

II-1079 - ANÁLISE DE *ENTEROCOCCUS* EM AMOSTRAS DE DEJETOS DE SUÍNOS TRATADOS POR BIODIGESTÃO ANAERÓBIA: VERIFICAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANO UTILIZADO NA SUINOCULTURA

Alessandra Rodrigues de Santana ⁽¹⁾

Bacharela em Ciência e Tecnologia pela Universidade Federal do ABC (UFABC), Engenheira Ambiental e Urbana (UFABC) e mestranda em Ciência e Tecnologia Ambiental (UFABC).

Lúcia Helena Gomes Coelho ⁽²⁾

Bacharela em Química pela Universidade de São Paulo (USP), graduada em Licenciatura em Química pela USP, mestra em Química Analítica (USP) e doutora em Química Analítica (USP). Atualmente é professora do Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais Aplicadas (CECS) da UFABC.

Francisco Rafael Martins Soto ⁽³⁾

Médico veterinário pela Universidade Estadual de Londrina (UEL), mestre em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses (USP), doutor em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses (USP). Atualmente é professor do Instituto Federal de São Paulo, campus São Roque.

Endereço ⁽¹⁾: Avenida dos Estados, 5001 – Bangú - Santo André – SP – CEP: 09210-580 – Brasil - Telefone: +55 (11) 3356-7000 – e-mail: alessandra.santana@ufabc.edu.br

RESUMO

O aproveitamento de dejetos de suínos como fertilizante é uma prática sustentável de utilização de resíduos sólidos. Na suinocultura ocorre o uso de antimicrobianos, que favorece a seleção de micro-organismos resistentes no trato intestinal dos animais e possibilita a disseminação de variantes multirresistentes para outros seres vivos. *Enterococcus* estão presentes no intestino de animais e são caracterizados como uma das bactérias que mais causam infecções, sendo preocupação de saúde pública. O objetivo deste estudo foi analisar a presença de micro-organismos do gênero *Enterococcus* em amostras provenientes de dejetos de suínos, que passaram pelo tratamento de biodigestão anaeróbia. Para tanto, as seguintes etapas foram realizadas: testes microbiológicos presuntivos para identificação da bactéria *Enterococcus*; identificação dos *Enterococcus* por meio de análises moleculares; verificação da resistência dos micro-organismos identificados ao antibiótico recomendado para todos os estágios da produção de suínos: amoxicilina; e realização de ensaios microbiológicos com a amoxicilina acrescentando os aditivos alimentares utilizados na suinocultura, a fim de verificar possíveis alterações na resistência dos micro-organismos. As amostras de dejetos foram coletadas em uma granja de suínos no município de Ibiúna (São Paulo) em 2022. Os ensaios experimentais abrangeram a determinação de pH e sólidos (totais, fixos e voláteis); as análises microbiológicas como coloração de Gram, teste da catalase, o isolamento bacteriano primário das amostras em solução salina (incubadas a 37 °C por 24h) e, após, o cultivo em meios de cultura caldo azida (37 °C por 24h), ágar de Infusão de Cérebro e Coração (BHI) (37 °C por 24h), meio ágar seletivo para *Enterococcus* (37 °C por 24h); o antibiograma com discos de amoxicilina (2µg e 10µg) em meios de cultura com e sem os aditivos alimentares. A partir do micro-organismo isolado em caldo BHI com solução tampão Tris-HCl pH 7,8, realizou-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional com primers específicos para o gênero *Enterococcus*; o produto da PCR foi analisado em gel de agarose a 1,5% e visualizado em transiluminador com o corante GelRed®. O controle positivo foi a cepa ATCC 29212. Do total de 8 amostras (4 líquidas + 4 sólidas), o estudo indicou a presença de *Enterococcus* na maior parte (87,5%) e os testes moleculares confirmaram a presença de *Enterococcus*. O antibiograma não apresentou micro-organismos resistentes à amoxicilina, tanto nos meios de cultura onde houve o acréscimo dos aditivos alimentares, assim como naqueles em que não houve.

