

PERFIL DE RESISTÊNCIA DE *PSEUDOMONAS SP.* ISOLADAS DE LESÕES CUTÂNEAS DE CÃES DO HCV-UFPel E ATIVIDADE *IN VITRO* DA FAMÍLIA LAMIACEAE

KARINA GUTERRES¹; CLAUDIA GIORDANI²; CAROLINE DE MATOS³; CRISTINE DA SILVA⁴; SILVIA LADEIRA⁵; MARLETE CLEFF⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – UFPel – guterres.karina@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – UFPel – claarte@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – UFPel – bohnenecarol@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – UFPel – criscioato@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – UFPel – s.ladeira@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – UFPel – emebrum@bol.com.br

1. INTRODUÇÃO

Dentre as afecções na clínica de animais de companhia, as lesões cutâneas destacam-se pela alta frequência, sendo infectadas em 70% dos casos por bacilos Gram negativos, com predominância do gênero *Pseudomonas* (30%) (ARIAS et al., 2008). Tratando-se da instituição de uma terapia antimicrobiana adequada, esta pode ser atrasada quando o antibiótico de primeira escolha não é eficaz, e a escolha deste torna-se mais limitada quanto mais resistente se apresentar a bactéria, tendo sido observada 100% de resistência de bactérias do gênero *Pseudomonas* frente aos antibióticos testados (SALAZAR, 2011).

Atualmente a resistência bacteriana aos antimicrobianos é fonte de preocupação para a medicina veterinária, sendo o uso impróprio e abusivo dos antibióticos uma das principais causas do surgimento e seleção de bactérias resistentes (MEIRELES, 2008).

Devido a essa crescente problemática, novas pesquisas vêm sendo realizadas, incluindo os estudos com extratos de plantas medicinais, destacando-se as plantas pertencentes à família Lamiaceae, como *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis*. Estas plantas, em diversos tipos de extratos, apresentam ação antimicrobiana, servindo como base para obtenção de novas moléculas potencialmente ativas contra os microrganismos resistentes (CLEFF, 2008).

Devido à grande presença do gênero *Pseudomonas* na dermatologia veterinária e a resistência que este vem demonstrando frente aos antimicrobianos, objetivou-se isolar e traçar o perfil de resistência de isolados provenientes de lesões cutâneas de cães frente a antibióticos e a extratos da família Lamiaceae.

2. METODOLOGIA

O estudo foi realizado através da coleta de secreções de lesões cutâneas ulceradas de cães com swab estéril, atendidos durante o período de abril de 2013 a abril de 2014 no HCV-UFPel. Após, o material foi semeado em placas de Petri com Ágar Sangue e Ágar MacConkey, permanecendo em estufa a 37°C, durante 24 horas, no Laboratório de Bacteriologia - UFPel. Após o crescimento das colônias bacterianas, foram consideradas as características macroscópicas e microscópicas das mesmas, sendo a identificação do gênero e espécie bacteriana realizada através de provas bioquímicas e confirmada após pelo método automatizado Vitek®.

Realizada a identificação bacteriana, foram feitos os antibiogramas em placas contendo Ágar Mueller-Hinton, através da técnica de Kirby-Bauer (1966), utilizando-

se para isto, inóculo equivalente a 0,5 na Escala de McFarland. A suscetibilidade antimicrobiana foi avaliada *in vitro* utilizando os antibióticos ampicilina (10 mcg), amoxicilina (30 mcg), cefalexina (30 mcg), ceftriaxona (30 mcg), enrofloxacin (5 mcg), neomicina (30 mcg), oxacilina (1 mcg) e penicilina G (10 un).

As plantas da família Lamiaceae utilizadas no estudo foram obtidas de distribuidores comerciais, com certificação de origem e qualidade. O extrato utilizado foi o óleo essencial, sendo obtido através da submissão das folhas secas à extração com arraste de vapor em aparelho Clevenger, segundo a Farmacopéia Brasileira IV.

O teste de susceptibilidade dos isolados bacterianos, frente aos óleos foi realizado de acordo com o documento CLSI M7-A8 (2009), utilizando-se para isto o teste de microdiluição em caldo, com modificação para fitofármacos, sendo testadas as concentrações de 250 a 0,4882 µg/mL.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A resistência aos antimicrobianos é inerente às bactérias, sendo causada basicamente pela evolução destas, pela mutação espontânea e recombinação de genes, que criam variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural aos mais aptos (ANDRADE, 2002), sendo atualmente utilizados os métodos laboratoriais a fim de se avaliar o grau de resistência de isolados clínicos frente aos antimicrobianos (AGOSTINIS et al., 2012).

