

MICHELE HARUMI OMURA

**CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS E DE SEGURANÇA DE BACTÉRIAS
DO ÁCIDO LÁTICO PREDOMINANTES EM LEITE HUMANO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

O57c
2014

Omura, Michele Harumi, 1988-

Características probióticas e de segurança de bactérias do
ácido láctico predominantes em leite humano / Michele Harumi
Omura. – Viçosa, MG, 2014.

xiv, 149f : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Inclui apêndice.

Orientador: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.73-90.

1. Leite Humano. 2. Ácido láctico - Bactérias. 3. Probiótico.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia
de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 579.35

MICHELE HARUMI OMURA

**CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS E DE SEGURANÇA DE BACTÉRIAS
DO ÁCIDO LÁTICO PREDOMINANTES EM LEITE HUMANO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 06 de Novembro de 2014.

Luciana Rodrigues da Cunha
(Coorientadora)

Raquel Maria Amaral Araújo
(Coorientadora)

Monique Renon Eller

Leandro Licursi de Oliveira

Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira
(Orientadora)

*“O único lugar aonde o sucesso
vem antes do trabalho é no dicionário”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus e Meishu-Sama.

A todos que contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

A minha família: meus pais, Luiz e Matiko, por sempre me apoiarem e acompanharem minhas batalhas, incentivando e marcando presença sempre que precisei. Aos meus irmãos Juliana e Rodrigo, que me apoiaram e acompanharam toda trajetória dos meus estudos. Ao meu cunhado Rodolfo e minha sobrinha Giovana, a minha avó Kuniko, pelo carinho, preocupação e apoio, as minhas tias Akimi e Yoshiko, pelo carinho e incentivo na minha jornada. A minha recém-falecida avó Taeko que sempre me perguntava quando eu ia parar de estudar e voltar pra Marília, e que sempre me oferecia auxílio financeiro com o que podia, além do ilimitado amor, fé, carinho e preocupação, muito obrigada!

À minha orientadora Prof^a Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira, por ter aceito me orientar, pelos ensinamentos, correções, esclarecimentos, incentivo, apoio, carinho e confiança no meu trabalho.

Às minhas co-orientadoras Prof^a Luciana Rodrigues da Cunha e Prof^a Raquel Maria Amaral Araújo, por toda orientação, incentivo e apoio ao longo do trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, em particular ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pelo curso de mestrado.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório: Naomi, Érika, Viviane, Adan, Driene, Tatiane, Mônica e Joice, por toda ajuda teórica e prática.

As cubanas Lilian, Elaine e Tania, que tiveram uma breve passagem pelo Brasil para execução de pós-doc e palestra, mas que me ofereceram grande carinho além de me ensinarem muito.

Aos meus queridos amigos da igreja messiânica Felipe Clemente e Natália Nakamura, que tanto me ensinaram e me acompanharam por todo o mestrado. Aos meus amigos do departamento de alimentos: Douglas Pereira, Vanelle da Silva, Rita Figueiredo e Tatiana Borges, que se fizeram presentes e me ajudaram sempre que precisei. Aos amigos extra-universidade: Danilo Carvalho, João Paulo Silva e Romário Jales, pela preocupação, incentivo e carinho. Ao prof. Eduardo Basílio pelo carinho, correções, incentivo e elogios dentro e fora da sala de aula.

Aos queridos amigos: Monique Eller, Danilo Jorge Silva, Leandro Licursi e Vinícius Duarte, pela participação direta no desenvolvimento do experimento, que me ofereceram muito mais que seu tempo para esclarecer minhas dúvidas, mas também

entraram no laboratório comigo e sempre me incentivaram e elogiaram, mesmo com vários tropeços que cometi.

Ao prof. Sérgio de Paula por me deixar utilizar seu laboratório para execução dos testes genéticos.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos: Célio e Dimas, por me ajudarem com seus serviços. As secretárias da pós-graduação do DTA, Geralda e Pollyana, por me instruírem com muita paciência a parte burocrática do mestrado.

A bioquímica Emília Torres, da divisão de saúde, pelo serviço prestado.

A Macrogen Inc. pela prestação de serviço

Agradeço ao Pedro M. P. Vidigal pelo suporte na análise dos dados. Pedro M. P. Vidigal é Biólogo, Pesquisador no Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) [<http://www.nubiomol.ufv.br/>] da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

BIOGRAFIA

Michele Harumi Omura, filha de Luiz Omura e Matiko Nishikito Omura, nasceu em Marília, São Paulo, em 02/12/1988. Tecnóloga em Alimentos, formou-se em agosto de 2010, na Faculdade de Tecnologia em Alimentos (FATEC MARÍLIA). Ingressou no Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em fevereiro de 2012.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
BHI	Brain Heart Infusion
BLH	Bancos de Leite Humano
BSA	Soro Albumina Bovina
CDC	Center for Disease Control
CO ₂	Gás carbônico
DNA	Ácido Desóxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
D.O.	Densidade Optica
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GRAS	Generally recognized as safe
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IFF	Instituto Fernandez Figueira
IgA	Imunoglobulina A
L	Litro
LAB	Bactérias do ácido láctico
LH	Leite humano
LPSN	List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MRS	de Man, Rogosa and Sharpe Medium
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCCLS	Changes Name to Clinical and Laboratory Standards Institute
ng	Nanograma
NJ	Neighbor Joining
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucleico
RN	Recém-nascido
RPM	Rotação por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
Soro At	Soro ativo
Soro DT	Soro Inativado Termicamente
TGI	Trato gastrointestinal
UFC	Unidade formadora de colônia
UFV	Universidade Federal de Viçosa
µg	Micrograma
µL	Microlitro

RESUMO

OMURA, Michele Harumi. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Novembro de 2014. **Características probióticas e de segurança de bactérias do ácido láctico predominantes em leite humano.** Orientadora: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Coorientadores: Luciana Rodrigues da Cunha e Raquel Maria Amaral Araújo.

O estudo avaliou as características de segurança e potencial probiótico de bactérias do ácido láctico predominantes do leite humano (LH) como forma de avaliar seu potencial para complementação da microbiota endógena do LH eliminada pelo tratamento térmico deste alimento depositado nos bancos de leite humano (BLH). As amostras de leite foram provenientes de 14 nutrízes com 5, 15, 30, 60 e 90 dias de lactação, foram plaqueadas nos meios Rogosa e MRS modificado, sendo que cinco isolados aleatórios de cada placa foram coletados, totalizando 286 isolados. Pela seleção da técnica de coloração de Gram e teste da catalase, 153 isolados foram avaliados quanto a hemólise e gelatinase. Observou-se a prevalência da atividade β -hemolítica em 43/43 (100%) dos isolados obtidos do meio Rogosa e 87/110 (79,09 %) de MRS. Os 23 (20,91 %) isolados γ -hemolíticos também foram seguros no teste da gelatinase e, identificados pelo sequenciamento do gene 16S do rDNA, como nove *Staphylococcus epidermidis*, três *S. lugdunensis* e 11 *Enterococcus faecalis*. Os onze *E. faecalis* prosseguiram com os testes de segurança (resistência a antibiótico e soro humano) e funcionalidade (resistência ao suco gástrico, resistência aos sais biliares e antagonismo a patógenos). No teste de susceptibilidade a antibióticos, *E. faecalis* foram resistentes a amicacina, gentamicina, sulfonamidas e sensíveis a ampicilina, penicilina, amoxicilina, cefalotriaxona e meropenem. Para eritromicina, vancomicina, oxacilina, ceftriaxona, ciprofloxacina e cefalexina, os resultados foram variáveis. Apenas para os glicopeptídeos tal resistência é preocupante pois não correspondem a característica intrínseca do gênero. No teste de resistência ao soro, o grupo patógeno foi mais susceptível aos componentes do soro comparado ao grupo probiótico, estando os *E. faecalis* mais próximos a resposta gerada pelos patógenos, porém de uma forma mais amenizada, sugerindo menor potencial inflamatório que os patógenos. Já com relação aos testes de funcionalidade, verificou-se alta sensibilidade dos isolados após 90 minutos de exposição ao

suco gástrico (pH 2,0) mas foram resistentes após 6 horas de exposição ao oxgall. *E. faecalis* também apresentaram bom desempenho antagônico frente a *S. aureus* (ATCC 13565), *Salmonella* spp. (ATCC 13076), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) e *Escherichia coli* (ATCC 11229). Embora o potencial probiótico tenha sido verificado nestes isolados, mais estudos são necessários para confirmação da segurança destes isolados, bem como seu papel ecológico como componente da microbiota endógena do LH.

ABSTRACT

OMURA, Michele Harumi. MSc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2014. **Probiotic and safety characteristics of lactic acid bacteria predominant in human milk.** Adviser: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Co-advisers: Luciana Rodrigues da Cunha e Raquel Maria Amaral Araújo.

The study evaluated the safety characteristics and potential probiotic lactic acid bacteria predominant in human milk (HM), in order to assess their potential to complement the endogenous HM microbiota eliminated by heat treatment of the deposited food in human milk banks (HMB). Milk samples were obtained from lactating women from 14 with 5, 15, 30, 60 and 90 days of lactation were plated on Rogosa and modified MRS agar, five random isolates were collected from each plate, totaling 286 isolates. By selecting the Gram staining technique and catalase test, 153 isolates were assessed for hemolysis and gelatinase. We observed the prevalence of β -hemolytic activity in 43/43 (100%) of the isolates obtained from the middle Rogosa and 87/110 (79.09%) of MRS. 23 (20.91%) isolates γ -hemolytic were also safe the test of gelatinase and identified by 16S rDNA gene, as nine *Staphylococcus epidermidis*, three *S. lugdunensis* and 11 *Enterococcus faecalis*. The eleven *E. faecalis* continued with the safety tests (resistance to human serum and antibiotics) and functionality (gastric juice resistance, bile salts resistance and antagonism to pathogens). In antibiotic susceptibility test, the *E. faecalis* were resistant to amikacin, gentamicin, sulfonamides, and sensitive to ampicillin, penicillin, amoxicillin, cefalotriaxone, and meropenem. For erythromycin, vancomycin, oxacillin, ceftriaxone, ciprofloxacin and cephalexin, results were variable. Only for glycopeptide resistance is worrying because not correspond to intrinsic characteristic of the genus. In the serum resistance test, the pathogen group was more likely to serum components compared with the probiotic group, with tests isolated closer to the response generated by pathogens, but in a more mitigated form, suggesting lower inflammatory potential pathogens. In relation to the functionality testing, there was high sensitivity of the isolates after 90 minutes exposure to gastric juice (pH 2.0), but were resistant after 6 hours of exposure to Oxgall. *E. faecalis* also showed good performance antagonistic against *S. aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. Although the probiotic potential has been checked these isolates, further studies

are needed to confirm the safety of these isolates and their ecological role as the LH endogenous microbiota component.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo Geral.....	2
2.2. Objetivos Específicos	2
3. REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1. Leite Humano (LH)	3
3.2. Microbiota do LH.....	4
3.3. Bancos de Leite Humano (BLH).	5
3.4. Probióticos	7
3.4.1 Bactérias do Ácido Lático (LAB)	8
3.4.1.1. O gênero <i>Lactobacillus</i>	9
3.4.1.2. O gênero <i>Bifidobacterium</i>	10
3.4.1.3. O Gênero <i>Enterococcus</i>	11
3.4.2. Seleção de micro-organismos probióticos	12
3.4.2.1 Aspectos de segurança.....	13
3.4.2.1.1 Identificação genética.....	13
3.4.2.1.2 Resistência a antibióticos.....	14
3.4.2.1.3 Fatores de patogenicidade: Atividade de gelatinase, atividade hemolítica e sensibilidade ao soro humano.	16
3.4.2.2 Aspectos de funcionalidade	17
3.4.2.2.1 Resistência às barreiras gastrointestinais	18
3.4.2.2.2 Antagonismo a patógenos	19
3.5. LH como fonte de probiótico.....	20
4. METODOLOGIA.....	23
4.1. Caracterização fenotípica dos isolados.....	25
4.1.1. Origem e ativação dos isolados	25
4.1.2. Coloração de Gram e teste da catalase	25
4.2. Determinação dos parâmetros de segurança dos isolados.....	26
4.2.1. Avaliação da capacidade de produção de hemolisina.....	26
4.2.2. Avaliação da atividade de gelatinase.....	26
4.3. Identificação genética dos isolados	26
4.3.1. Extração do DNA genômico.....	27
4.3.2. Amplificação do gene 16S rDNA	27
4.3.3. Sequenciamento do gene 16S rDNA.....	28
4.4 Susceptibilidade aos antibióticos	28
4.5 Resistência ao Soro Humano	29

4.6. Determinação dos parâmetros de funcionalidade dos isolados.....	31
4.6.1. Preparo do inóculo	31
4.6.2. Teste de resistência ao suco gástrico.....	31
4.6.3. Teste de resistência a sais biliares	31
4.6.4. Antagonismo a patógenos	32
4.6.4.1 Origem, manutenção e ativação dos micro-organismos indicadores	32
4.6.4.2 Determinação do antagonismo das LAB isoladas do LH a patógenos por meio da técnica de <i>spot</i>	32
4.7 Análise Estatística.....	33
4.8 Aspectos Éticos:	33
5. RESULTADOS	34
5.1 Características fenotípicas dos isolados	34
5.2 Atividade hemolítica e gelatinase	35
5.3. Identificação genética dos isolados	38
5.3.1 Sequenciamento do gene 16S do rDNA.....	38
5.4 Resistência ao soro humano.....	41
5.4.1. Citometria de Fluxo	41
5.4.2. Plaqueamento	44
5.5 Resistência a antibióticos	47
5.6 Resistência ao suco gástrico	50
5.7 Resistência a sais biliares	51
5.8 Antagonismo a patógenos	52
6. DISCUSSÃO.....	57
6.1. Seleção e identificação das bactérias predominantes do LH.	57
6.2. Resistência ao soro humano.....	61
6.3. Resistência a antibióticos	63
6.4. Resistência as barreiras do trato gastrointestinal.....	66
6.5. Antagonismo a patógenos.....	69
7. CONCLUSÕES.....	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXOS.....	91
Anexo A: Comitê de Ética em Pesquisa	92
Anexo B: Resultados dos plaqueamentos de Costa (2012).	96
Anexo C: Alinhamento das sequências do gene 16S do rDNA.....	97
Anexo D: Gel de Eletroforese do gene 16S do rDNA.....	120
Anexo E: Coloração de Gram dos diferentes isolados obtidos.	121

Anexo F: Classificação da susceptibilidade a antibióticos para <i>Enterococcus</i> spp.	122
Anexo G: Origem, identificação e nomeação dos isolados	123
APÊNDICE	125

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O leite humano (LH) é o primeiro alimento ingerido pelo recém-nascido (RN) e essencial para a saúde do mesmo, devendo ser oferecido exclusivamente até os seis primeiros meses de vida, por ser um alimento completo em termos nutritivo, imunológico e microbiológico. Após o sexto mês de vida, os lactentes já podem receber alimentos complementares, mas recomenda-se o oferecimento do LH até dois anos ou mais (BRASIL, 2013).

Dentre os mais importantes constituintes do LH estão aqueles que exercem efeitos de promoção da saúde, denominados de fatores bifidogênicos (principalmente oligossacarídeos) que estimulam o desenvolvimento de bactérias lácticas (LAB) e bifidobactérias (COLLINS & GIBSON, 1999). Estes constituintes são importantes porque a colonização bacteriana intestinal humana inicia-se ao nascimento, no contato do RN com o canal vaginal, ambiente hospitalar circundante e a ingestão do LH, que juntos contribuirão na formação da microbiota intestinal do RN.

No entanto, existem situações onde algumas mães não podem amamentar seus filhos, como nos RN incapazes de sugar o peito da mãe, ocorrência comum em prematuros, crianças portadoras de patologias respiratórias, cardíacas, gastrointestinais, entre outras (SILVA et al., 2008). Além disso, por questões fisiológicas ou emocionais da nutriz, pode ocorrer problemas na produção do leite devido a doenças graves, tendo-se como exemplo, a AIDS.

Esses fatos, aliados a estudos que demonstraram diferenças na composição do leite obtido de mães de prematuros e de mães de crianças nascidas a termo, levaram ao desenvolvimento dos bancos de leite humano (BLH) para estocagem do LH para alimentação desses RN. Nesses estabelecimentos, o leite recebido é pasteurizado (62,5 – 65°C por 30 minutos), garantindo sua inocuidade microbiológica (ANVISA, 2008). Embora essencial, o tratamento térmico pode afetar as características nutricionais, imunológicas (CONTADOR et al., 2013), a disponibilidade de fatores bifidogênicos (BORBA e FERREIRA, 2012) assim como a microbiota endógena do leite. Portanto, a adição de bactérias endógenas eliminadas pela pasteurização do leite depositado nos BLH, constitui uma alternativa inovadora, para complementar este alimento, tornando-o mais apto a exercer as suas funções.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Identificar e avaliar os aspectos funcionais e de segurança de bactérias do ácido láctico predominantes do leite humano em diferentes fases de lactação, quanto ao seu potencial probiótico, para complementação da microbiota endógena do LH eliminada pelo tratamento térmico deste alimento depositado nos BLH.