PALAVRAS-CHAVE: Amoxicilina, biodigestão anaeróbia, dejetos de animais, resistência, suínos.

INTRODUÇÃO

A atividade de suinocultura é marcada pela geração de resíduos de animais. O aproveitamento de dejetos de suínos, tratados por biodigestão anaeróbia, é uma prática sustentável de utilização de resíduos sólidos, e gera produtos como o biofertilizante e o biogás (MIELE *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2020).

A atenção pública quanto ao uso de antimicrobianos, assim como a resistência a esses medicamentos na atividade pecuária, tem aumentado (ZAHEER *et al.*, 2020). Na suinocultura ocorre o uso de antimicrobianos, como a amoxicilina, que favorece a seleção de micro-organismos resistentes no trato intestinal dos animais e possibilita a disseminação de variantes multirresistentes para outros seres vivos, incluindo animais e humanos, considerando-se a cadeia trófica, já que alimentos podem ser fertilizados com os dejetos que foram submetidos ao tratamento de biodigestão (WOOLHOUSE *et al.*, 2015; TAN *et al.*, 2018).

Tendo em vista o conhecimento de que antibióticos são usados para tratar ou prevenir a multiplicação de bactérias, as que serão abordadas neste trabalho são as do gênero *Enterococcus*, que estão presentes no intestino de animais e são caracterizados como uma das bactérias que mais causam infecções, sendo preocupação de saúde pública (KATHIRVEL *et al.*, 2020).

No presente estudo, o foco é em análises de amostras de dejetos de suínos, que passaram pelo processo de biodigestão anaeróbia. A intenção é verificar a presença de *Enterococcus* nas amostras, relacionando com resistência antimicrobiana, já que, dada a importância da potencial transmissão de bactérias resistentes para humanos através de cadeias de consumo de produtos alimentícios, pode haver *Enterococcus* resistentes nos dejetos de suínos que são utilizados como fertilizantes agrícolas.

Portanto, é válida a discussão sobre o conhecimento acerca da resistência a antibióticos na suinocultura, focando nos resíduos provenientes dessa atividade a fim de responder os seguintes questionamentos: há *Enterococcus* nos dejetos utilizados como fertilizantes, mesmo após tratamento por biodigestão anaeróbia; se sim, são resistentes à amoxicilina? Acredita-se que as respostas irão colaborar com pesquisas futuras, já que fornecem dados sobre um resíduo sólido que tem valor econômico e pode ser usado para fins agrícolas: o biofertilizante.

OBJETIVO GERAL

Analisar a presença de micro-organismos do gênero *Enterococcus* em amostras provenientes de dejetos de suínos que passaram pelo tratamento de biodigestão anaeróbia e, ao identificar estes micro-organismos, verificar a resistência e/ou modificações quanto à resistência dos *Enterococcus* ao antimicrobiano de estudo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e confirmar a presença da bactéria *Enterococcus* nos dejetos;
- Verificar a resistência dos micro-organismos identificados à amoxicilina;
- Acrescentar aditivos alimentares (utilizados na alimentação dos suínos) aos ensaios experimentais, a fim de verificar possíveis alterações na resistência dos micro-organismos;
- Detectar genes de resistência, caso haja resultados com micro-organismos resistentes nos ensaios anteriores.

MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia utilizada abrangeu ensaios microbiológicos presuntivos para identificação do gênero da bactéria *Enterococcus*; identificação dos *Enterococcus* por meio de análises moleculares para confirmar os testes presuntivos; verificação da resistência dos micro-organismos identificados ao antibiótico recomendado para todos os estágios da produção de suínos: amoxicilina; e realização de ensaios microbiológicos com a amoxicilina acrescentando os aditivos alimentares utilizados na suinocultura, a fim de verificar possíveis alterações na resistência dos micro-organismos.

