

PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS PARA ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS INDICADORAS DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Maria Eduarda Peretti¹, Jalusa Deon Kich² e Raquel Rebelatto³

¹Graduanda em Engenharia de Alimentos pelo Instituto Federal Catarinense, Campus Concórdia, Estagiário da Embrapa Suínos e Aves, Bolsista CNPQ/PIBIC, dudaperetti@hotmail.com

²Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves

³Analista da Embrapa Suínos e Aves

Palavras-chave: bactérias indicadoras de resistência antimicrobiana, sistemas de tratamento de dejetos, suinocultura.

INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios atuais do setor agropecuário é a redução do uso de antimicrobianos como medida de controle da resistência antimicrobiana (RAM) e sua dispersão no meio ambiente (1). Existem bactérias indicadoras de resistência, que na suinocultura, podem ser isoladas na entrada e saída dos sistemas de manejo de dejetos. A preservação das bactérias indicadoras de RAM é fundamental para o sucesso do isolamento e estudo da resistência e depende da matriz de coleta, do tempo e preservação entre coleta e processamento laboratorial. Diferentemente de trabalhos com finalidade de quantificar bactérias presentes nas amostragens, o objetivo deste estudo é preservar bactérias indicadoras de RAM, independentemente das diferenças entre quantificação inicial e final, a fim de isolar as mesmas e utilizar para estudos fenotípicos e moleculares de resistência. Assim, a fim de avaliar a metodologia a ser utilizada posteriormente para obter bactérias indicadoras de RAM, neste trabalho foi estudada a preservação de *Escherichia coli* (*E.coli*) e *Enterococcus sp* em amostras coletadas em diferentes sistemas de tratamento de dejetos e preservadas em distintas temperaturas, com e sem pré-cultivo em meios com e sem antimicrobianos (ATM).

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas de dejetos foram realizadas na Embrapa Suínos e Aves, em diferentes sistemas de tratamentos de dejetos de suínos: 1) saída de composteira, 2) entrada da Estação de Tratamento de Dejetos Suínos (ETDS), 3) saída do biodigestor (UASB) da ETDS e 4) ETDS com adição de inóculo de *E. coli* isolada de fezes de suíno na concentração de 10^4 UFC/mL (controle positivo). As amostras foram armazenadas e transportadas em frascos estéreis e temperatura ambiente até o laboratório, para pesquisa de *E.coli* e *Enterococcus sp.*, seguindo metodologia apropriada (2). No dia da coleta (Dia zero - DO), de cada uma das quatro amostras, foi separada uma alíquota e realizada diluição seriada na base 10, plaqueamento de cada diluição, em duplicata, e incubação das placas para contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC). O restante de cada amostra foi diluído 1:10 em água peptonada (AP) e dividido em 2 partes, sendo que uma foi subdividida em outras 3 alíquotas para conservação em diferentes temperaturas: nitrogênio líquido, refrigeração (entre 4 e 8°C) e congelamento (-20°C). A outra parte foi subdividida em duas alíquotas cultivadas com e sem antimicrobianos *overnight* a 37°C e, posteriormente, congeladas. Quatorze dias após o armazenamento, as amostras foram retiradas do nitrogênio, congelamento e refrigeração e foram deixadas em temperatura ambiente até equalização das temperaturas. Foi, então, realizada mesma metodologia de diluição seriada, plaqueamento, incubação e contagem UFC/mL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

À contagem de *E. coli* da amostra controle positivo, no DO, foi dois logaritmos superior à do inóculo, o que demonstra que a metodologia funcionou, uma vez que o objetivo é a preservação de bactérias que possam ser indicadoras de RAM, independentemente da quantificação inicial na matriz de coleta.

A utilização de AP com ATB foi testada com intuito de avaliar possível diminuição de outras bactérias e, conseqüentemente, melhor preservação das bactérias indicadoras de RAM. Porém, a utilização de AP sem o uso de ATB mostrou melhor preservação das bactérias indicadoras de RAM.

Para *E. coli* (Tabela 1), a amostragem de saída de composteira não possibilitou contagem de bactérias, com exceção do DO. As demais matrizes de coleta e metodologias testadas permitiram contagem variando entre 10^3 e 10^{10} UFC/mL, com exceção da amostra de saída de biodigestor preservada a -20°C e ETDS refrigerada, nas quais não houve crescimento colônias de *E.coli*.

Para *Enterococcus* (Tabela 2), todas as matrizes de coleta e metodologias testadas permitiram contagem, variando entre 10^3 e 10^{10} UFC/mL, com exceção da amostra de entrada da ETDS e saída de composteira que foram cultivadas em AP com ATB e preservadas a -20°C, nas quais não houve crescimento colônias de *Enterococcus sp.*

As contagens mais uniformes entre as diferentes matrizes de coleta, tanto para *E. coli* quanto para *Enterococcus sp.* foram obtidas com pré-cultivo em AP sem ATB e congelamento a -20°C.

CONCLUSÕES

Para contagem de *E. coli* e *Enterococcus sp.*, de amostras coletadas de diferentes sistemas de tratamento de dejetos de suínos e conservadas por 14 dias pós coleta, a metodologia ideal foi pré-cultivo em AP sem ATB e congelamento a -20°C.

REFERÊNCIAS

1. OIE. World Organisation for Animal. **OIE Annual report on antimicrobial agents intended for use in animals**. Third report, 2018.
2. QUINN, P.J., MARKEY, B.K, CARTER, M.E., DONNELLY, W.J., LEONARD, F.C. In: Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. 1 ed., São Paulo: Artmed, 2005, 512p.

Tabela 1. Resultado das contagens de *Escherichia coli*.

Matriz de coleta das amostras	Metodologias de preservação					
	D0	Nitrogênio	4°C	-20°C	Cultivo AP com ATB Overnight e -20°C	Cultivo AP sem ATB Overnight e -20°C
ETDS - Entrada	2,20E+03	3,94E+04	3,94E+04	6,90E+03	4,30E+05	1,35E+07
Biodigestor - Saída	4,50E+03	6,00E+04	6,00E+04	0,00E+00	8,35E+07	9,05E+07
Composteira - Saída	3,30E+05	°	°	°	°	°
ETDS + Inóculo	1,00E+06	7,10E+04	°	4,90E+04	1,47E+10	9,00E+06

° Crescimento de outras colônias.

Tabela 2. Resultado das contagens de *Enterococcus*.

Matriz de coleta das amostras	Metodologias de preservação					
	D0	Nitrogênio	4°C	-20°C	Cultivo AP com ATB Overnight e -20°C	Cultivo AP sem ATB Overnight e -20°C
ETDS - Entrada	2,80E+05	2,85E+04	0,00E+00	7,85E+04	°	2,85E+09
Biodigestor - Saída	6,50E+03	1,15E+04	3,05E+04	8,85E+03	1,83E+08	1,00E+08
Composteira - Saída	7,50E+03	2,95E+04	8,35E+04	1,90E+04	°	4,45E+07
ETDS + Inóculo	2,20E+05	1,73E+05	1,93E+05	2,95E+03	3,32E+10	6,30E+09

° Crescimento de outras colônias.