2.2. Objetivos Específicos

1. Selecionar LAB predominantes do leite humano em diferentes fases de lactação pela coloração de gram e teste da catalase.
2. Determinar a atividade hemolítica, gelatinase, susceptibilidade a antibióticos e resistência ao soro humano.
3. Identificar os isolados por sequenciamento do gene 16S do rDNA.
4. Determinar a funcionalidade das BAL selecionadas por meio da avaliação de resistência a sais biliares, suco gástrico e antagonismo a patógenos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Leite Humano (LH)

Biologicamente, o LH é um fluido complexo por conter proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais, substâncias imunocompetentes (IgA, enzimas, interferón), além de fatores tróficos ou moduladores de crescimento (EUCLYDES, 2000). Desta forma, o LH torna-se o alimento ideal para o RN, pois, quando oriundo de mães saudáveis, supre todas as necessidades nutricionais do RN a termo ao longo dos seis primeiros meses de vida e, por isso, pode ser oferecido exclusivamente durante este período. Após o sexto mês de vida, recomenda-se oferecer aos lactentes alimentos complementares, mantendo o LH na alimentação até os dois anos de idade ou mais (BRASIL, 2013).

O LH é formado na glândula mamária, sendo que as células epiteliais dos alvéolos mamários sintetizam alguns componentes do leite e retiram outros do plasma sanguíneo. Cada célula alveolar é capaz de produzir leite com todos os seus constituintes (JALDIN & SANTANA, 2006).

Dentre os fatores que podem influenciar na composição e volume da secreção láctea, estão: os genéticos, a nutrição materna (EMMETT & ROGERS, 1997), período de lactação (ANVISA, 2008), idade gestacional do RN, estágio (começo ou final) da mamada, frequência da demanda de leite do bebê, grau de plenitude ou esvaziamento das mamas (RIORDAN, 1999). Além destas, algumas modificações que ocorrem também durante os diferentes períodos de lactação parecem corresponder à evolução das necessidades do RN ao longo do tempo.

Os diferentes períodos de lactação recebem as seguintes denominações: colostro (menos de sete dias após o parto), leite de transição (entre sete e quatorze dias após o parto), leite maduro (acima de quatorze dias após o parto) e leite de mãe de prematuro (parto realizado com idade gestacional inferior à 37 semanas) (ANVISA, 2008). Nessas fases, a concentração de macro e micronutrientes variam no leite em uma mesma nutriz, mesmo ao longo do dia (EMMETT & ROGERS, 1997).

Já com relação às características microbiológicas, durante muito tempo a preocupação e estudos eram fundamentados na qualidade e inocuidade deste alimento, mas, atualmente, as pesquisas estão identificando e verificando

o impacto que a microbiota endógena pode exercer no estado de saúde do hospedeiro.

3.2. Microbiota do LH

O LH não é estéril antes da ordenha, mesmo que práticas de higiene sejam realizadas de forma eficiente. Apesar do LH conter uma baixa concentração de micro-organismos totais de $< 10^3$ UFC/mL (PEREZ et al., 2007), estima-se que a ingestão de 800 mL/dia deste alimento, faz com que o lactente consuma cerca de $1 \times 10^5 - 1 \times 10^7$ de bactérias comensais (MARTÍN et al., 2003). Pelo fato do leite ser rico em nutrientes, este alimento torna-se um meio de cultura para vários tipos de micro-organismos, representando um aspecto importante no desenvolvimento de uma microbiota diversificada que irá iniciar a colonização intestinal do RN (PEREZ et al., 2007).

Alguns estudos que caracterizam a microbiota endógena do LH mostraram que no colostro há predomínio dos gêneros *Staphylococcus*, *Enterococcus* (JIMÉNEZ et al., 2008) e *Streptococcus* (SOLÍS et al, 2010). Além destes, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* (SOLÍS et al, 2010; JIMÉNEZ et al., 2008), *Propionibacterium*, *Escherichia*, *Leuconostoc*, *Actinomyces*, *Fingoldia*, *Gemella*, *Rothia*, *Enterobacter* e *Klebsiella* aparecem com menor frequência (JIMÉNEZ et al., 2008). A medida que o lactação progride, a microbiota é praticamente mantida, sendo que *Clostridium* spp. (COLLADO et al, 2009); *Corynebacterium* spp. (HUNT, et al., 2011; PEREZ, 2007); *Peptostreptococcus* (PEREZ, 2007); *Pseudomonas* spp.; *Serratia* spp.; *Ralstonia* spp.; *Bradyrhizobiaceae*, *Corynebacterium* spp. e *Sphingomonas* spp (HUNT, et al., 2011) podem também estar presentes.

Desta forma, dentre a grande diversidade microbiológica do LH, encontram-se bifidobactérias e lactobacilos, gêneros comumente utilizados como probióticos, que atuam benéficamente no desenvolvimento do intestino infantil (MARTIN et al, 2007), reforçando a importância microbiológica deste alimento par o RN.

No entanto, existem situações onde algumas mães não podem amamentar seus filhos, como é o caso de RN incapazes de sugar o peito da mãe, como ocorre com os prematuros, crianças portadoras de patologias respiratórias, cardíacas, gastrintestinas, entre outras (SILVA et al., 2008);

problemas na produção do leite por questões fisiológicas ou emocional da nutriz, bem como presença de doenças graves, como AIDS. Esses fatos, aliados a estudos que demonstraram diferenças na composição do leite obtido de mães de prematuros e de mães de crianças de termo, levaram ao desenvolvimento de bancos de leite humano (BLH) para estocagem do alimento para alimentação desses RN.

3.3. Bancos de Leite Humano (BLH).

O primeiro BLH foi instalado na Áustria, na cidade de Viena, em 1900. No Brasil, o primeiro banco foi instalado em 1943 no Instituto Fernandes Figueira (IFF), localizado na cidade do Rio de Janeiro e permanece em atividade, sendo considerado o Centro de Referência Nacional para os Bancos de Leite Humano no Brasil (ALMEIDA, 1992). O trabalho da rede de BLH brasileira, representado pelo seu diretor João Aprigio Guerra de Almeida, foi reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a maior e mais complexa do mundo, contemplada com o prêmio Sasakawa de Saúde (2001) como melhor projeto de saúde pública. Atualmente o Brasil conta com 212 unidades de BLH, além de mais de 139 postos de coletas, totalizando 351 locais para captação do LH (FIOCRUZ, 2014).

Os BLH tratam-se de centros especializados, obrigatoriamente vinculados a um hospital materno e/ou infantil, que incentivam o aleitamento materno e a execução das atividades de coleta, processamento e controle de qualidade dos três tipos de leite da lactação, sob prescrição médica ou de nutricionista. Já o Posto de Coleta de Leite Humano (PCLH), trata-se de uma unidade fixa ou móvel, intra ou extra-hospitalar, vinculada tecnicamente ao BLH e administrativamente a um serviço de saúde ou ao próprio BLH, responsável por ações de promoção, proteção e apoio ao aleitamento materno e execução de atividades de coleta da produção láctea da nutriz e sua estocagem (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

O objetivo dos BLH não é substituir o aleitamento materno, e sim incentivar a doação do excedente da produção láctea para atender aos lactentes que não dispõem de aleitamento ao peito, segundo um critério de ordem clínica (ALMEIDA, 1985).

Considerando-se o fato do LH ser um alimento rico em macro e alguns micronutrientes, este torna-se um ótimo meio de cultura microbiano, e, portanto, facilmente contaminável, podendo carrear agentes infecciosos como vírus e bactérias. Além disso, substâncias nocivas podem ser transmitidas via sistêmica, tais como medicamentos e drogas utilizadas pelas nutrízes (ANVISA, 2008). Assim, os BLH tomam uma série de medidas de segurança para garantir a qualidade e inocuidade deste alimento, como seleção rigorosa das doadoras com relação a hábitos de vida e ausência de agentes causadores de doenças como hepatite B e C, HIV, tuberculose e outros.

Todo leite recebido é pasteurizado a 62,5 °C – 65 °C por 30 minutos para garantir a eliminação da microbiota potencialmente patogênica. Após este tratamento térmico, o leite é então congelado e submetido a testes de controle microbiológico para averiguar a efetividade da pasteurização (ARNOLD & LARSON, 1993).

Apesar da pasteurização do LH ser um procedimento obrigatório nos BLH para garantia da segurança deste alimento, foi verificado que tal processo afeta as características nutricionais, imunológicas e de viabilidade da microbiota endógena do leite (ARNOLD & LARSON, 1993; BORBA et al., 2003).

O estudo realizado por BORBA (2001) avaliou o efeito da pasteurização do LH sobre o crescimento *in vitro* das bifidobactérias residentes naturais do TGI dos RN. O tratamento térmico prejudicou o crescimento de espécies de *Bifidobacterium bifidum* (ATCC 29521), *Bifidobacterium breve* (ATCC 15700) e *Bifidobacterium breve* (ATCC 15707), enquanto que no leite cru, o crescimento destas estirpes foi estimulado. Esse resultado revela que a pasteurização afeta diretamente algum componente que estimula, ou produz algum fator que inibe o crescimento das estirpes estudadas.

Como é sabido, as bifidobactérias e lactobacilos são constituintes naturais do trato gastrointestinal (TGI) que favorecem o estabelecimento de uma microbiota intestinal balanceada, além de conferir proteção frente a infecções entéricas. Assim, uma interessante forma de compensar a inativação dos fatores bifidogênicos, bem como a redução da microbiota endógena benéfica do LH pela pasteurização, seria a adição direta destas bactérias no leite pasteurizado depositados nos BLH.

3.4. Probióticos

Os probióticos são definidos como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/OMS, 2001). Uma importante condição para que haja o efeito benéfico destes micro-organismos é que estes devem proceder do TGI da espécie (FERREIRA, 2012). Alguns efeitos benéficos desencadeados pelo consumo regular dos probióticos são mostrados na Figura 1.

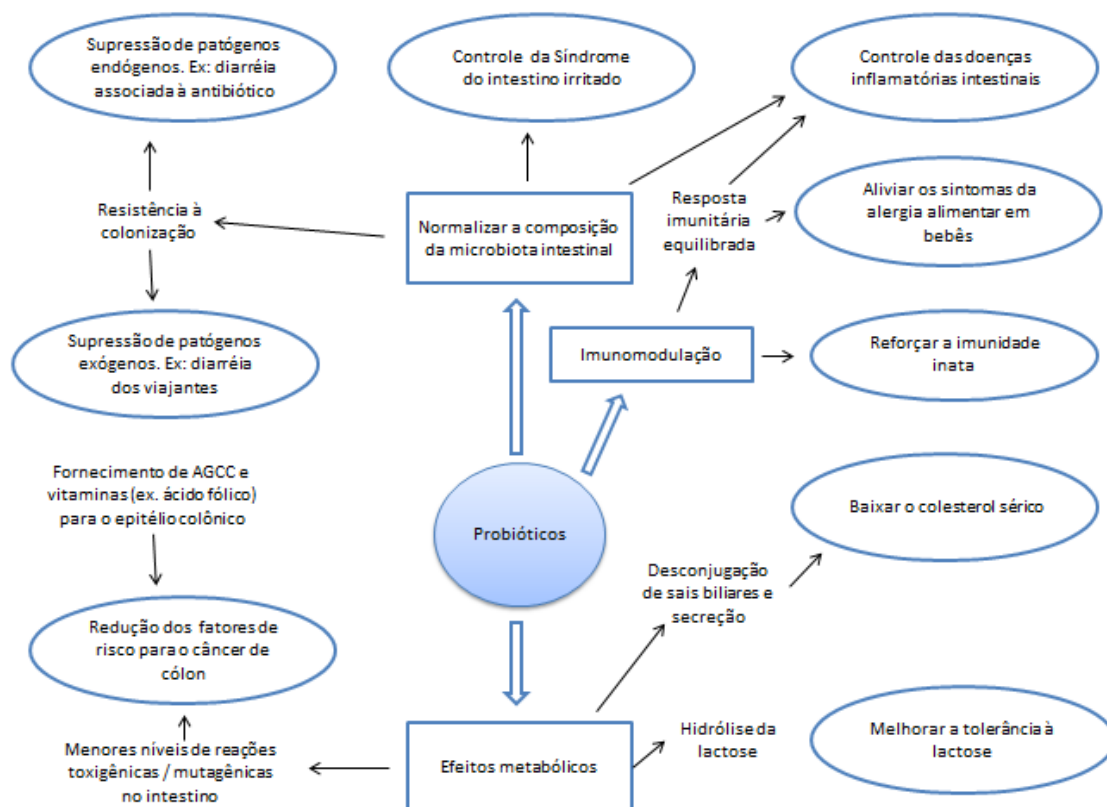


Figura 1. Efeitos benéficos desencadeados pelo consumo regular de probióticos (Adaptado de Parvez et al., 2006).

Os probióticos mais utilizados em alimentos para consumo humano são estirpes de bactérias produtoras de ácido láctico como as dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Estes gêneros bacterianos são comumente utilizados como probióticos devido à longa história de uso seguro. No entanto, nos últimos anos a segurança destes micro-organismos começou a ser questionada em função de relatos de infecções, como bacteremias (DE GROOTE et al., 2005), endocardites (MACKAY et al., 1999), septicemia (CHOMARAT; ESPINOUSE, 1991) e colicistite (CHERY et al., 2013).

Infecções causadas por lactobacilos probióticos são extremamente raras, tendo alguns casos sido relatados em pacientes imunocomprometidos, indicando que cuidados devem ser tomados na administração de probióticos nesses indivíduos (VESTERLUND et al., 2007). Além destes, RN por possuírem sistema imune imaturo, também exige grande cautela na indicação do uso de probióticos.

Devido à ocorrência destes casos, a generalização do uso de terapias imunossupressora, bem como a utilização de novas estirpes probióticas sem longa história de uso seguro, aumentou a exigência da avaliação da segurança de probióticos antes da autorização de seu uso (VESTERLUND et al., 2007).

Dentre as espécies permitidas para uso como probióticos pela ANVISA (2008) estão: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rammnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium*.

3.4.1 Bactérias do Ácido Lático (LAB)

As LAB compreendem gêneros microbianos que apresentam fenótipos semelhantes, como: gram-positivos, catalase negativo (algumas espécies podem produzir pseudocatalase), quimio-organotróficos, asporogênicos e o ácido lático é acumulado no meio como produto do metabolismo primário (HOLT et al., 1994; DELLAGIO et al., 1994). São anaeróbias, anaeróbio-facultativas ou microaerofílicas. As LAB tratam-se de bactérias fastidiosas, presentes em ambientes ricos como vegetais, produtos de laticínios, produtos cárnicos e no TGI humano e animal (FERREIRA, 2012).

Atualmente o grupo de LAB é composto de 15 gêneros: *Aerococcus*, *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (FERREIRA, 2012).

Porém a inclusão do gênero *Bifidobacterium* nesse grupo foi questionada, uma vez que Orla-Jensen (1924) sugeriu um grupo entre LAB e bactérias do ácido propiônico. No entanto, ainda não há um consenso taxonômico para esta classificação e, por grande parte do século XX, as

bifidobactérias eram classificadas como membros do gênero *Lactobacillus*, por causa da sua forma de bastão e características fermentativa obrigatória (LEAHY et al., 2005). Além disso, as bifidobactérias apresentam propriedades bioquímicas, fisiológicas e nicho ecológico (inclusive o TGI), semelhantes às LAB, apesar de apresentarem alto conteúdo de G + C (> 50 %) (OLIVEIRA et al., 2002).

3.4.1.1. O gênero *Lactobacillus*

De acordo com List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN, 2014), o gênero *Lactobacillus* compreende atualmente 202 espécies e 29 subespécies, distribuídos em vários nichos ecológicos, ao longo de todo trato gastrointestinal e geniturinário, constituindo um importante gênero da microbiota de homens e animais (VARAVALHO et al., 2008).

Lactobacillus spp. são caracterizados como gram-positivos, catalase negativos (algumas espécies chegam a produzir pseudo-catalase), forma bacilar ou cocobacilo, ocorrendo isolados, em pares ou formando correntes de vários tamanhos. São anaeróbio-facultativos, não formadores de esporos, com faixa térmica de crescimento entre 2 a 53 °C, podendo ser homofermentativos obrigatórios, heterofermentativos facultativos ou heterofermentativos obrigatórios (Bergey's Manual, 1986).

