µg	-	22-30	-	-	
Estreptomicina	-	10 µg	12-20	14-22	-	-	
Fosfomicina	-	200 µg	22-30	25-33	-	-	

**Condições para o teste:**

- Meio: para Disco Difusão - Agar Mueller Hinton 90x15mm ou 140x15mm
- Inoculo: suspensão realizada direto da colônia "over night", equivalente a escala 0,5 de Mac Farland
- Incubação: temperatura de 35±2°C, por 20 a 24 horas em ar ambiente.

**TABELA COM HALOS PARA LER OS RESULTADOS DO ANTIBIOGRAMA  
PELO CLSI 2013**

ATB	CLSI 2013			GRUPO
	<=R	I	>=S	
<b>AMP</b> 30µg	13	14-16	17	A
<b>GEN</b> 10 µg	12	13-14	15	A
<b>NAL</b> 30µg	13	14-18	19	*
<b>SUT</b> 1,25/23,75 µg	10	11-15	16	B
<b>TET</b> 30µg	11	12-14	15	*
<b>ETP</b> 10 µg	18	19-21	22	B
<b>CFL</b> 30µg	14	15-17	18	*
<b>CFO</b> 30µg	14	15-17	18	B
<b>CM</b> 30µg	14	15-17	18	B
<b>CRO</b> 30µg	19	20-22	23	B

AMP = ampicilina; GEN = gentamicina; NAL = Ácido nalidíxico; SUT = Sulfametazol-trimetropim; TET = tetraciclina; ETP = Ertapenem; CFL = Cefalotina; CFO = Cefoxitina; CM = Cefepime; CRO = Ceftriaxona. R = Resistente; I = Intermediário; S = Sensível. Grupo A = Antibióticos de primeira escolha para uso na rotina medica; Grupo B = Antibiótico de segunda escolha na rotina médica (somente quando o Grupo A apresenta resistência); Grupo C = Drogas suplementares (usados somente quando grupos A e B apresentam resistência).

## TABELA DA LABORCLIN COM DADOS DE RESISTÊNCIA INTRÍNSECA DE ENTEROBACTÉRIAS AOS ANTIBIÓTICOS.


	<h3 style="margin: 0;">ANTIBIOGRAMA</h3>	Rev.: 07 03/2013
---	--	---------------------

Tabela 11: Resistência Intrínseca para *Enterobacteriaceae*.

Agente antimicrobiano  Organismo	Ampicilina	A moxacilina-clavulonato	Ampicilina-sulbactam	Piperacilina	Ticarcilina	Cefalosporina I: Cefazolina, Cefalotina	Cefamandolam: Cefalotina, Cefotetan	Cefalosporinas II: Cefuroxima	Tetraciclina	Nitrofurantoina	Polimixina B e Colistina
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R			R	R	R			
<i>Citrobacter koseri</i>	R	R	R	R	R						
<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	R			R	R	R			
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R			R	R	R			
<i>Escherichia coli</i>	Não há resistência intrínseca para beta-lactâmicos neste micro-organismo										
<i>Escherichia hermannii</i>	R				R						
<i>Hafnia alvei</i>	R	R	R			R	R				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R				R						
<i>Morganella morganii</i>	R	R				R		R	R	R	R
<i>Proteus mirabilis</i>	Não há resistência intrínseca para beta-lactâmicos neste micro-organismo										
<i>Proteus penneri</i>	R					R		R	R	R	R
<i>Proteus vulgaris</i>	R					R		R	R	R	R
<i>Providencia rettgeri</i>	R	R				R			R	R	R
<i>Providencia Stuart</i>	R	R				R			R	R	R
<i>Salmonella e Shigella spp.</i>	Não há resistência intrínseca para beta-lactâmicos neste micro-organismo										
<i>Serratia marscens</i>	R	R				R		R			R
<i>Yersinia enterocolitica</i>	R	R			R	R					

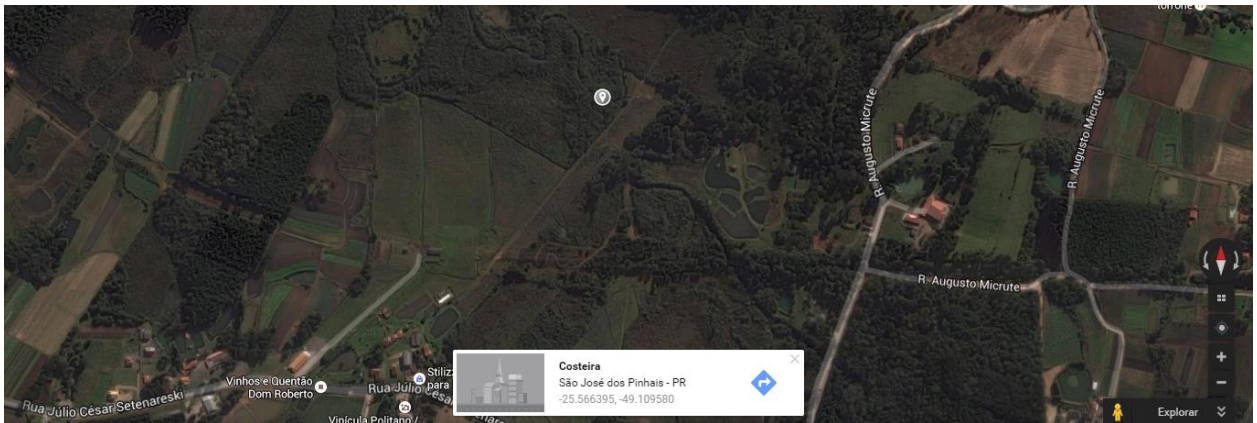
Observação:  
Cefalosporinas III (3ª geração), cefepime, aztreonam, ticarcilina-clavulonato, piperacilina-tazobactam e carbapenênicos não estão listados pois não apresentam resistência intrínseca em *Enterobacteriaceae*.

## PONTOS DE COLETA

### Rio Barigui



### Rio Pequeno



### Laboratório de Pesquisa e Piscicultura da PUCPR (LAPEP)