As amostras de dejetos foram coletadas em uma granja de suínos no município de Ibiúna - SP (Figura 1), sendo quatro coletas realizadas em 2022. As amostras líquidas foram efluentes coletados da subsuperfície de um tanque de decantação do biodigestor e as amostras sólidas obtidas do efluente decantado depois de ter passado pelo sistema de desaguentamento e ter sido deixado em leito de secagem coberto.

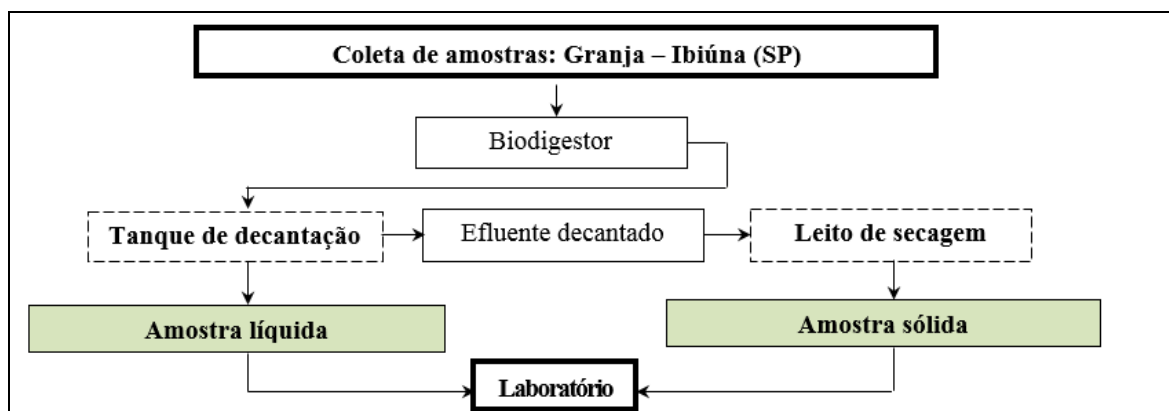


Figura 1: Fluxograma das coletas de amostras. Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Os ensaios experimentais (Figura 2) foram realizados em laboratórios com a determinação das variáveis pH e sólidos (totais, fixos e voláteis); as análises microbiológicas abrangeram coloração de Gram, teste da catalase, o isolamento bacteriano primário das amostras em solução salina (incubadas a 37 °C por 24h) e, após, o cultivo em meios de cultura caldo azida (37 °C por 24h), ágar de Infusão de Cérebro e Coração (BHI) (37 °C por 24h) e meio ágar seletivo para *Enterococcus* (37 °C por 24h); o antibiograma foi feito com discos de amoxicilina, de 2µg e 10µg, em meios de cultura com e sem os aditivos alimentares (Biotop® e Selacid®).

A partir do micro-organismo isolado em caldo BHI com solução tampão Tris-HCl pH 7,8, realizou-se o teste de biologia molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional com primers específicos para o gênero *Enterococcus*; o produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com GelRed® e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. O controle positivo foi a cepa ATCC 29212.