Com relação às espécies deste gênero que já foram testadas para serem utilizados como probióticos em humanos, estão: i) homofermentativos obrigatórios: *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovarus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii* (FERREIRA, 2012), *L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (DARILMAZ et al., 2011), *L. salivarius* subsp. *salivarius* (MESSAOUDI et al., 2013); ii) heterofermentativos facultativos: *L. casei*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. paracasei* subsp. *tolerans* (CAPRA et al., 2014), *L. plantarum* (ARIEF et al., 2014), *L. rhamnosus* e iii) heterofermentativo obrigatórios: *L. fermentum* e *L. reuteri* (SANDERS & KLAENHAMMER, 2001).

Dentre alguns dos benefícios que os lactobacilos podem exercer na saúde do hospedeiro estão: estimulação do sistema imunológico (KATO et al., 1988), modulação da microbiota intestinal (BENNO et al., 1996), efeitos benéficos nas disfunções do TGI, como encurtamento da diarreia por rotavírus (PANT et al., 2007), entre outros.

Dentre as espécies de *Lactobacillus* spp. encontradas no LH por métodos de cultivo dependente, estão: *L. fermentum*, *L. gasseri* (MARTÍN et al., 2012; ALBEHARAT et al., 2011; MARTÍN et al., 2003), *L. salivarius* (MARTÍN et al., 2012; MARTÍN et al., 2006), *L. reuteri* (MARTÍN et al., 2012; SINKIEWICZ & LJUNGGREN, 2008), *L. crispatus*, *L. rhamnosus* (HEIKKILÄ & SARIS, 2003), *L. casei*, *L. gastricus*, *L. vaginalis* (MARTÍN et al., 2012), *L. plantarum*, (MARTÍN et al., 2012, MARTÍN et al., 2007; ALBEHARAT et al., 2011), *L. brevis*, *L. animalis*, *L. helveticus* e *L. oris* (ALBEHARAT et al., 2011). Desta forma, este alimento pode ser uma fonte promissora de *Lactobacillus* spp. probióticos.

3.4.1.2. O gênero *Bifidobacterium*

Atualmente, são conhecidas 49 espécies e 9 subespécies de bactérias bífidas (LPSN, 2014). As bifidobactérias são originárias dos tratos gastrintestinal e geniturinário humano e animal, e tratam-se de micro-organismos gram-positivos, catalase negativos não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, e no geral, anaeróbios estritos (BIAVATI et al., 1992), havendo algumas poucas estirpes tolerantes ao oxigênio (Ahn et al. 2001). A temperatura ótima de crescimento oscila entre 37 e 41 °C, com tolerância máxima e mínima de crescimento a 43 - 45 °C e 25 - 28 °C respectivamente. Em relação ao pH ótimo, a variação ocorre entre 6 e 7, com ausência de multiplicação em valores de pH ácidos $\leq 4,5 - 5,0$ ou valores alcalinos $\geq 8,0-8,5$ (BIAVATI et al., 1992). Além destas características, as bactérias bífidas apresentam um mecanismo particular no metabolismo da glicose que as diferenciam das demais LAB. Esta via específica refere-se à atividade da enzima frutose-6-fosfato fosfoetolase (DELLAGIO et al., 1994), que produz ácidos acético e láctico na forma L(+) na proporção molar de 3:2 respectivamente, além da produção de 5 moles de ATP a partir de 2 moles de hexose, sem produção de CO₂, exceto durante a degradação do gluconato. Essa enzima quebra a frutose-6-fosfato em acetil-fosfato e eritrose-4-fosfato, e por último estes são convertidos em piruvato, (FOOKS & GIBSON, 2002; BIAVATI et al., 1992). Além da glicose, todas as bifidobactérias de origem humana são capazes de utilizar a galactose e a frutose como fontes de carbono (BIAVATI et al., 1992).

Várias espécies de bifidobactérias têm sido empregadas como probióticas, sendo as mais comuns *B. adolescentis*, *B. animalis* ssp. *lactis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* ssp. *infantis* e *B. longum* ssp. *longum* (FERREIRA, 2012). No LH, as espécies deste gênero já encontradas foram: *B. breve* (MARTÍN et al, 2012; MARTÍN et al., 2009), *B. longum* (MARTÍN et al, 2012; MAKINO et al., 2011) *B. bifidum*, *B. adolescentis* (MARTÍN et al., 2009), *B. animalis* (ZACARIAS et al., 2011; GUEIMONDE et al., 2007) e *B. catenulatum* (GUEIMONDE et al., 2007).

Com relação aos efeitos benéficos à saúde gerada pela ingestão de bactérias deste gênero estão: atividade imunomoduladora (BOGSAN et al, 2014), contribuindo assim para uma maior resistência à infecção (MITSUOKA, 1990); antagonismo a patógenos (OLIVEIRA et al., 2014), suprimindo algumas bactérias putrefadoras, bem como a putrefação intestinal (MITSUOKA, 1990), prevenção da constipação (ARUNACHALAM, 1999), prevenção e tratamento da diarreia associada a antibióticos (ALLEN et al., 2013); entre outros.

3.4.1.3. O Gênero *Enterococcus*.

O gênero *Enterococcus*, referido antigamente como pertencente ao gênero *Streptococcus* do grupo D de Lancefield, foi transferido devido às modernas técnicas de classificação, como o sequenciamento do gene 16S rDNA (SCHLEIFER & KLIPPER-BÄLZ, 1984). Bactérias desse gênero pertencem à família *Enterococaceae*, juntamente com os gêneros *Baviriococcus*, *Catelicoccus*, *Melissococcus*, *Polibacter*, *Tetragenococcus* e *Vagococcus*; ele compreende 53 espécies distintas e duas subespécies (LPSN, 2014), sendo *E. faecalis* e *E. faecium* as principais espécies isoladas a partir de alimentos (CAMARGO et al., 2014). A respeito das características fenotípicas, tem-se que os *Enterococcus* podem apresentar-se como cocos isolados, em pares ou em cadeias curtas; gram positivos, catalase negativo, não formadores de esporos, oxidase negativo, anaeróbio facultativo e possuem temperatura ótima de multiplicação de 35 °C, sendo que a maioria das espécies toleram a faixa de 10 a 45 °C; também podem apresentar multiplicação na presença de altas concentrações de NaCl (até 6,5 %); pH em torno de 9,6 e sobreviver a 60 °C por 30 minutos, sendo portanto, termodúricos (SCHLEIFER & KLIPPER-BÄLZ, 1984). Além disso, integram o grupo das LAB, apresentando

metabolismo homofermentativo, ou seja, apresentam o ácido láctico como principal produto da fermentação da glicose, sem produção de gás. O conteúdo de pirimidinas (G + C) no DNA varia de 37 a 45 % (MURRAY, 1990).

Apesar dos *Enterococcus* spp. pertencerem ao grupo de LAB, sua utilização como probiótico requer bastante estudo, uma vez que mesmo apresentando vários requisitos exigidos para um micro-organismo probiótico (FRANZ et al., 1999), ele também está associado a processos inflamatórios nos seres humanos (DOBSON & BAKER, 1990).

Dentre os aspectos benéficos observados pelos *Enterococcus* spp estão: capacidade de aderência ao epitélio intestinal (REDONDO, 2008); produção de ácidos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (enterocinas) (RODRÍGUEZ et al., 2012), é também não invasivo, não patogênico, não carcinogênico e ainda pertence a microbiota intestinal normal (SALMINEN, et al., 1996). Porém este gênero também está associado a certas patogenicidades como infecções nosocomiais e ainda se envolver com casos de bacteremia, com ou sem casos de endocardites (MOELLERING, et al., 1974), infecções do trato urinário (MALONE et al., 1986) e/ ou sepsia neonatal (DOBSON & BAKER, 1990), além de poderem carrear genes de resistência a antibióticos (SHEPARD & GILMORE, 2002).

Pesquisas indicam que *Enterococcus* de origem alimentar apresentam menores fatores de virulência do que isolados de origem clínica (EATON & GASSON, 2001). Mesmo assim, sua utilização como probiótico é muito controversa na comunidade científica, devendo sua avaliação de segurança ser executada com bastante cuidado.

3.4.2. Seleção de micro-organismos probióticos

Para que um micro-organismo se caracterize como potencialmente probiótico e apresente reconhecimento como GRAS (*generally recognized as safe*) deve-se avaliar seus aspectos taxonômicos, fenotípicos, genéticos, funcionais, tecnológicos e de segurança. Devem atuar de forma eficaz no TGI, necessitando apresentar características como: ser de origem humana; resistir ao suco gástrico, à bile, à lisozima e às condições de processamento e armazenamento, ter capacidade de se aderir ao epitélio, capacidade de

agregação e apresentar concentração adequada no momento do consumo (BRASIL, 2008; FAO/ OMS, 2006).

3.4.2.1 Aspectos de segurança

Os mais importantes aspectos de segurança para uso de bactérias como probióticos incluem: origem da estirpe, identificação adequada a nível de espécie, não apresentar histórico de associação com doenças ou desordens intestinais, não carrear genes plasmidiais de resistência a antibióticos, não promover a degradação de muco intestinal, não translocar ou induzir translocação de micro-organismos patogênicos para sítios extra-intestinais e não possuir fatores de patogenicidade, como a produção de hemolisina e gelatinase, (SAARELA, 2000; FAO/WHO, 2001).

3.4.2.1.1 Identificação genética.

De acordo com a FAO/ WHO (2001), todas bactérias, para serem consideradas probióticas, devem estar adequadamente identificadas a nível de espécie, utilizando métodos aceitos internacionalmente.

A análise comparativa da sequência de determinados genes de macromoléculas conservadas tem sido empregada para a classificação de micro-organismos. A partir da década de 1980, a análise da sequência do RNA ribossomal (rRNA) se tornou amplamente utilizada como ferramenta taxonômica.

O ribossomo procariótico é uma unidade 70S (Svedberg) composta por duas subunidades funcionais: 50S e 30S. A subunidade 50S é composta pelos RNAs 23S e 5S, além de aproximadamente 34 proteínas. Já a subunidade 30S é composta pelo RNA 16S e aproximadamente 21 proteínas (JAY, 2009). O sequenciamento do gene do RNA ribossomal 16S tem sido extensivamente utilizada com finalidade taxonômica e filogenética e é considerado o método de referência para a identificação bacteriana (NOLTE & CALIENDO, 2003). As sequências encontradas são comparadas com aquelas depositadas em bancos de dados, como o National Center for Biotechnology Information (NCBI) e Ribosomal Database Project (RDP), cujo acesso é gratuito.

3.4.2.1.2 Resistência a antibióticos.

Antibióticos são substâncias químicas que possuem atividade bactericida ou bacteriostática sobre micro-organismos, podendo ser produzidas por bactérias, fungos ou sintetizadas total ou parcialmente (SILVA, 2006).

As estratégias dos antibióticos correspondem a distintos mecanismos de ação (Figura 2). Estes antimicrobianos foram introduzidos para o tratamento de doenças microbianas, porém seu uso tem se tornando cada vez mais difícil, pois além de perturbar a eubiose intestinal, o emprego empírico e indiscriminado destas drogas pode levar ao desenvolvimento de resistência bacteriana e, conseqüentemente, desencadear o surgimento de infecções por micro-organismos multirresistentes (GRILLO, 2013). Desta forma, é imprescindível o conhecimento do perfil de sensibilidade das bactérias que estão diretamente associadas a infecções, bem como o mecanismo de disseminação da resistência.

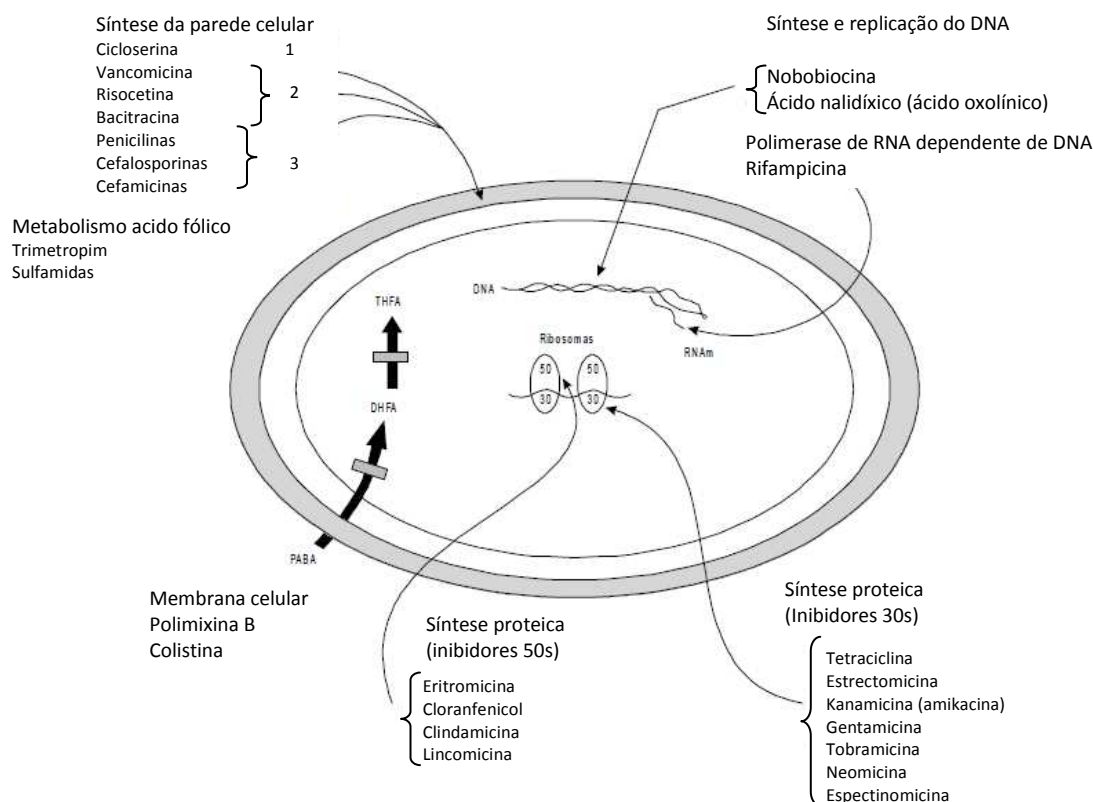


Figura 2. Mecanismo de ação de diferentes antimicrobianos.

Fonte: Jáckson, et al.; 1998 (modificado).

Os mecanismos de resistência a antibióticos são baseadas em quatro estratégias: i) inativação da droga; ii) prevenção da chegada da droga ao seu

alvo; iii) redução da suscetibilidade ao alvo; ou iv) aquisição de novos mecanismos de resistência (BERGER-BÄCHI, 2002).

As bactérias probióticas apresentam variada resistência aos antimicrobianos (KLEIN, 2011), devido às suas características intrínsecas ou por aquisição da resistência.

A resistência intrínseca é baseada nas características naturais do micro-organismo, como fisiologia e peculiaridades estruturais da estirpe (características da parede celular ou perda da função ativa do antibiótico) e não transferíveis a outros micro-organismo (WHIGHT, 2005) e os genes para esta resistência parecem residir no cromossoma (MURRAY, 1990).

Já a resistência adquirida pode ser transferida horizontalmente entre bactérias e resulta da mutação no genoma bacteriano ou aquisição de genes de resistência por meio de processos de conjugação (requer transferência pelo contato célula-célula, diferentemente de outros processos), transdução (transferência genética por intermédio de bacteriófagos) e transformação (absorção de DNA solúvel a partir do meio por células doadoras) (MATHUR & SINGH, 2005). Transposons podem também contribuir para transferência de genes, onde segmentos podem “saltar” ou transferirem entre eles a partir de uma molécula de DNA (plasmídeo, cromossomo) para outra (plasmídeo, cromossomo, fago) dentro de uma única célula (TORTORA et al., 2005).

Logo, pode-se dizer que estirpes bacterianas que carregam genes de resistência adquirida a antibióticos, não devem ser utilizadas em alimentos, a menos que haja comprovação de que tal fenótipo seja resultante de mutação cromossômica (KLARE et al., 2007).

Como exemplos de resistência em LAB, é conhecido que *Lactobacillus* spp. heterofermentativos são intrinsecamente resistentes à vancomicina (AMMOR et al., 2008) devido a presença de D-Ala-D-lactato em seu peptidoglicano ao invés do dipeptídeo D-Ala-D-Ala (KLEIN et al., 2000). A baixa suscetibilidade de *Enterococcus* spp. aos β -lactâmicos é devido principalmente à superprodução de uma proteína de ligação de penicilinas (PBP) de baixa-afinidade à penicilina, ou ainda por mutações nas PBP o que as torna menos suscetíveis a inibição pelas penicilinas (WILLIAMSON, et al., 1985).