Segundo AMALSADVALA & SWAIM (2006), podem existir vários tipos de microorganismos em um mesmo ferimento, destacando-se *Pseudomonas sp.*, entre os microorganismos Gram -. Neste estudo foram identificados um total de 10 isolados bacterianos referentes ao gênero *Pseudomonas* dos 40 cães com lesões cutâneas atendidos no HCV-UFPel, correspondendo a 72% dos isolados bacterianos Gram -, sendo a espécie *P.aeruginosa*, isolada em 90% dentro do gênero.

Em relação aos óleos testados, os óleos de alecrim e manjerona apresentaram CIM variando de 7,8125 a 250 µg/mL e CBM de 15,625 a 250 µg/mL, já o óleo de orégano apresentou CIM variando de 3,906 a 250 µg/mL e CBM de 62,5 a 250 µg/mL (Tabela 1).

HUSSAIN et al. (2010), avaliou a atividade antibacteriana do óleo essencial de *R. officinalis* frente a *P. aeruginosa*, encontrando valores de CIM de 1,26 µg/mL, já RIBEIRO (2011), encontrou valores de CIM superiores a 900 µg/mL frente a *P. aeruginosa*, sendo esta concentração superior às encontradas neste estudo.

O óleo essencial de *O. vulgare* foi testado frente *P. aeruginosa* por OYAZARBAL (2011), não apresentando atividade, já PRESTES et al., (2008), obteve CIM em uma concentração de 12%, frente a ATCC estudada, enquanto neste estudo, obteve-se CIM variando de 3,906 a 250 µg/mL.

Em relação a *O. majorana*, este foi testado por BUSATTA (2006), através do método de difusão em ágar com 20 bactérias, sendo a espécie *P. aeruginosa* (ATCC 27853) a única que não apresentou halo de inibição. De acordo com NAKAMURA et al. (1999), o óleo essencial de manjerona não apresenta atividade contra *P. aeruginosa*, fato contrário visto neste estudo, em que houve CIM variando de 7,8125 a 250 µg/mL e CBM de 15,625 a 250 µg/mL.

A ação antimicrobiana da família Lamiaceae observada pode ser atribuída a capacidade dos seus compostos químicos de aumentar a permeabilidade da membrana citoplasmática do microorganismo, provavelmente causando uma destruição na estrutura física da membrana do mesmo (ULTEE & SMID, 2001).

Tabela 1. Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos essenciais de alecrim, manjerona e orégano ($\mu\text{g/mL}$) frente ao gênero *Pseudomonas* isolado de lesões cutâneas de caninos atendidos no HCV – UFPel.

Isolados	Alecrim($\mu\text{g/mL}$)		Manjerona($\mu\text{g/mL}$)		Orégano($\mu\text{g/mL}$)	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
1	>250	>250	250	250	>250	>250
2	250	250	31,25	31,25	62,5	62,5
3	>250	>250	250	250	>250	>250
4	>250	>250	250	250	>250	>250
5	>250	>250	250	250	>250	>250
6	>250	>250	250	>250	>250	>250
7	>250	>250	>250	>250	>250	>250
8	7,8125	15,625	7,8125	15,625	3,906	62,5
9	>250	>250	250	250	>250	>250
10*	>250	>250	250	250	>250	>250

**Pseudomonas putida*

Em relação aos testes de sensibilidade frente aos antibióticos, o gênero *Pseudomonas* apresentou 100% de resistência a Ampicilina, Amoxicilina, Cefalexina, Oxacilina e Penicilina, e frente à Ceftriaxona e Neomicina apresentou 50% e 37% respectivamente, sendo 100% sensível a enrofloxacin. Ampicilina, amoxicilina e penicilina G são fármacos muito utilizados no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram -, porém neste estudo esses antibióticos não apresentaram eficácia, concordando com CRUZ et al. (2012), que citam um aumento drástico da resistência a estes antimicrobianos em decorrência da ampla utilização na terapêutica, muitas vezes de forma inadequada.

O gênero *Pseudomonas* apresentou alta porcentagem de resistência frente às cefalosporinas de primeira geração, não havendo atividade, porém a ceftriaxona, cefalosporina de terceira geração, apresentou melhor desempenho, agindo sobre 50% dos isolados corroborando com dados obtidos por CRUZ et al. (2012).