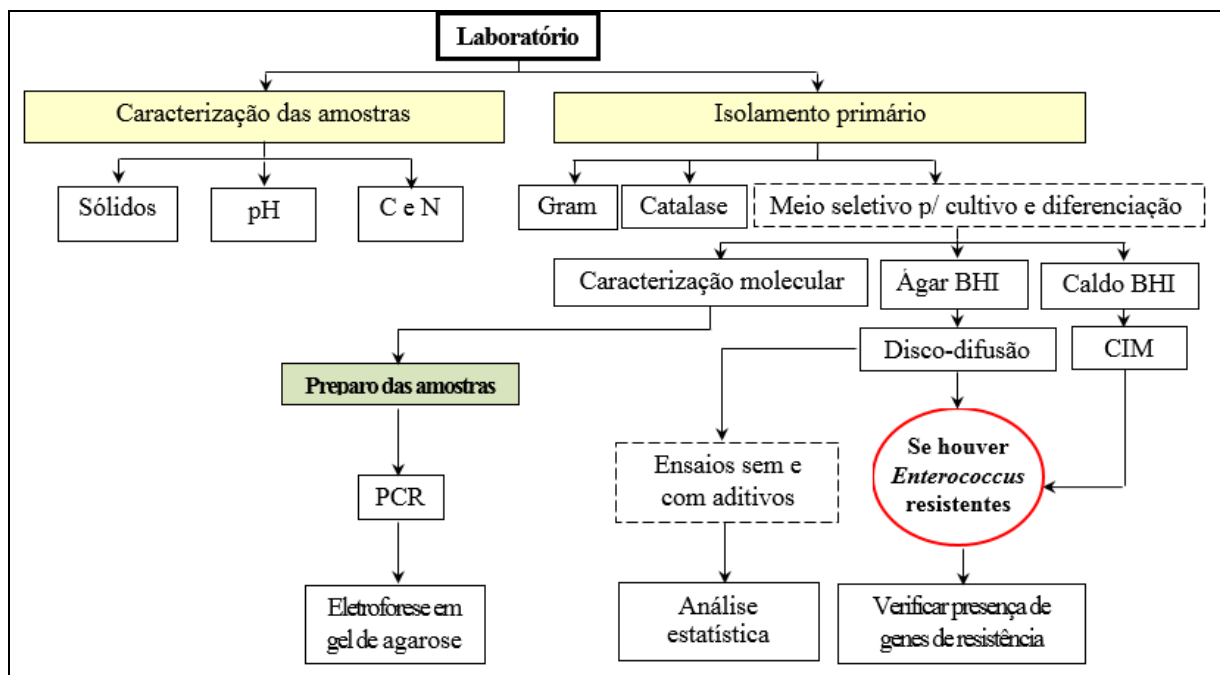


Figura 2: Fluxograma dos ensaios experimentais. Fonte: Elaborado pela autora (2022)

RESULTADOS OBTIDOS

Os principais resultados experimentais obtidos, que são: identificação de *Enterococcus* por análise microbiológica; confirmação do micro-organismos através de ensaio de biologia molecular; e testes microbiológicos de disco-difusão realizados com os aditivos alimentares (Biotop® e Selacid®), com discos de amoxicilina (2 µg e 10 µg), a fim de verificar a resistência do micro-organismo.

Conforme a Figura 3, houve a identificação de *Enterococcus* nas amostras de estudo, com exceção de uma amostra sólida (Figura 3 (b)). Para confirmar a presença do micro-organismos de estudo, realizou-se o ensaio de PCR, que apresentou os mesmos resultados dos testes microbiológicos.