A determinação da resistência a antibióticos por métodos *in vitro* pode ser realizada por teste de diluição em ágar (HERRERO et al., 2006), difusão

em discos (CAMARGO, 2014), E-test (AMMOR et al., 2008) e microdiluição (embora o cálculo do MIC seja minucioso). Os diferentes métodos por utilizarem condições experimentais distintas (tempo e temperatura de incubação, quantidade do inóculo, meio de cultura) acabam complicando a comparação direta com os resultados disponíveis na literatura (AMMOR et al., 2007).

3.4.2.1.3 Fatores de patogenicidade: Atividade de gelatinase, atividade hemolítica e sensibilidade ao soro humano.

Os fatores de patogenicidade, também conhecidos como fatores de virulência, referem-se a mecanismos comuns observados entre vários micro-organismos patogênicos. Assim, a presença das atividades de gelatinase e hemolítica não são desejadas nas bactérias que serão utilizadas como probióticas.

A produção da hemolisina ocorre devido ao requerimento de íons de ferro, micronutriente fundamental que atua como cofator enzimático no desenvolvimento de micro-organismos patogênicos (HUSAIN, 2008). A aquisição de íons de ferro por tais micro-organismos pode desencadear anemia e edema no hospedeiro (VESTERLUND et al, 2007). No entanto, sabe-se que as LAB não requerem este íon para se multiplicarem, característica esta que oferece certa vantagem ecológica em seus habitat naturais, onde, em alguns casos, competem com bactérias patogênicas, como ocorre no trato intestinal (ELLI et al., 2000). Porém algumas LAB apresentam atividade hemolítica, sendo consideradas potencialmente virulentas.

A gelatinase é uma enzima proteolítica capaz de hidrolisar a gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros peptídeos bioativos e está associada à inflamações e virulências em humanos e animais (KANEMITSU et al., 2001).

De acordo com uma revisão de literatura realizada pela FIOCRUZ (PINHEIRO, 2008), um dos componentes do LH são as proteínas do complemento. Também é sugerido que há uma via endógena pela qual as bactérias da microbiota intestinal atravessam o epitélio intestinal (SHERMAN, 2010), carregadas dentro de células dentríticas na corrente sanguínea, colonizando os ductos lactíferos das mulheres no final da gestação e início da lactação (DONNET-HUGHES et al., 2010).

Assim, espera-se que as bactérias lácticas legítimas do leite humano sejam resistentes à ação das proteínas do complemento do soro sanguíneo e sejam capazes de crescer bem no soro humano, diferentemente dos patógenos, conforme os achados de Vesterlund et al. (2007).

O sistema complemento presente no sangue atua, como principal função biológica para reconhecer partículas estranhas e macromoléculas e eliminá-las, seja por opsonização (fagocitose) ou lise (no caso das bactérias que apresentam bicamada lipídica em sua membrana).

O efeito bactericida do complemento utilizando testes *in vitro* ocorre apenas por lise celular, em um processo que requer ativação do complemento, que pode ser por três vias: clássica, alternativa e da lectina. Cada uma das três vias é inicializada por diferentes proteínas de reconhecimento, mas todas levam a ativação de uma cascata do componente 3 do complemento (C3), que receberá atuação da C3 convertase, liberando C3a (anafilatoxina) e C3b. O componente C3b tornar-se parte da C5 convertase que cliva C5, liberando C5a (fator quimioestático que atrai neutrófilos) e C5b. Este último agrupa-se com C6, C7 e C8, gerando o complexo C5b678 que se liga a 1-18 moléculas de C9. O conjunto C5b6789(1-18) é denominado complexo de ataque a membrana (MAC), que perturba o gradiente de prótons através da membrana, desencadeando lise e morte celular (CARROLL E SIM, 2011).

Desta forma, a resistência ao soro pode ser um teste complementar de segurança capaz de diferenciar bactérias lácticas de patógenos, e sugerir que bactérias probióticas não irão gerar resposta imune exacerbada com potencial inflamatório para os consumidores.

3.4.2.2 Aspectos de funcionalidade

Dentre os aspectos de funcionalidade as bactérias probióticas devem apresentar: i) capacidade de aderir à mucosa intestinal; ii) resistência aos sais biliares; iii) resistência à lisozima; iv) resistência ao suco gástrico; v) produção de substâncias antimicrobianas; e vi) antagonismo a patógenos (SAARELA, 2000; FAO/ WHO, 2002).

3.4.2.2.1 Resistência às barreiras gastrointestinais

As bactérias probióticas, para atuarem nos intestinos delgado e grosso e exercerem os efeitos desejados, devem resistir às barreiras gastrointestinais, ou seja, devem ser capazes de resistir às enzimas da cavidade oral, como a lisozima (FULLER, 1992), à acidez gástrica e à toxicidade da bile (GIBSON & FULLER, 2000) dentre outras.

Sabe-se que o estômago apresenta um baixo pH, em torno de 2,5 a 3,5 (HOLZAPFEL et al., 1998), e a pepsina apresenta ação antimicrobiana. Assim a combinação desta enzima a baixos valores de pH formam uma barreira eficaz frente à entrada de bactérias no trato intestinal.

O teste *in vitro* para seleção de estirpes resistentes ao suco gástrico, não compreende um padrão quanto à tolerância às condições gástricas, mas uma escala de pH entre 1,0 a 5,0 tem sido sugerida para seleção de bactérias probióticas (CHOU & WEIMER, 1999; CHUNG et al., 1999). Além disso, o tempo de trânsito do alimento pelo estômago dura em média 90 minutos, mas pode atingir até 4 h, dependendo da sua natureza (BERADA et al., 1991). Assim, é comum em testes *in vitro* verificar a capacidade de sobrevivência da bactéria probiótica nessas condições por até 3 horas (NEUMANN & FERREIRA, 1995).

Após a passagem pelo estresse ácido do estômago, tais bactérias se deparam com os sais biliares. Estes sais constituem o maior componente da bile e tratam-se de uma estrutura anelar de colesterol ligada à aminoácidos (glicina ou taurina) por ligações amida. A natureza anfifílica destes sais fazem deles emulsificantes, facilitando a absorção de lipídeos da dieta, ou agindo nos lipídeos da membrana celular das bactérias, destruindo-a (BEGLEY et al, 2005).

Alguns micro-organismos no TGI são capazes de hidrolisar as ligações amida dos sais biliares pela atividade enzimática da hidrolase de sais biliares (BHS), tais como enterococos, bacteroides, bifidobactérias e outros (HILL E DRASAR, 1968), criando sais biliares desconjugados, pela separação da glicina e taurina a partir da porção esteroide (DU TOIT et al., 1998), reduzindo os efeitos tóxicos dos sais biliares conjugados. No entanto, sais biliares desconjugados também podem danificar a membrana celular da bactéria, causando sua morte (KURDI et al, 2006).

A resistência das bactérias lácticas aos sais biliares tem sido verificada testando diferentes concentrações de bile em meio seletivo (GILLILAND et al., 1984). *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* geralmente resistem aos sais biliares (KOLL et al, 2010; CHARTERIS et al, 1998), mas o nível de resistência varia entre espécies (CHATEAU et al 1994; GILLILAND et al, 1984), e tal diferença ocorre devido a produção e circulação da BSH, que reduz os efeitos tóxicos dos sais biliares conjugados.

3.4.2.2.2 Antagonismo a patógenos

O antagonismo das estirpes probióticas frente a patógenos é interessante devido ao seu efeito protetor no hospedeiro contra as doenças que micro-organismos patogênicos podem desencadear (SAARELA et al, 2000). Os mecanismos antagônicos observados em *Lactobacillus* spp. e bifidobactérias ocorrem pela produção de ácidos orgânicos (acético e lático principalmente); competição por nutrientes e por sítios de adesão, estimulação do sistema imune do hospedeiro e produção de substâncias antimicrobianas específicas, como bacteriocinas e peróxido de hidrogênio (SERVIN, 2004).

A natureza lipofílica destes ácidos associado a sua forma não dissociada, podem se difundir na membrana celular, causando alterações no pH interno. No citoplasma celular estes ácidos sofrem dissociação, promovendo um colapso do gradiente de prótons e, conseqüentemente, interrupção do sistema de transporte de substrato para a célula, comprometendo as funções metabólicas do micro-organismo (MROZ, 2000).

As bacteriocinas são pequenas proteínas catiônicas, ou peptídeos, heterogêneas e hidrofóbicas, constituídas de 20 a 60 resíduos de aminoácidos, de elevado ponto isoelétrico, característica anfipáticas e ribossomicamente sintetizados e secretados por bactérias, sendo ativos contra bactérias patogênicas e deteriorativas, variando consideravelmente quanto ao micro-organismo produtor, espectro de ação, peso molecular e suas propriedades bioquímicas (KLAENHAMMER, 1993; CLEVELAND et al, 2001).

O modo de ação das bacteriocinas depende da sua concentração, podendo exercer efeito bactericida ou bacteriostático, atuar na permeabilidade da membrana dos micro-organismos sensíveis pela formação de poros,

desencadeando desbalanço iônico e fluxo de íons fosfato (BRUNO; MONTVILLE, 1993).

Outra importante substância antimicrobiana são os metabólitos de oxigênio, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais livres, que apresentam efeito bactericida ou bacteriostáticos frente a micro-organismos patogênicos e deterioradores. A produção do H_2O_2 ocorre durante o metabolismo das bactérias do ácido láctico na presença de oxigênio, em função da ação de flavoproteínas oxidases ou peroxidases (HOLZAPFEL et al, 1995). O H_2O_2 pode promover a inativação de enzimas pela oxidação de grupos sulfidrílicos; alterar a permeabilidade da membrana por peroxidação de lipídeos e danificar o DNA bacteriano pela formação de radicais livres como O^{2-} e hidroxil ($OH^\cdot$), e tais alterações podem ser reversíveis ou não (PIARD; DESMAZEAUD, 1991).

3.5. LH como fonte de probiótico

À longa data o conceito de probióticos remete a ideia de micro-organismos que promovem efeitos benéficos ao hospedeiro quando oriundo do seu TGI. Porém alguns estudos vêm sendo executados para avaliar se o LH pode ser uma fonte importante destas bactérias como probiótico.

Heikilä & Saris (2003) avaliaram o potencial probiótico de bactérias endógenas do LH testando a atividade antimicrobiana destes isolados frente a *Staphylococcus aureus*, por se tratar de uma bactéria comumente associada a infecções da nutriz e do RN. Dentre as espécies que antagonizaram *S. aureus* foram: *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus salivarium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactococcus lactis* e *Leuconoctoc mesenteroides*.

Vários estudos foram executados com estirpes de *Lactobacillus* spp. do LH e são apresentados resumidamente na Tabela 1 com relação aos efeitos benéficos encontrados.

Tabela 1. Efeitos benéficos de algumas linhagens de probióticos isoladas de leite humano.

Linhagem	Efeito benéfico	Referência
<i>L. salivarius</i> CECT5713	Colonização intestinal	Martín et al., 2006
	Produção de compostos antimicrobianos	Martín et al., 2006
	Não produção de D-Lactic	Martín et al., 2006
	Efeito anti-microbiano	Olivares et al., 2006
	Efeito imunomodulatório	Díaz-Ropero et al., 2006
	Efeito anti-inflamatório	Peran et al., 2005; Dias-Ropero et al., 2006
<i>L. gasseri</i> CECT5714	Colonização intestinal	Martín et al., 2005; Olivares et al., 2006
	Melhoria das funções gastrointestinal	Lara-Villoslada et al., 2007; Olivares et al., 2006
	Produção de compostos antimicrobianos	Martín et al., 2005
	Efeito anti-microbiano	Olivares et al., 2006
	Efeito imunomodulatório	Olivares et al., 2006; Lara-Villoslada et al., 2007;
	Efeito anti-alérgico	Olivares et al., 2005
<i>L. fermentum</i> CECT5716	Colonização intestinal	Martín et al., 2005; Olivares et al., 2006
	Produção de compostos antimicrobianos	Martín et al., 2005
	Efeito anti-microbiano	Olivares et al., 2006
	Efeito imunomodulatório	Díaz-Ropero et al., 2006
	Efeitos aumentados de vacinação	Olivares et al., 2007
	Efeito anti-inflamatório	Peran et al., 2005; Peran et al., 2007

Fonte: LARA-VILLOSLADA et al., 2007 (adaptado).

Zacarias et al (2011) encontraram em algumas amostras do colostro *Bifidobacterium* spp. na proporção de 1,4 a 2,8 log UFC/mL, todas identificadas como *B. animalis* subsp. *lactis*, que foram avaliadas quanto aos aspectos tecnológicos, como estabilidade à temperatura de congelamento a -20 °C e -70 °C por 6 meses e refrigeração a 5 °C por 4 semanas em leite acidificado com ácido láctico (pH 4,5), estabilidade ao processamento *spray-drying* utilizando leite desnatado reconstituído a 20 % (p/v), bem como na sua reidratação à elevada temperatura (50 °C). Como esta espécie foi satisfatória quanto a adequação tecnológica, foi avaliada quanto ao seu efeito imunomodulatório em

camundongos, mostrando resultados positivos quanto ao aumento de células produtoras de IgA nos intestinos delgado e grosso.

Um estudo mais recente realizado por Trento (2012) que selecionou LAB do LH por cultivo em diferentes meios, testou a capacidade destas produzirem bacteriocinas em teste antagônico frente a vários patógenos como *Bacillus cereus* CTC 011, *Listeria inócua* L11, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Micrococcus luteus* ATCC 4698. Os isolados que se mostraram efetivos no antagonismo foram testados quanto à resistência a pH 3,0 e pH 2,0, tolerância a 0,3 % de sais biliares, capacidade de aderência em chapa de aço inoxidável e resistência à clindamicina, eritromicina e gentamicina. Como resultado, seis isolados se mostraram aptos como probióticos, identificados como *Enterococcus durans* e *Enterococcus avium*.

Diante destas evidências, verifica-se que várias espécies bacterianas presentes no LH apresentem potencial como probiótico e, conhecendo os critérios de seleção necessários para ganho desta alegação funcional, o objetivo do presente trabalho foi verificar se as culturas lácticas predominantes do LH em diferentes fases de maturação são aptas quanto aos aspectos funcionais e de segurança para serem utilizadas como probióticos.

4. METODOLOGIA

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Culturas Láticas do Departamento de Tecnologia de Alimentos no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG. O fluxograma das análises executadas está ilustrado nas Figuras 3 e 4.

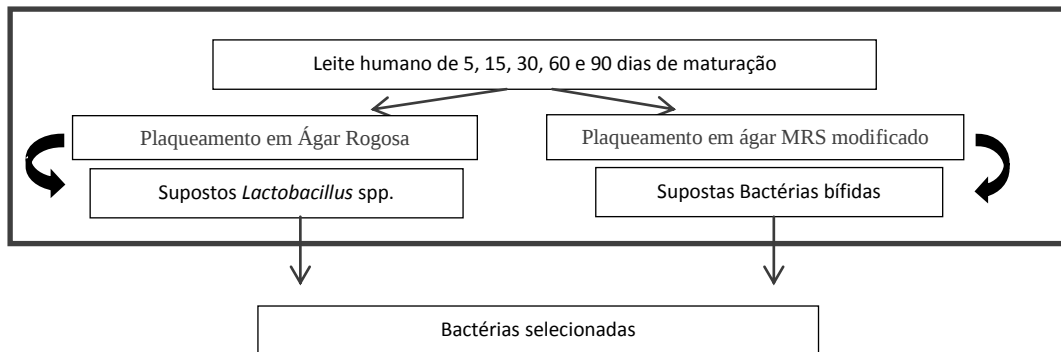


Figura 3. Fluxograma da seleção de estirpes potencialmente probióticas isoladas no trabalho de Costa (2012).