Todos os isolados foram resistentes a 60 ou 80% aos antibióticos testados, sendo que segundo PESSOA (2013), *P. aeruginosa* possui mecanismos naturais e adquiridos de resistência que tornam difícil o tratamento do paciente infectado e isso ocorre graças à baixa permeabilidade de sua membrana, à capacidade de formar biofilme, de carrear plasmídeos e genes de resistência e aos mecanismos de resistência adquirida, como a hiperexpressão de bombas de efluxo, a produção de β -lactamases e a perda ou expressão reduzida de proteínas de membrana externa.

Em medicina veterinária, os aminoglicosídeos e as quinolonas têm mostrado boa efetividade contra *P. aeruginosa* isoladas de otite externa canina, sendo as fluoroquinolonas boas escolhas no tratamento de piodermites, havendo, porém casos de resistência a tais fármacos mais frequentes, em decorrência à resistência progressiva a essa classe de antibióticos. Além disto, SILVA et al. (2014) citam o aumento de resistência frente às fluorquinolonas devido a utilização frequente e indiscriminada na terapia de dermatopatias e outras infecções, principalmente da enrofloxacin, a qual, no Brasil, é facilmente adquirida.

Segundo FRENCH (2005), o aumento das resistências afeta a eficácia do tratamento com o antibiótico, trazendo consequências a nível clínico como aumento

da mortalidade e morbidade, assim como conseqüências econômicas como o aumento dos custos de hospitalização e terapêutica.

4. CONCLUSÕES

O gênero *Pseudomonas* apresentou grande resistência frente a maioria dos antibióticos testados. Já a família Lamiaceae apresentou atividade *in vitro* frente aos isolados de *Pseudomonas sp.*, sendo promissora como alternativa em casos de resistência bacteriana, porém são necessários mais estudos, principalmente em relação a testes de toxicidade *in vitro*, para posteriores testes de eficiência e toxicidade *in vivo*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMALSADVALA, T.; SWAIN, S.F. Management of hard-to-healwounds. **VeterinaryClinics of North America Small Animal Practice**,v.36, n.4, p.693-711, 2006.
- ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**. 2.ed. São Paulo: Roca; 2002.
- ARIAS, M. V. B. et al. Identificação da suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de cães e gatos com feridas traumáticas contaminadas e infectadas. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 29, n. 4, p. 861-874, out./dez. 2008.
- BUSATTA, C. **Caracterização química e atividade antimicrobiana *in vitro* e em alimentos dos extratos de orégano e manjerona**. 2006. 110f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2006.
- CLEFF, M. B. **Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. frente a fungos de importância em veterinária com ênfase em *Candida spp.***129f.2008. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, UFRGS, 2008..
- CRUZ, A.R.; PAES, A.C.; SIQUEIRA, A.K. Perfil de sensibilidade de bactérias patogênicas isoladas de cães frente a antimicrobianos. **Veterinaria e Zootecnia.**, v.19, n.4, p.601-610, 2012.
- FRENCH, G.L. Clinical impact and relevance of antibiotic resistance.**Advanced DrugDelivery Reviews**, v.57, n.10, p. 1514-1527, 2005.
- HUSSAIN, A.I. et al. *Rosmarinusofficinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal Microbiology*, v.41, n.4, p.1070-1078, 2010.
- MEIRELES, M. A. O. M. Uso de antimicrobianos e resistência bacteriana: aspectos socioeconômicos e comportamentais e seu impacto clínico e ecológico. 2008. 47f. Monografia apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.
- PESSOA, V. S. *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiologia e resistência a antimicrobianos em hospital universitário do sudeste do Brasil. 2013. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.
- RIBEIRO, D. S. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) frente a bactérias isoladas de alimentos: estudos *in vitro* e em matriz alimentícia**. 2011. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade federal da Bahia, Salvador.
- SANTOS, M. R. et al. Suscetibilidade a antimicrobianos, de bactérias isoladas de diversas patologias em cães e gatos, nos anos de 2002 e 2003. **Veterinária em Foco**,v.2, n.2, p.157-164, 2005.
- SILVA, A. et al. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus spp.* isolados de cães com pioderma superficial.**Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.4, p. 355-361, 2014.
- ULTEE, A.; SMID, E.J. **Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus***. *International Journal Food of Microbiology*, v.64, 373-378, 2001.
- NAKAMURA, C. V. et al. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, 1999.
- OYAZARBAL, M. E. B. Aplicação do óleo essencial de orégano no tratamento de mastite bovina e presença de fungos no leite bovino *in natura*. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, UFRGS, 2011.
- PRESTES, L. S. Actividad de extractos de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados con otitis externa. *Rev Cubana Plant Med* v.13 n.4 Ciudad de la Habana sep.-dic. 2008.