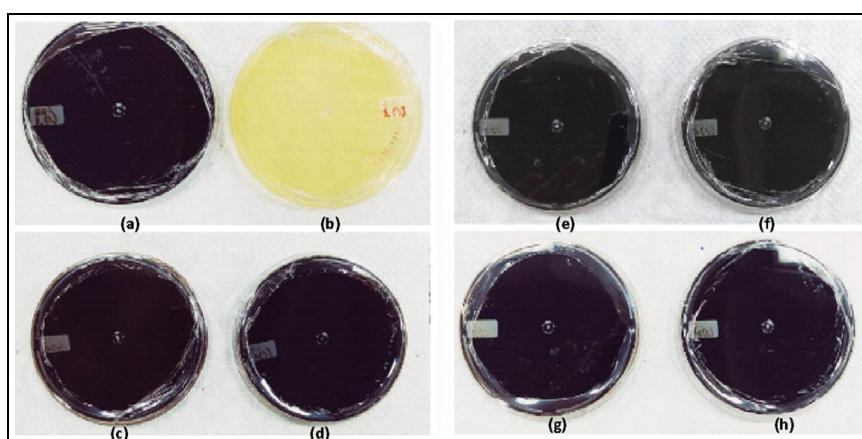


Figura 3: Placas de Petri com meio *Enterococcosel* referentes às coletas de 1 a 4: (a) amostra líquida da 1ª coleta; (b) amostra sólida da 1ª coleta; (c) amostra líquida da 2ª coleta; (d) amostra sólida da 2ª coleta; (e) amostra líquida da 3ª coleta; (f) amostra sólida da 3ª coleta; (g) amostra líquida da 4ª coleta; (h) amostra sólida da 4ª coleta. Fonte: Elaborado pela autora (2022)

A Figura 4 mostra os produtos da PCR analisados em eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v). Para *Enterococcus*, com disco de 2 µg de amoxicilina, há o seguinte ponto de corte, conforme o diâmetro do halo, em milímetros (mm) (BrCAST, 2022):

- Sensível ≥ 10 mm;
- Intermediário = 8-9 mm;
- Resistente < 8 mm

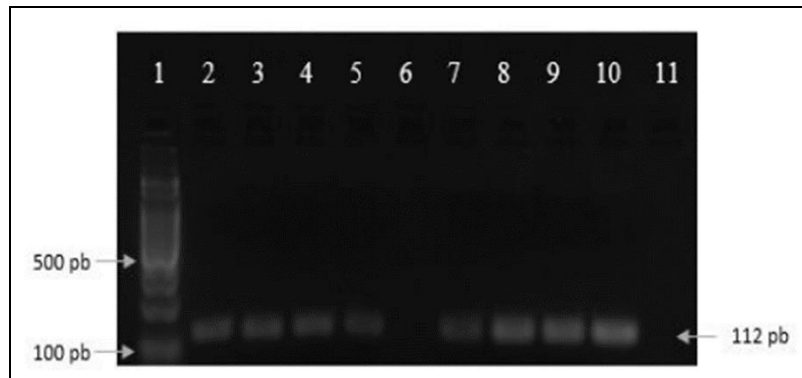


Figura 4: Gel de agarose (1,5%) da reação de PCR: (1) poço com marcador de peso molecular de 100 pb; (2) a (5) amostras líquidas da 1ª a 4ª coleta; (6) a (9) amostras sólidas da 1ª a 4ª coleta; (10) controle positivo; (11) controle negativo. Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Portanto, o ensaio de disco-difusão não apresentou *Enterococcus* resistentes (Tabela 1), conforme verificado pelos valores dos halos de inibição.

Tabela 1: Halos de inibição (mm) das placas (sem e com aditivos) com meio ágar Mueller Hinton e discos de amoxicilina de 2 e 10 µg. Fonte: Elaborado pela autora (2022)

DISCO-DIFUSÃO											
		SEM ADITIVOS		COM ADITIVOS							
				Biotop [®]		Selacid [®]		Biotop [®] + Selacid [®]			
COLETA	TIPO DE AMOSTRA	HALO DE INIBIÇÃO (mm)									
		Disco 2 µg	Disco 10 µg	Disco 2 µg	Disco 10 µg	Disco 2 µg	Disco 10 µg	Disco 2 µg	Disco 10 µg	Disco 2 µg	Disco 10 µg
1	Amostras sólidas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2		17	20	29	35	19	20	21	22		
3		20	22	21	23	29	33	21	22		
4		18	25	33	34	18	20	17	23		
1	Amostras líquidas	17	22	18	24	20	23	17	24		
2		18	21	12	21	18	19	18	23		
3		18	19	19	24	21	25	22	24		
4		18	15	19	23	17	21	16	25		
-	Controle positivo	21	24	21	24	23	25	28	29		

ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados obtidos nos ensaios de disco-difusão foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias das medidas dos halos de inibição comparadas pelo teste de Tukey, ambos a 5% de significância, utilizando-se o software PAST (versão 3.22).