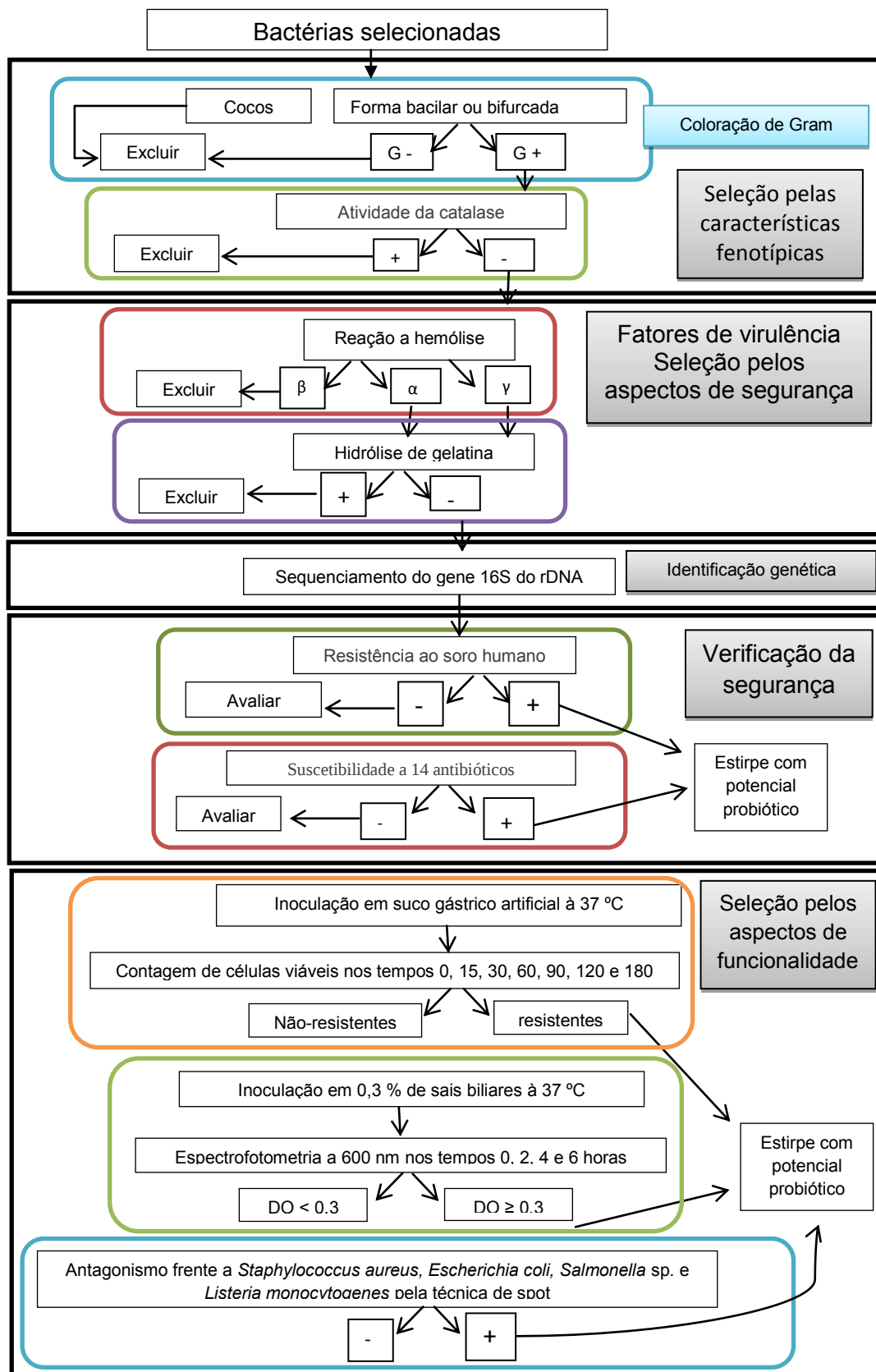


Figura 4. Fluxograma dos testes para seleção de estirpes potencialmente probióticas.

4.1. Caracterização fenotípica dos isolados

4.1.1. Origem e ativação dos isolados

Partindo-se do trabalho desenvolvido por Costa (2012) que isolou vários gêneros microbianos do leite humano de 11 mães, em 5 períodos distintos (5, 15, 30, 60 e 90 dias após o parto), foram selecionados os isolados crescidos em meio Rogosa e MRS (De Mann, Rogosa e Sharpe, 1960 - Acumedia) modificado (carbonato de sódio 0,02 % e cloreto de cálcio dihidratado 0,01 % e 1 % (v/ v) de L-cisteína.HCl 0,05 %) (CUNHA, 2006) e 5 % (v/ v) da solução NPNL (SHAH et al., 1997), incubados à 37 ± 1 °C/ 48 h em jaras contendo geradores de anaerobiose (Anaerobac, PROBAC BRASIL) e cinco isolados de cada placa da maior diluição foram coletadas e mantidos sob congelamento a -80 °C em MRS modificado (MRSm) adicionado de solução de glicerol (20 %) no Banco de Culturas do Laboratório de Culturas Láticas, BIOAGRO. A coleta das amostras foi realizada ao longo do primeiro semestre de 2012.

A solução de cisteína 0,05 % foi esterilizada separadamente utilizando membrana Milipore (0,45 µm) e adicionada assepticamente ao MRS modificado esterilizado. A solução NPNL é composta por: ácido nalidíxico (15 mg/ L); sulfato de neomicina (100 mg/ L); cloreto de lítio (300 mg/ L) e sulfato de paramomicina (200 mg/ L).

O armazenamento das culturas a baixas temperaturas por 1 ano impossibilitou algumas bactérias de se reestabelecerem nas condições normais de cultivo (MRS a 37°C/24 – 48h), então mais três mães foram recrutadas e seu leite coletado apenas em um tempo: Mãe 12 – leite de 11 dias (transição), mãe 13 – leite de 15 dias (transição) e mãe 14 – leite de 21 dias (maduro). Os leites foram plaqueados em MRS, purificados por estria de esgotamento e presseguiram com as análises.

4.1.2. Coloração de Gram e teste da catalase

Os isolados foram ativados em caldo MRS e submetidos à técnica de coloração de Gram e ao teste da catalase, de acordo com a metodologia descrita por Holdeman et al. (1987). Os isolados gram-positivos, com forma cocóide ou bacilar e catalase negativos foram submetidos aos testes de segurança.

4.2. Determinação dos parâmetros de segurança dos isolados

Os testes de segurança foram executados em dois momentos, o primeiro de caráter eliminatório com os teste da atividade hemolítica e da gelatinase; e o segundo após a identificação genética, para verificar a resistência a antibióticos e aos componentes do soro humano.

4.2.1. Avaliação da capacidade de produção de hemolisina

A atividade hemolítica foi executada adaptando-se a metodologia descrita por Baumgartner et al. (1998). Para isso as estirpes foram estriadas em ágar MRS suplementado com 5 % de sangue de carneiro desfibrinado recém-coletado. Os resultados foram avaliados após incubação a 37 °C/ 48 h, em condição de anaerobiose. A atividade hemolítica foi verificada por meio da formação de zonas claras ao redor da colônia (β - hemólise), formação de pigmento verde (α - hemólise) e ausência de reação (γ - hemólise).

4.2.2. Avaliação da atividade de gelatinase

A atividade da enzima gelatinase foi avaliada nas LAB selecionadas, Conforme metodologia sugerida por Su et al. (1991), utilizando-se o ágar MRS suplementado com 3 % de gelatina. O resultado foi avaliado após incubação dos isolados à 37 °C/ 48 h sob anaerobiose. A produção da enzima foi verificada por meio da formação de um halo ao redor da estria após adição de aproximadamente 0,3 mL da solução de Frazier (cloreto mercúrio, 15,0 g; concentrado ácido clorídrico, 20 mL; e água destilada, 100 mL) por placa para confirmação da hidrólise da gelatina.

4.3. Identificação genética dos isolados

Os isolados que apresentaram-se como gram-positivos, catalase negativos, gama hemolíticos e gelatinase negativos, foram identificados pelo sequenciamento do gene 16S rDNA.

4.3.1. Extração do DNA genômico

A extração do DNA foi realizada por meio de uma metodologia desenvolvida pelo Laboratório de Imunovirologia Molecular do Departamento de Biologia Geral da UFV.

Após ativação dos isolados, 1,0 mL de cada uma das culturas foi transferido assepticamente para microtubo e centrifugado a 3 000 x g por 10 minutos (Centrifuge 5804 R). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em tampão SET (200 mM TRIS, 75 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 7,5). Foi adicionado 5 µL de lisozima (1 mg/mL) e os tubos incubados a 37 °C/ 30 min. Consequente, adicionou-se 50 µL de SDS 10% e 10 µL de proteinase K (0,6mg/mL), incubando a 55 °C/ 1 h. Adicionou-se NaCl e clorofórmio, homogeneizando-o manualmente por 30 minutos em temperatura ambiente, seguido da centrifugação a 12 000 x g por 10 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo, acrescentando-se 400 µL de isopropanol. Os microtubos foram centrifugados a 12 000 x g/10 min. e o pellet ressuspensionado em 1 mL de álcool 70 %. Procedeu-se nova centrifugação nas mesmas condições descritas acima, deixando-se o pellet secar à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspensionado em 10 µL de água ultra pura e quantificado (ng/ µL) em espectrofotômetro a 260-280 nm (NanoDrop 2000 spectrophotometer– Thermo Scientific). Após quantificação, as soluções foram estocadas a -20 °C.

4.3.2. Amplificação do gene 16S rDNA

A reação da PCR foi realizada empregando-se primers universais, P027 (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') e R1492 (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCTCAG-3') para amplificação do DNA entre as posições 27 e 1492 da região 16S do rDNA, como descrito por DELVAUX (2012). Tal reação foi padronizada para volume final de 75 µL, contendo, para cada reação, 2,5 µL de tampão 10X, 0,5 µL de desoxirribonucleotídeo trifosfato (10 mM dNTP), 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM), 100 ng de DNA, 0,25 µL da Taq DNA polimerase e 1,25 µL de soro albumina bovina (BSA 10X). As amostras foram amplificadas em termociclador (Applied Biosystems) utilizando a seguinte programação: desnaturação inicial de 94 °C/ 4 min; 35 ciclos de 94 °C/ 30 seg (amplificação), anelamento a 63 °C/ 60 seg, extensão a 72 °C/ 90

seg e extensão final a 72 °C/ 7 min (DELVAUX, 2012). Os produtos da PCR ficaram estocados a – 20 °C até o momento de sua utilização.

Os produtos da reação da PCR foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8 % (m/ v), utilizando-se o marcador de 1 kb DNA Ladder RTU (Read-to-use – 250 a 10.000 pb). O gel foi submetido a uma corrente de 100 V por 60 min e corado com solução de brometo de etídio de 0,5 mg/ mL. Os perfis das bandas foram analisados em transiluminador de luz ultravioleta.

Após confirmação da amplificação e geração de um fragmento de 1500 pb, as amostras da reação de PCR foram purificadas utilizando o kit comercial Wizard® SV and PCR Clean-Up system (Promega, Wisconsin, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

4.3.3. Sequenciamento do gene 16S rDNA

Os produtos da PCR foram enviados para sequenciamento à empresa Macrogen Inc. (Seoul, Korea). Os resultados fornecidos foram otimizados para análise com o programa BioEdit (Califórnia, EUA) para geração de contigs e comparados com as sequências depositadas em bancos de dados como RDP (Ribosomal Database Project) e GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências foram alinhadas utilizando o MAFFT (KATO et al., 2002) e o alinhamento foi inspecionado manualmente, sendo posteriormente cortado utilizando o G-blocks (CASTRESANA, 2000). A matriz de distância aos pares (p-distance) foi calculada e os isolados foram agrupados pelo método Neighbor Joining (AUDISIO et al., 2011; SAITOU & NEI, 1987) utilizando o software MEGA versão 6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski e Kumar, 2013). O suporte estatístico da árvore filogenética NJ foi calculado em 10.000 repetições de bootstrap e valor de corte de 90 %, utilizando-se *Sulfolobus shibatae* strain B12 (NR 044677) como raiz (*outgroup*).

4.4 Susceptibilidade aos antibióticos

Para a verificação do perfil de sensibilidade à diferentes antibióticos, foi utilizado o método da difusão em placa (BAWER et al., 1966) com discos impregnados com os seguintes antibióticos: amicacina (10 µg), ampicilina (30

µg), cefalexina (30 µg), vancomicina (30 µg), meropenem (10 µg), gentamicina (10 µg), oxacilina (1 µg), cefalotina (30 µg), eritromicina (15 µg), sulfonamidas (300 µg), penicilina (10 µg), ceftriaxona (30 µg), ciprofloxacina (5 µg) e amoxicilina (10 µg); obtidos do laboratório SENSIFAR® (Cefar Diagnóstica, São Paulo, Brasil).

LAB do LH e um de *S. aureus* (FIOCRUZ) foram previamente ativados e distribuídos (100 µL) pela técnica *spread plate* em placas de Petri contendo ágar MRS ou BHI, respectivamente, em concentração próxima a 10⁸ UFC/mL (LEHTO; SALMINEN, 1997). O ágar MRS foi utilizado, substituindo o ágar Mueller-Hinton devido ao fato das LAB serem muito fastidiosas. Os discos contendo os antibióticos foram adicionados às placas em pontos equidistantes, sob leve pressão, com o auxílio de uma pinça estéril. Após 1 hora sob temperatura ambiente, as placas foram incubadas a 37 °C, por 16 a 18 h e 24 h no caso da vancomicina (NCCLS 2003). A técnica foi realizada em duas repetições e *S aureus* ATCC 25923 utilizado como controle. A sensibilidade do micro-organismo foi avaliada por meio da medição dos halos de inibição ao redor dos discos de antibióticos, medidos com régua e expressos em mm (incluindo o diâmetro do disco). De acordo com o tamanho do halo obtido, os isolados foram classificados em resistente, intermediário e sensível (NCCLS M100-S15, 2005).

A escolha dos antibióticos utilizados foi baseada na frequência de uso relatada por profissionais de saúde ativos nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) neonatais da cidade de Viçosa-MG.

4.5 Resistência ao Soro Humano

Para verificar a sensibilidade ao soro humano das LAB do LH, utilizou-se a metodologia descrita por Vesterlund et al (2007) com algumas modificações. Amostras de sangue de três doadores (adultos saudáveis) foram centrifugadas e agrupadas e armazenados a -20 °C até o momento do uso. Metade do soro obtido foi tratado termicamente (soro DT) a 56 °C/ 20 min para inativar o sistema complemento e o restante do soro não passou por tratamento térmico (soro At), para avaliar o perfil de morte ou inibição da proliferação das culturas testadas na presença do sistema complemento ativo.

As bactérias analisadas foram ativadas e cultivadas em caldo MRS a 37 °C/ 18 h. Aliquotas de 100 µL da bactéria foi inoculada em tubos contendo 3 mL de MRS e incubadas a 37 °C por aproximadamente 3 h, para apresentarem D.O. inicial de $0,4 \pm 0,1$ em espectrofotômetro a 600 nm, para padronização do número de bactérias ($10^7 - 10^8$ UFC/mL). Consequente, os isolados foram lavados (2x) com tampão fosfato salino (PBS; pH 7.2, 10 mM fosfato) e inoculadas em soro At ou soro DT, sendo a concentração final do soro de 80 %, ou seja, 50 µL do isolado foram inseridos em 200 µL do soro e incubados a 37 °C/ 90 min. A reação foi interrompida pela incubação em gelo por 10 min.

A resposta dos isolados ao soro foi analisada de duas maneira, a primeira por citometria de fluxo, para verificar a tendência comportamental dos isolados em relação a porcentagem de morte; e a segunda, por plaqueamento em profundidade, para avaliar se as bactérias sobreviveram após exposição aos soro, pela contagem em UFC/mL.

Para comparações comportamentais, foram analisados dois isolados de *Lactobacillus gasseri* (AJ02 e AJ36, pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Culturas Lácticas da UFV), duas amostras de *Cronobacter sakazakii* DCD 7006 e CDC 7008, oriundas da Center For Disease Control, e doadas pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, São Paulo – SP), representando patógeno G- e uma amostra de *S. aureus* ATCC 25923, doada pela FIOCRUZ, um patógeno G+. Os *L. gasseri* foram isolados de fezes de recém-nascidos e possuem indicação de uso como probiótico.

No ensaio de citometria, após interrupção do tratamento pelo banho de gelo, os isolados foram lavados duas vezes em PBS e acrescido de uma solução de iodeto de propídio (1 mg/mL) 5 minutos antes da leitura no citômetro (FACSVerse). Já no ensaio por plaqueamento, após o banho de gelo realizou-se diluições seriadas em PBS e alíquotas foram plaqueadas em ágar MRS com incubação a 37 °C/ 48 h.

Este teste foi conduzido em três condições de tratamentos (soro At, DT e MRS para LAB/ BHI para patógenos) com LAB de LH, dois *Lactobacillus gasseri*, dois *Cronobacter sakazakii* e um *Staphylococcus aureus* com três leituras/ plaqueamentos cada.

4.6. Determinação dos parâmetros de funcionalidade dos isolados

4.6.1. Preparo do inóculo

Para a execução dos testes de resistência ao suco gástrico e a sais biliares, cada isolado foi ativado três vezes consecutiva em caldo MRS, sendo a última ativação realizada em um volume de 20 mL. Após crescimento, cada cultura foi transferida para tubos de centrifuga de polipropileno (50 mL), com tampas rosqueáveis, previamente esterilizados. A centrifugação foi realizada à 2.750 x g por 15 minutos, a 4 °C (Beckman GS – 6R); o sobrenadante descartado e o concentrado celular ressuspendido em 2 mL de caldo MRS. O inóculo foi ajustado adicionando-se gotas do concentrado celular em tubos contendo 5 mL de caldo MRS estéril, até obtenção de uma densidade ótica de 0,9 +/- 0,2 em espectrofotômetro a 600 nm. Esse inóculo foi utilizado nos testes de resistência ao suco gástrico e sais biliares (TESHIMA, 2001).

4.6.2. Teste de resistência ao suco gástrico

O concentrado de células padronizado (DO ~ 0,9) de cada cultura foi inoculado (5 %) em 10 mL de suco gástrico artificial (cloreto de sódio: 2,0 g; pepsina: 3,2 g; ácido clorídrico concentrado: 7 mL; água destilada: 1000 mL; e pH final de 2), de acordo com a descrição da farmacopeia americana publicada pela American Society of Microbiology, ASM (1981).

As amostras foram incubadas a 37 °C, sendo realizado plaqueamentos (profundidade) em ágar MRS após 0, 15, 30, 60 e 90 minutos de exposição ao suco gástrico o início da incubação por duas vezes, totalizando 110 plaqueamentos. A solução de suco gástrico foi esterilizada a frio (membranas de Milipore de 0,45 µm) e a contagem de células viáveis das placas foi realizada após incubação a 37 °C/ 48h.

4.6.3. Teste de resistência a sais biliares

A partir do concentrado de células padronizado (DO ~ 0,9), 5 % deste foi inoculado em tubos contendo 5 mL de caldo MRS, adicionado ou não (controle) de 0,3 % de Oxgall. Os tubos foram mantidos a 37 °C e o crescimento avaliado em espectrofotômetro a 600 nm, em intervalos de 2 h, durante 6 h de incubação (GILLIAND et al., 1984). O teste foi realizado com duas repetições.

Segundo Gilliland *et al.* (1984), uma bactéria é considerada resistente a sais biliares quando apresentar DO $\geq 0,3$ (600 nm) após 6 h de incubação na presença de 0,3 % de sais biliares.

4.6.4. Antagonismo a patógenos

A atividade antagônica dos isolados frente a micro-organismos patogênicos foi avaliada pela técnica *spot* (FLEMING, 1975).

4.6.4.1 Origem, manutenção e ativação dos micro-organismos indicadores

Os micro-organismos patogênicos e indicadores utilizados foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Salmonella* sp. (ATCC 13076) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), obtidos da FIOCRUZ. Os isolados foram mantidos sob congelamento a -80 °C, em caldo BHI (*Brain Heart Infusion Difco*®, USA), adicionados de solução de glicerol 20 % (v/v).

Antes das análises, as culturas foram descongeladas à temperatura ambiente e ativadas (1 %) por três vezes consecutivas em meio BHI. As culturas foram incubadas a 37 °C/ 18 a 24 horas.

4.6.4.2 Determinação do antagonismo das LAB isoladas do LH a patógenos por meio da técnica de *spot*

As LAB previamente ativadas em caldo MRS foram *spotted* (3,5 µL) na superfície de placas contendo 20 mL de ágar MRS (1,5 %). Consequente, as placas foram incubadas a 37 °C/ 24 h. Após formação de colônias visíveis, 10 mL de ágar semissólido BHI (0,7 %), contendo cerca de 10⁶ UFC/mL do micro-organismo indicador, foram vertidos sobre a placa. Após refrigeração por 12 horas, as placas foram incubadas a 37 °C/ 24 h (FLEMING, 1975). A atividade antagonista foi verificada pela formação de zonas claras ao redor das colônias, medidas manualmente com auxílio de uma régua.

Para verificar se a natureza do agente inibidor tratava-se de ácidos orgânicos, as culturas que apresentaram halo de inibição frente aos patógenos analisados, foram testadas com diferentes concentrações de hidróxido de sódio (0,01; 0,1; 1; 2 e 10 mol/L) onde uma pequena alíquota desta substância foi colocadas ao redor das colônias das LAB (CUNHA *et al.*, 2012). As placas

foram deixadas a temperatura ambiente durante 1 h. Consequente, uma sobrecamada com 10 mL de ágar BHI semi-sólido (0,75 %) contendo 10^6 UFC/mL da bactéria indicadora foram vertidas na placas, seguido da incubação *overnight* a 37 °C.

4.7 Análise Estatística

O teste de resistência ao soro humano teve a normalidade da distribuição das leituras avaliada segundo o teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para comparação de médias entre os diferentes tratamentos (MRS, Soro AT e Soro DT). A análise gráfica por boxplot foi utilizada para analisar por categoria, patógenos (*Cronobacter sakazakii* CDC 7006 e 7008 e *S. aureus*), probiótico (AJ02 e AJ36) e teste (11 LAB)

No teste de antagonismo a patógenos, a normalidade da distribuição foi avaliada pelo método de Shapiro-Wilk. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar o desempenho antagonístico geral dos isolados e Mann-Whitney para atividade antimicrobiana individual dos isolados. Estes resultados foram ilustrados e analisados por boxplot.

Foi empregado o software SPSS Statistics for Windows 17.0.

4.8 Aspectos Éticos:

Todos procedimentos foram realizados de forma a não comprometer a identidade e integridade dos indivíduos envolvidos, com a devida autorização do Conselho de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Viçosa – CEP/UFV aprovado com o parecer número 663.168 de 03/06/2014 (Anexo A).

5. RESULTADOS

5.1 Características fenotípicas dos isolados

O plaqueamento do LH das onze nutrizes, realizado por Costa (2012) nos meios Rogosa e MRS, revelou maior seletividade do meio Rogosa, pois o leite de algumas mães não apresentaram bactérias cultiváveis neste meio. De uma forma geral, foram obtidas altas contagens em ambos meios, onde no meio MRS foi observado contagens até $9,56 \times 10^5$ UFC/mL e no Rogosa até $1,81 \times 10^4$ UFC/mL (Anexo B).

Para cada conjunto mãe/ período de lactação, cinco colônias foram coletadas aleatoriamente, cultivadas em caldo MRS e armazenadas em meio contendo glicerol 20 %. Desta forma, Costa (2012) obteve 245 isolados bacterianos utilizando o meio MRS e 75 isolados em Rogosa. Porém após 1 ano de armazenamento a -80°C , mesmo adicionado de substância crioprotetora (glicerol), foi possível ativar 140 isolados do MRS e 43 do Rogosa, totalizando 183 amostras. Para as outras três mães recrutadas, 20 isolados de cada amostra foram coletados, totalizando 60 isolados, todos obtidos de MRS.

Pela análise morfológica utilizando-se a técnica de coloração de Gram, para as amostras isoladas em MRS foram encontradas leveduras em 30 amostras (Figura 5), cocos gram negativos (G -) em 10 amostras, cocos gram positivos (G +) em 47 amostras e bacilos ou cocos-bacilos G + em 53 amostras. Dos 60 isolados das três mães recrutadas posteriormente, todos apresentaram-se como cocos G+, mas a presença de levedura foi observada em 15/20 da mãe 12, 15/20 da mãe 13 e 17/20 da mãe 14. Já para os isolados obtidos em Rogosa, observou-se a presença de cocos G+ em 23 amostras e bacilos ou coco-bacilos G + em 20 amostras. As amostras com presença de leveduras e G -, foram descartadas.



Figura 5. Fotos da aparência de tubos com levedura, bem como a característica da colônia na placa.

Nenhuma bactérias isolada em Rogosa apresentou atividade da catalase, ao passo que três isolados gram + do meio MRS apresentaram atividade para este teste e foram descartadas. Logo, os isolados com as características fenotípicas desejáveis para obtenção de LAB com potencial probiótico foram: 53 cocos G+, 44 isolados bacilar ou coco-bacilo G+, totalizando 97 amostras obtidas do MRS, e 23 cocos G+ e 20 bacilos ou coco-bacilos G+, totalizando 43 amostras obtidas de Rogosa.

Dentre os 13 isolados das mães 12, 13 e 14, nenhuma apresentou atividade da catalase.

5.2 Atividade hemolítica e gelatinase

Por meio do teste da atividade hemolítica, todos os isolados obtidos do meio Rogosa apresentaram-se como β -hemolíticos. Os isolados obtidos de MRS revelaram que 2 cocos G+ e 8 bacilos ou coco-bacilos G+ apresentaram-se como γ -hemolíticos e as demais como β -hemolíticas (Figura 6). Todas amostras com atividade β -hemolítica foram descartadas. Os 13 cocos G+ das mães 12, 13 e 14 apresentaram-se como γ -hemolíticos e, portanto, consideradas como seguras.

As 23 amostras restantes, foram submetidas ao teste da atividade da gelatinase (Figura 6). Porém nenhuma delas apresentou tal atividade, o que é desejável, uma vez que a presença desta atividade representa uma característica de virulência.

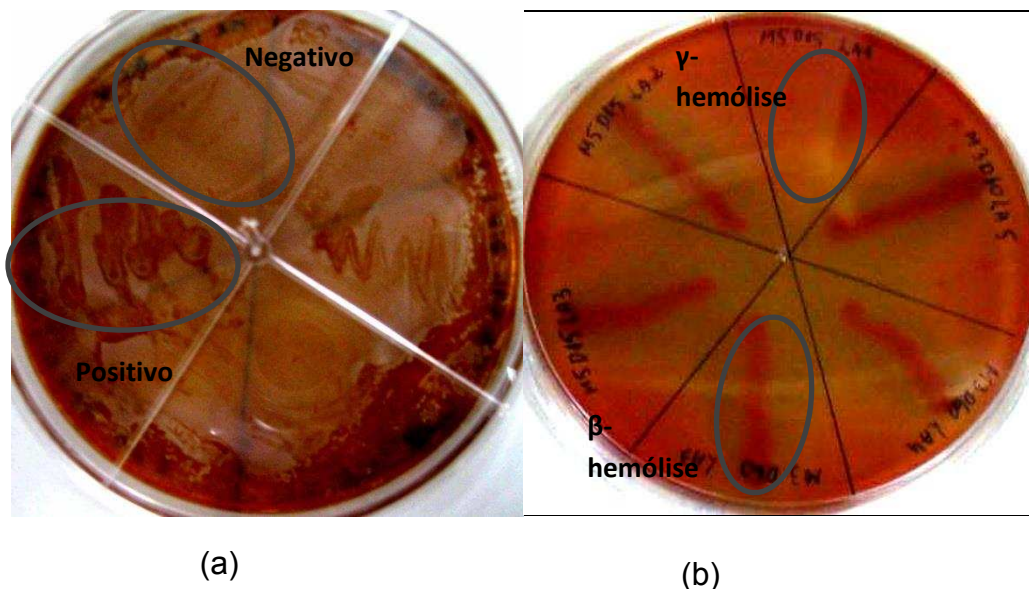


Figura 6. Avaliação dos fatores de patogenicidade dos *Enterococcus faecalis* (a) teste de gelatinase. Resultado positivo com *S. aureus* ATCC 13565 e resultado negativo com isolado do leite humano. (b) teste da hemolisina, onde β-hemólise representa a atividade da hemólise e γ-hemólise ausência da hemólise.

A Figura 7 ilustra como foram as características fenotípicas apresentadas pelos isolados do LH cultivados no meio Rogosa e a Figura 8 o fluxograma da seleção das 10 amostras aptas obtidas por Costa (2012).



Figura 7. Etapas de seleção dos isolados candidatos a probióticos (isolados em meio Rogosa) por meio de testes fenotípicos e de segurança. Entre parênteses está o número final de isolados aptos de acordo com o teste avaliado.



Figura 8. Etapas de seleção dos isolados candidatos a probióticos por meio de testes fenotípicos e de segurança, isolados em meio MRS modificado. Entre parênteses está o número final de isolados aptos de acordo com o teste avaliado.

O teste da atividade hemolítica gerou o maior “afunilamento” para seleção de candidatos probióticos. Todos isolados do meio Rogosa foram reprovados neste teste, e aqueles obtidos do meio MRS, apenas 8/97 isolados de formato bacilar (8,25 %) e 2/97 cocos (2,06 %), apresentaram-se como γ-hemolíticos.

Os isolados das 14 mães foram agrupados, onde aqueles oriundos das mães 12 (D = 15 dias) e 14 (D = 11 dias) foram incluídos ao tempo de 15 dias (leite de transição) e da mãe 13 (D = 21 dias) no tempo de 30 dias (maduro). Verifica-se, portanto, que com relação ao período de lactação, foi observado que todos isolados (N = 15) do colostro (100 %) apresentaram-se como β-

hemolítico, bem como 19/31 (61,29 %) no leite de transição e 53/64 (82,81 %) no leite maduro, sendo 14/22 (63,64 %) para 30 dias, 18/19 (94,74 %) para 60 dias e 21/23 (91,30 %) para 90 dias, ou seja, maiores incidência desta reação em isolados com os menores (5 dias) e maiores tempos (60 e 90 dias).

5.3. Identificação genética dos isolados

A metodologia empregada para extração do DNA resultou em concentrações que variaram de 33,2 a 503,3 ng/μL. Como a concentração de DNA necessária para PCR é de 100 ng/μL, o volume de DNA utilizado foi ajustado para esta concentração para padronização da reação. A partir dos produtos de PCR, o perfil eletroforético das amostras confirmaram a amplificação do gene 16S rDNA na banca de 1500 pb (Anexo D).

Uma vez confirmada a amplificação, os produtos de PCR foram purificados e quantificados, resultando em concentrações que variaram de 40,2 a 114,3 ng/μL entre as amostras.

5.3.1 Sequenciamento do gene 16S do rDNA

Todas as sequências de gene 16S rDNA alinharam-se com, pelo menos, 90 % de identidade com outras sequências presentes no banco de dados utilizado (Anexo C). Por meio dos alinhamentos, pôde-se identificar isolados pertencentes a dois gêneros: *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. (Tabela 3).

Tabela 3. Identidade dos micro-organismos isolados do leite humano em MRS, como resultado do sequenciamento do gene 16S do rDNA.

Código e espécie do alinhamento	Query cover	E value	Ident
EnM31 - <i>Enterococcus faecalis</i> strain ATCC19433	97%	0.0	98%
Sta1 - <i>Staphylococcus epidermidis</i> strain Fussel	97%	0.0	99%
Sta2 - <i>Staphylococcus epidermidis</i> strain Fussel	98%	0.0	96%
Sta3 - <i>Staphylococcus lugdunensis</i> strain ATCC43809	97%	0.0	99%
Sta4 - <i>Staphylococcus lugdunensis</i> strain ATCC43809	98%	0.0	99%
Sta5 - <i>Staphylococcus epidermidis</i> strain NBRC 100911	97%	0.0	99%
EnT1 - <i>Enterococcus faecalis</i> V583 strain V583	99%	0.0	88%
EnT3 - <i>Enterococcus faecalis</i> strain ATCC19433	98%	0.0	99%
Sta6 - <i>Staphylococcus epidermidis</i> strain Fussel	98%	0.0	97%
EnT2 - <i>Enterococcus faecalis</i> strain ATCC19433	98%	0.0	95%
Sta7 - <i>Staphylococcus epidermidis</i> strain NBRC 100911	72%	0.0	90%
Sta8 - <i>Staphylococcus epidermidis</i> strain Fussel	98%	0.0	99%
EnM32 - <i>Enterococcus faecalis</i> strain ATCC19433	97%	0.0	99%
Sta9 - <i>Staphylococcus epidermidis</i> strain NBRC 100911	97%	0.0	99%
EnM33 - <i>Enterococcus faecalis</i> V583 strain V583	97%	0.0	93%
EnT4 - <i>Enterococcus faecalis</i> V583 strain V583	97%	0.0	94%
Sta10 - <i>Staphylococcus epidermidis</i> strain Fussel	97%	0.0	97%
Sta11 - <i>Staphylococcus lugdunensis</i> strain ATCC43809	97%	0.0	99%
EnM91 - <i>Enterococcus faecalis</i> strain ATCC19433	96%	0.0	99%
EnM92 - <i>Enterococcus faecalis</i> strain ATCC19433	99%	0.0	95%
Sta12 - <i>Staphylococcus epidermidis</i> strain NBRC 100911	96%	0.0	96%
EnM61 - <i>Enterococcus faecalis</i> strain ATCC19433	97%	0.0	93%
EnM34 - <i>Enterococcus faecalis</i> strain ATCC19433	95%	0.0	93%

Além da comparação das sequências com sequências contidas no GenkBank, os dados também foram adaptados no programa Mega para construção da árvore de filogenia (Figura 9). Os isolados EnM33, EnT3 e Sta7 foram retirados da árvore devido a problemas do sequenciamento que prejudicava em quase 500 pb o alinhamento para construção desta e dificultava a separação das espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*.