A análise de variância apresentou o valor de p maior que o nível de significância de 0,05, logo, não indicou diferenças entre os tratamentos. O teste de Tukey não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$).

CONCLUSÕES

Estabelecer a metodologia foi um ponto crítico, principalmente na etapa de preparo de amostra, antes da reação de PCR. Foram testados três protocolos de extração de DNA, além de adaptações e modificações na metodologia.

Embora aditivos alimentares sejam usados na criação de animais para consumo, encontrar dados na literatura sobre experimentos e interação dos aditivos com antimicrobianos tem sido uma adversidade, principalmente se a busca tiver o intuito de relacionar essas informações com *Enterococcus* e suínos.

Das oito amostras analisadas (quatro líquidas e quatro sólidas), apenas uma (sólida) apresentou resultado negativo quanto à presença de *Enterococcus*. A eletroforese em gel de agarose confirmou a presença do micro-organismo de estudo, da mesma forma que as análises realizadas em meio de cultura.

Nenhum ensaio do método disco-difusão apresentou *Enterococcus* resistentes à amoxicilina, de acordo com o diâmetro dos halos de inibição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BrCAST (Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Método de Disco-Difusão para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos. Versão 9.0, janeiro de 2021.
2. KATHIRVEL, S.; MANI, M.; GOPALA KRISHNAN G.K.; SETHUMADHAVAN A.; VIJAYALAKSHMI T.; PONNAN S.M; HANNA, L.; MATHAIYAN, M. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* isolates from urinary tract infection and interaction between *Enterococcus faecalis* encountered Dendritic (DC) and Natural Killer (NK) cells. *Microbial Pathogenesis*, Volume 140, DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103944, março de 2020.
3. MIELE, M.; SILVA, M. L. B.; NICOLOSO, R. S.; CORRÊA, J. C.; HIGARASHI, M. M.; KUNZ, A.; SANDI, A. J. Tratamento dos efluentes de usinas de biogás. *Revista de Política Agrícola*, Brasília, n. 1, p. 31-46, jan./mar., 2015.
4. SILVA, JOSÉ ANTONIO; TERRA, ANA BEATRIZ; ASSIS, CLAUDEMIR; FLORENTINO, LIGIANE; PUTTI, FERNANDO. (2020). Tratamento de dejetos no Brasil: comparativo entre as técnicas de compostagem e biodigestores anaeróbios. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*. Páginas 797-817, DOI:10.17765/2176-9168.2020v13n2p797-817, 2020.
5. TAN, Shiang Chiet ; CHONG, Chun Wie; TEH, Cindy Shuan Ju; OOI, Peck Toung; THONG, Kwai Lin. "Ocorrência de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* virulentos e multirresistentes em porcos, agricultores e ambientes agrícolas na Malásia." *PeerJ* 6: e5353. Gale Academic OneFile, DOI 10.7717/peerj.5353, 2018.
6. WOOLHOUSE, M.; WARD, M.; VANBUNNIK, B.; FARRAR, J. Resistência antimicrobiana em humanos, gado e no ambiente mais amplo. *Transações filosóficas da Royal Society B: Ciências Biológicas*. 2015. 370(1670): 20140083 DOI: 10.1098/rstb.2014.0083, 2015.
7. ZAHEER, R; COOK, SR; BARBIERI R; GOJI, N; CAMERON, A; PETKAU, A; POLO, RO; TYMENSEN, L; STAMM, C; SONG, J; HANNON, S; JONES, T; CHURCH, D; BOOKER, CW; AMOAKO, K; VAN, DOMSELAAR G; READ, RR; MCALLISTER, TA. Surveillance of *Enterococcus spp.* reveals distinct species and antimicrobial resistance diversity across a One-Health continuum. *Scientific Reports*, 2020, Mar 3;10(1):3937. DOI: 10.1038/s41598-020-61002-5. Erratum in: *Sci Rep.*, Aug 4;10(1):13401, 2020.