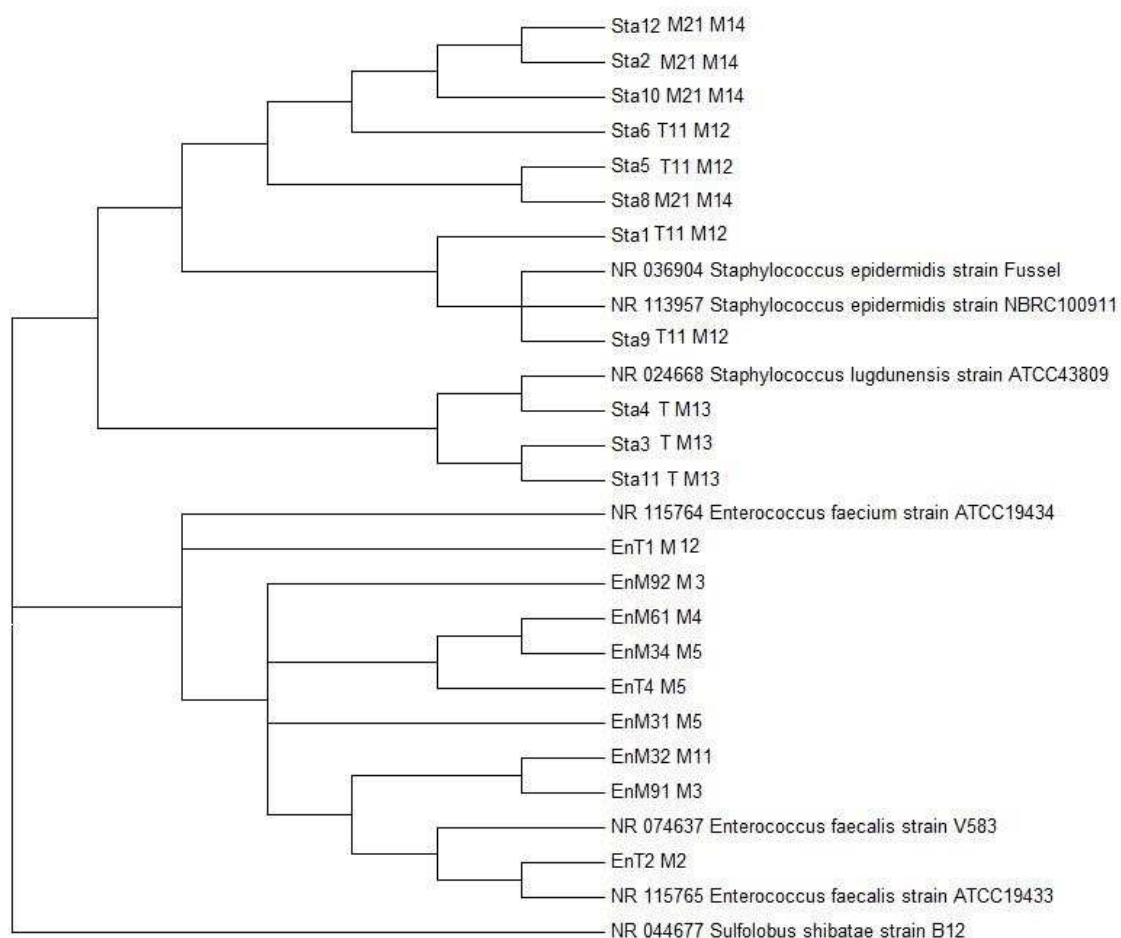


Figura 9. Árvore de filogenia das sequências do gene 16S rDNA dos isolados do leite humano. Os isolados foram agrupados pelo método Neighbor Joining, calculado em 10.000 repetições de bootstrap e valor de corte de 90 %, utilizando-se *Sulfolobus shibatae* estirpe B12 (NR 044677) como raiz (*outgroup*). Iniciais En representam *Enterococcus* spp. e Sta = *Staphylococcus* spp.

A árvore de filogenia apresentado na Figura 9 agrupou os isolados para três gêneros: *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *Sulfolobus shibatae* (raiz da árvore).

Para o gênero *Staphylococcus* spp., houve agrupamento para duas espécies, *S. lugdunensis* e *S. epidermidis*. De acordo com a Figura 10, verifica-se que Sta4, Sta 3 e Sta 11, oriundos da mãe 13, apresentaram maior similaridade a *S. lugdunensis* strain ATCC 43809. Os demais isolados, representados como Sta, correspondem a *S. epidermidis* strain NBRC 100911 e

S. epidermidis strain Fussel, onde Sta9 e Sta 1 (mãe 12) apresentaram alinhamentos mais similar.

Apesar dos *Staphylococcus* spp. apresentarem fenótipos interessantes pelos testes da gelatinase e hemolítica, tem-se que o objetivo do trabalho é obter LAB com potencial probiótico, por isso os demais testes foram realizados somente com os *Enterococcus* spp.

Dentre os *Enterococcus* spp., o isolado EnT2 foi quem apresentou maior similaridade com *E. faecalis* strain ATCC 19433 e *E. faecalis* strain V583, comparado aos demais integrantes deste gênero. Estes isolados representam quatro amostras de leite de transição (EnT1, EnT2, EnT3 e EnT4), correspondente a 15 dias de lactação; sete amostras de leite maduro, sendo EnM31, EnM32, EnM33 e EnM34 obtidos 30 dias após o parto; EnM61 de 60 dias; e EnM91 e EnM92 de 90 dias.

5.4 Resistência ao soro humano

5.4.1. Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo trata-se de uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo, cujo equipamento de detecção óptico-eletrônico permite analisar características físicas e/ ou químicas de uma simples células. Esta técnica permite a obtenção de informações sobre o número e a viabilidade de micro-organismos em um curto período de tempo e consiste na adição de corante fluorescente, para corar DNA e RNA, de modo que ao receber um feixe de laser, cada célula emitirá fluorescência, a qual será captada pelo sistema óptico e, com isso, o número de células é determinado (ÁLVAREZ-BARRIENTOS et al., 2000).

Esta técnica foi utilizada para verificar a porcentagem de morte das bactérias desencadeada pelos componentes bactericidas presentes no soro sanguíneo humano, onde as bactérias foram detectadas, célula por célula, no total de 10.000 eventos, quanto a sua resposta de coloração frente ao iodeto de propídio, que corresponde à morte celular, ou não, representando atividade metabólica normal da bactéria.

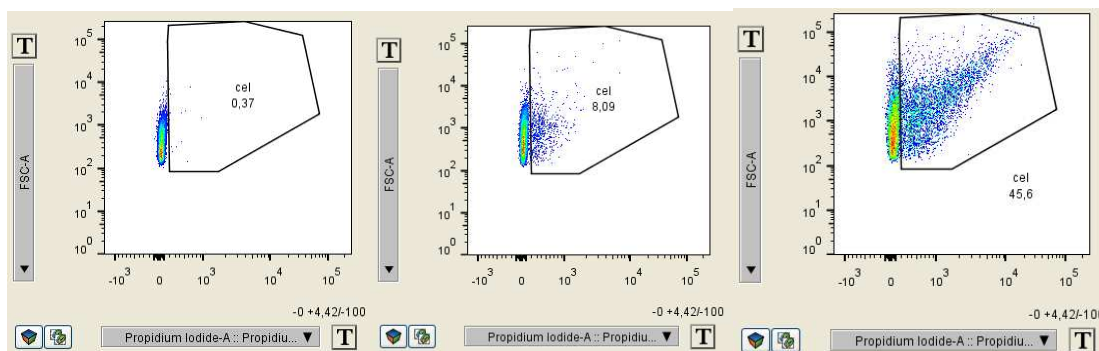


Figura 10. Resistência ao soro humano da amostra EnM34. O gráfico de pontos corresponde a relação do tamanho celular (FSC-A) pela marcação celular com iodeto de propídio nas condições de controle (MRS a esquerda), soro ativo (At, figura central) e soro inativado termicamente (DT a direita).

A Figura 10 mostra na região delimitada por uma gate, as células que se coraram com iodeto de propídio, representando a taxa de morte do isolado nos diferentes tratamentos.

As taxas de morte avaliadas conforme os meios de crescimento, independente da natureza da cepa utilizada, apresentam perfis de distribuição distintos (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$), não atribuídos ao acaso entre soro At, soro DT e MRS. As taxas de morte entre os soros At e DT foram comparadas, sendo o soro At responsável pelas menores taxas (mediana = 4,48 %) e o soro DT pelas maiores (mediana = 9,92 %). O teste de Mann-Whitney sugere que as diferenças entre as distribuições dos perfis de morte para estes dois meios são significativas e que, portanto não provêm do acaso ($p = 0,004$). O meio MRS, como esperado, foi responsável pelas menores taxas de morte bacteriana, com uma mediana de 1,55 % e distribuição estatística distinta do soro At (Mann-whitney, $p < 0,001$). Portanto, verifica-se que o DT apresentou maior capacidade de eliminar cepas bacterianas, independente de sua natureza (patógeno, probióticos ou os enterococos testados). Para esse soro, as cepas apresentaram mediana da taxa de morte 8,37 % maior que o esperado (1,55%, encontrado no meio MRS), contra os 2,93 % apresentados para o soro At.

Os isolados foram agrupados em três categorias: teste (*Enterococcus faecalis*), probiótico (*Lactobacillus gasseri* UFVCC AJ02 e AJ36) e patógenos (*Cronobacter sakazakii* ATCC 7006 e 7008, e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923). Deste agrupamento, foi avaliado a multiplicação em cada meio (soro

AT, DT e MRS). Não houve diferença estatística nas distribuições para as taxas de morte entre os diferentes agrupamentos de cepas e meio AT (Kruskal-Wallis, $p = 0,40$). Contudo, para o soro DT, observou-se que os perfis de distribuição para as taxas são distintos (Kruskal-Wallis, $p = 0,003$). Neste meio, os isolados teste apresentaram maiores taxas de morte (mediana = 11,35 %), seguidos pelos patógenos (9,46 %) e probióticos (1,97 %). O perfil de distribuição das taxas de morte entre patógenos e probióticos em soro DT apresentou diferença significativa (Mann-Whitney, $p = 0,005$), sugestivo de que patógenos são mais sensíveis a esse meio, enquanto os probióticos sofrem menor ação nociva do mesmo. Há, também que se considerar que as taxas de morte dos isolados teste apresentaram distribuição fora do nível de significância estabelecido (Mann-Whitney, $p = 0,36$), indicativo de que as diferenças encontradas entre eles podem ser atribuídas ao acaso.

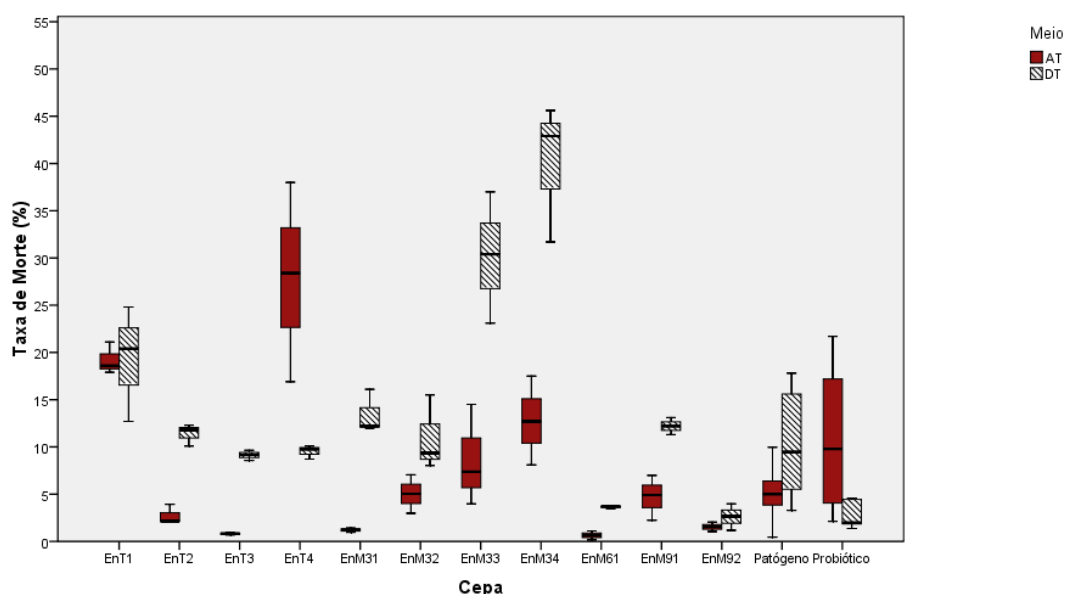


Figura 11. Taxa de morte de cada *Enterococcus faecalis* e dos grupos patógenos (*Cronobacter sakazakii* CDC 7006 e 7008 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e probióticos (*Lactobacillus gasseri* AJ02 e AJ36).

A Figura 11 ilustra a taxa de morte para cada isolado teste, junto aos grupos probióticos e patógenos. Observa-se uma tendência do soro DT apresentar maior eficácia na destruição de bactérias patogênicas do que o soro

At. Contudo, o grupo probiótico foi mais sensível quando exposto ao soro At, sugestivo de que probióticos são mais susceptíveis a este meio que os patógenos. O comportamento dos isolados teste, à exceção da cepa EnT4, aponta maiores taxas de óbito em soro DT do que as apresentadas em soro At.

5.4.2. Plaqueamento

As mesmas condições e parâmetros utilizados no ensaio por citometria de fluxo foram empregadas pela técnica de plaqueamento. O teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,001$) sugere que entre os diferentes meios de cultura existem distribuições estatisticamente distintas e que os perfis de multiplicação em cada meio não se deram ao acaso. O grupo MRS apresentou a maior mediana para o número de colônias ($1,91 \times 10^8$ UFC/mL), seguido do soro At ($7,06 \times 10^7$ UFC/mL) e soro DT ($3,75 \times 10^7$ UFC/mL) e no teste de Mann-Whitney foram encontradas diferenças significativas entre o perfil de crescimento do soro At e MRS ($p < 0,001$) e entre soro At e DT ($p = 0,001$) o que indica que o perfil de crescimento bacteriano é distinto em cada meio, independente da natureza da cepa.

Quando avaliado o crescimento segundo categoria das cepas (Patógeno, Probiótico ou Teste), e meio (MRS, Soro AT e Soro DT), o teste de Kruskal-Wallis foi sugestivo de que a diferença entre as distribuições de crescimento de Patógenos, Probióticos e isolados Teste não se devem ao acaso para os meios MRS ($P = 0,001$), Soro AT ($P = 0,009$) e Soro DT ($P = 0,001$). Contudo, o teste de Mann-Whitney sugere que os grupos patógeno e probiótico não apresentam diferenças estatisticamente significativas em seus perfis de crescimento para o meio MRS ($P = 0,12$), Soro AT ($P = 0,94$) e soro DT ($P = 0,63$). Uma reavaliação do impacto dos diferentes meios testados no crescimento bacteriano se faz necessária pela ampliação do espaço amostral, bem como do número de repetições envolvidas no plaqueamento de cada cepa. O perfil gráfico observado na Figura 12 sugere que o grupo teste apresenta tendência a maior crescimento em soro AT e DT comparado ao grupo patógenos, ao passo que o agrupamento dos probióticos apresenta a menor mediana para crescimento em soro AT e maior mediana para crescimento em soro DT quando comparado ao grupo dos patógenos.

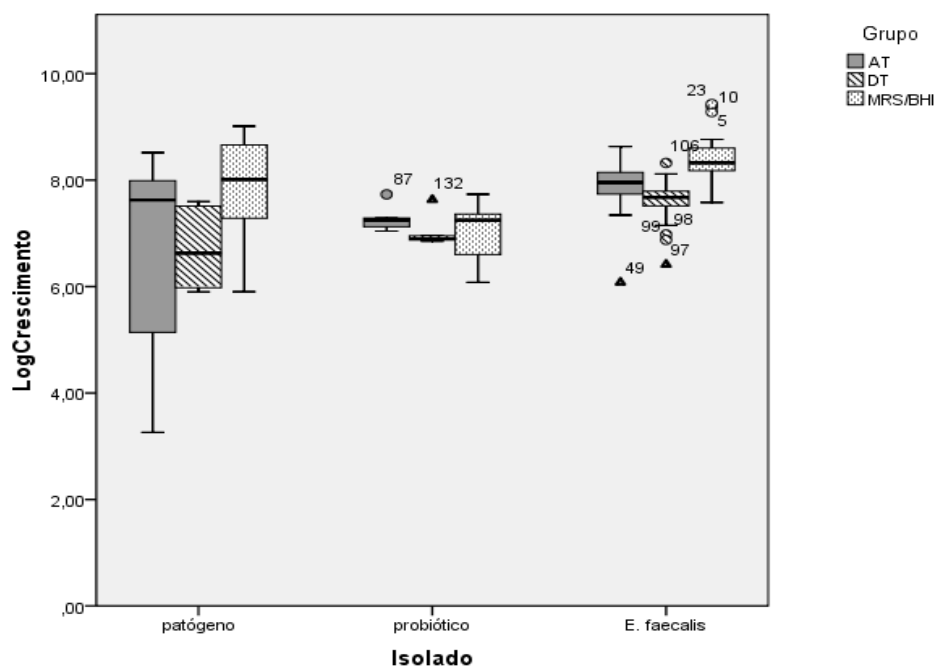


Figura 12: Log de crescimento microbiano nos diferentes tratamentos (soro ativo = At, soro inativado termicamente = DT e meio MRS/ BHI = controle) de isolados patogênicos (*Cronobacter sakazakii* CDC 7006 e 7008 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), probióticos (*Lactobacillus gasseri* AJ02 e AJ36) e teste (*Enterococcus faecalis*). Círculos no gráfico correspondem a outliers e triângulos são extreme value.

Na Figura 12 observa-se que *E. faecalis* corresponde um grupo bastante heterogêneo, apresentando vários outliers. Este comportamento não é incomum pois neste grupo engloba-se muitos isolados. Desta forma, na Figura 17 os isolados foram trabalhadas em termos de crescimento relativo e o grupo *E. faecalis* desagrupado, onde observa-se que ausência de outliers. O crescimento relativo refere-se a divisão da média das contagens em soro pela média das contagens em meio MRS/BHI.

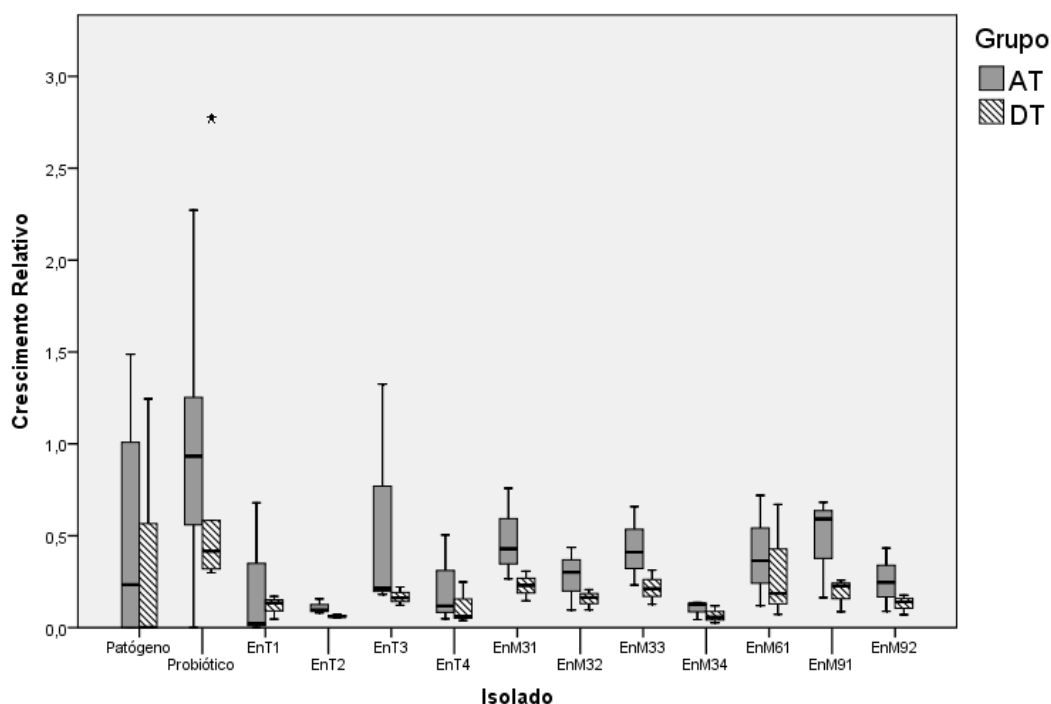


Figura 13. Crescimento Relativo [(contagem no soro At ou DT/ contagem em caldo MRS ou BHI) - 1] dos isolados de *Enterococcus faecalis* de leite humano após 15 (EnT1-4), 30 (EnM31-34), 60 (EnM61) e 90 (EnM91-92) dias de lactação e grupos probiótico (*Lactobacillus gasseri* AJ02 e AJ36) e patogênico (*Cronobacter sakazakii* CDC 7006 e 7008 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) em soro ativo = At e soro inativado termicamente = DT.

Em contrapartida ao exposto na Figura 12, o grupo patógeno apresentou menor crescimento relativo tanto no soro At quanto no DT em relação aos probióticos, com a mediana dos patógenos para o soro At de 0,32 e DT de 0,29. Para os probióticos, no soro At a mediana correspondeu a 1,15 contra 0,42 no soro DT.

De acordo com o comportamento gráfico observado, pode-se sugerir que entre os isolados teste EnM31, EnM32, EnM33, EnM61 e EnM91 apresentaram padrão mais promissor de crescimento relativo, com maiores medianas para soro AT e DT. Uma avaliação mais ampla, com maior número de plaqueamentos, pode indicar potencial probiótico para estes isolados.

5.5 Resistência a antibióticos

As classes de antibióticos estudadas foram aminoglicosídeos (AMI, GEN), macrolídeos (ERI), glicopeptídeos (SUL, VAN) e os beta lactâmicos, com as respectivas classes i) penicilinas (AMP, OXA, PEN), ii) inibidor de lactamase (AMO), iii) cefalosporina (CRO, CIP, CFE, CFL), iv) carbapenem (MER), ao todo 14 antibióticos mais utilizados em UTINs. As figuras 14 e 15 ilustram o perfil de sensibilidade das onze estirpes estudadas aos diferentes antibióticos (expressos em porcentagens) de acordo com suas categorias.

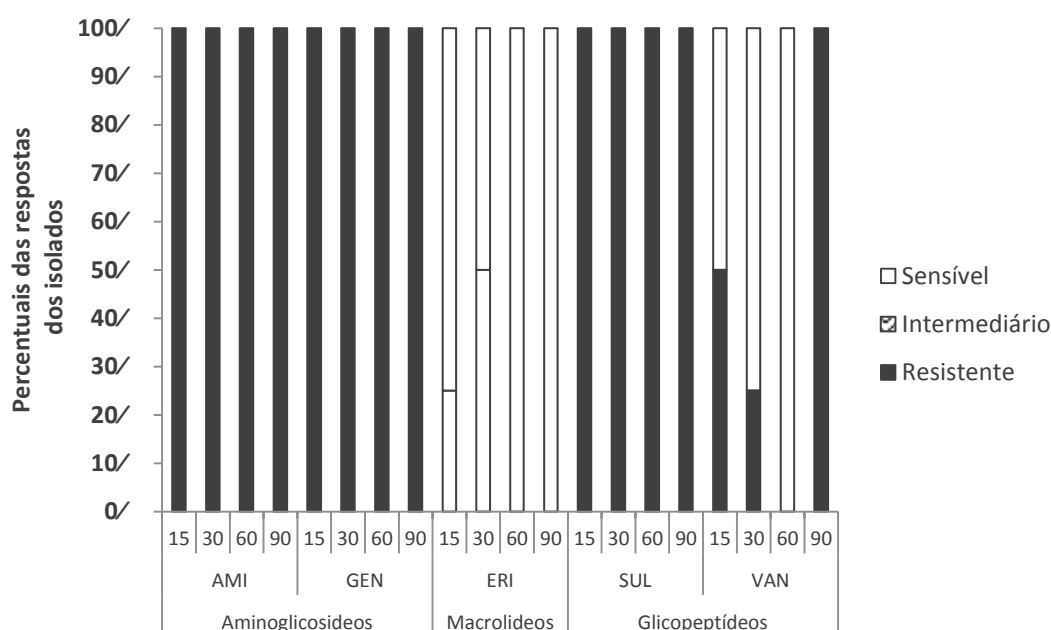


Figura 14. Perfil de resistência em relação aos cinco antibióticos dos grupos aminoglicosídeos, macrolídeos e glicopeptídeos. Nomenclatura e concentração dos antibióticos: AMI = amicacina (10 µg), GEN = gentamicina (10 µg), ERI = eritromicina (15 µg), SUL = sulfonamidas (300 µg) e VAN = vancomicina (30 µg). Obtidas da SENSIFAR® (Cefar Diagnóstica, São Paulo, Brasil). O número amostra para cada tempo foi: T15 → N = 4. T30 → N = 4. T60 → N = 1. T90 → N = 2.

A Figura 14 sugere alta resistência dos isolados frente aos grupos de aminoglicosídeos e glicopeptídeos.

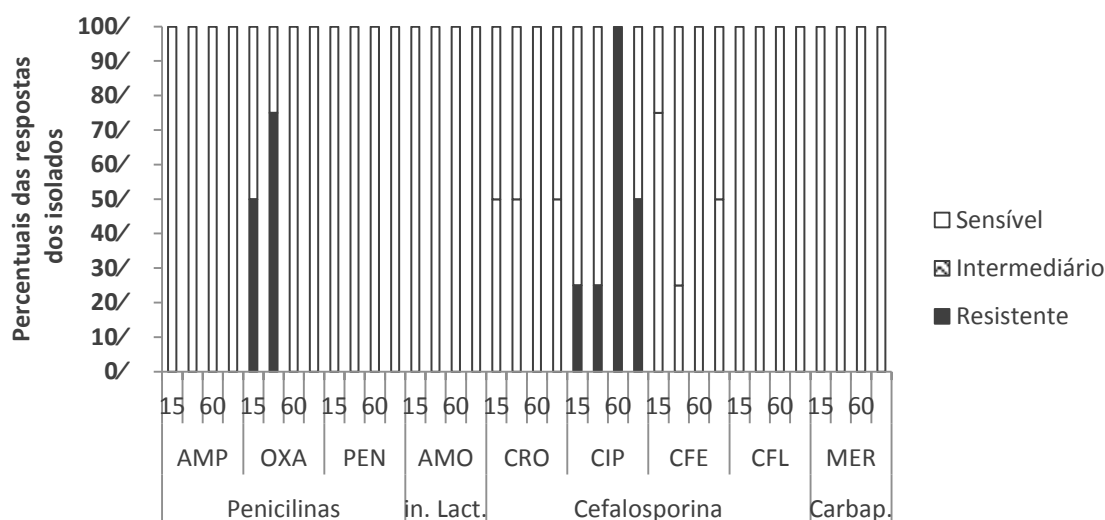


Figura 15. Perfil de resistência dos 11 isolados em relação a nove antibióticos do grupo β -lactâmicos. Nomenclatura e concentração dos antibióticos: AMP = ampicilina (30 μ g), OXA = oxacilina (1 μ g), PEN = penicilina (10 μ g), AMO = amoxicilina (10 μ g), CRO = ceftriaxona (30 μ g), CIP = ciprofloxacina (5 μ g), CFE = cefalexina (30 μ g), CFL = cefalotina (30 μ g) e MER = meropenem (10 μ g). Obtidas da SENSIFAR® (Cefar Diagnóstica, São Paulo, Brasil). As classificações abreviadas referem-se: in. Lact = inibidores de lactamase e Carbap = carbapenem. O número amostra para cada tempo foi: T15 $\rightarrow$ N = 4. T30 $\rightarrow$ N = 4. T60 $\rightarrow$ N = 1. T90 $\rightarrow$ N = 2.

Dentre os antibióticos β -lactâmicos, observa-se menor incidência de resistência dos *E. faecalis*, sendo o grupo cefalosporina o mais preocupante, pois três dos quatro representantes deste grupo não foram efetivos na inibição dos isolados analisados.

As 11 espécies de *Enterococcus* avaliadas apresentaram perfil de susceptibilidade variado entre os antibióticos testados. Todas as estirpes foram resistentes aos antibióticos AMI, GEN e SUL e sensíveis a MER, AMP, PEN, AMO, CFL. Para ERI, CRO e CFE os resultados foram sensíveis ou parcialmente sensíveis, enquanto para VAN, OXA e CIP, os resultados foram resistentes, parcialmente resistentes e especificamente para a OXA cerca de 10 % das estirpes apresentaram sensibilidade.

Já para ilustrar os resultados por isolado, a Tabela 4 especifica para quais antibióticos os isolados tendem a ser sensíveis ou resistentes e na figura 16 a proporção geral de sensibilidade e resistência.

Tabela 4. Relação do perfil de resistência e sensibilidade dos isolados de acordo com os antibióticos analisados.

Isolado	Sensível	Intermediário	Resistente
EnT1	AMP, AMO, CFL, CRO, MER, PEN	CFE, ERI	AMI, CIP, GEN, OXA, SUL, VAN
EnT2	AMP, AMO, CFL, ERI, MER, PEN	CFE, CRO, CIP, OXA, VAN	AMI, GEN, SUL
EnT3	AMP, AMO, CFE, CFL, CRO, ERI, MER, PEN	CIP	AMI, GEN, OXA, SUL, VAN
EnT4	AMP, AMO, CFL, ERI, MER, PEN	CFE, CRO, CIP, OXA, VAN	AMI, GEN, SUL
EnM31	AMP, AMO, CFL, MER, PEN	CFE, CRO, CIP, ERI	AMI, GEN, OXA, SUL, VAN
EnM32	AMP, AMO, CFE, CFL, CRO, ERI, MER, PEN	OXA, VAN	AMI, CIP, GEN, SUL
EnM33	AMP, AMO, CFE, CFL, MER, PEN	CRO, CIP, ERI, VAN	AMI, GEN, OXA, SUL
EnM34	AMP, AMO, CFE, CFL, CRO, ERI, MER, PEN	CIP, VAN	AMI, GEN, OXA, SUL
EnM61	AMP, AMO, CFE, CFL, CRO, ERI, MER, OXA, PEN	VAN	AMI, CIP, GEN, SUL
EnM91	AMP, AMO, CFE, CFL, CRO, ERI, MER, PEN	CIP, OXA	AMI, GEN, SUL, VAN
EnM92	AMP, AMO, CFL, ERI, MER, PEN	CFE, CRO, OXA	AMI, CIP, GEN, SUL, VAN

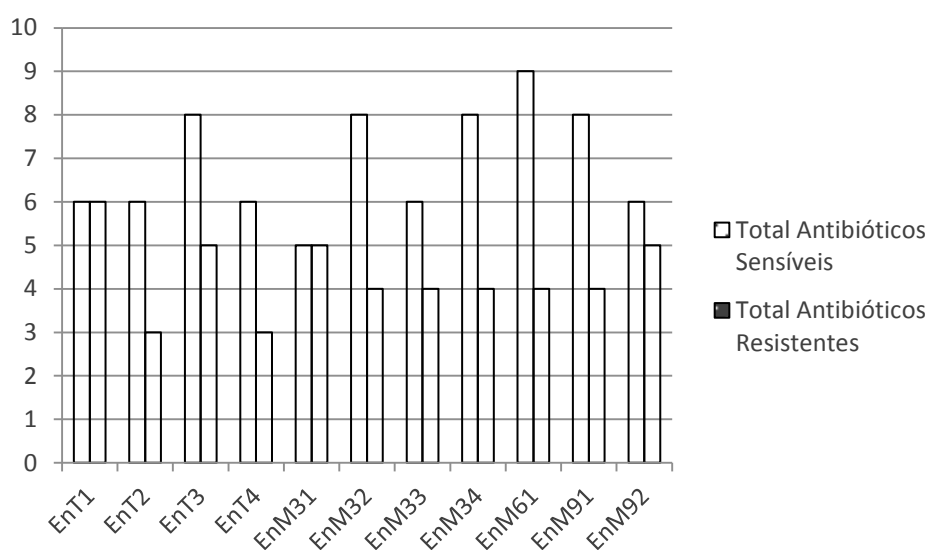


Figura 16. Perfil da proporção sensibilidade/ resistência de cada isolado aos diferentes antibióticos analisados.

Os isolados com menores possibilidades de carregarem genes de resistência a antibióticos são aqueles que apresentam a maior proporção sensibilidade/ resistência, ou seja, EnM61, EnM32 e EnM34 correspondem aos isolados de perfil sugestivo de maior segurança, uma vez que compreendem

resistência frente a quatro antibióticos, sendo que para três deles, todos os demais isolados também apresentaram tal característica. Já os isolados EnT1 e EnM31, por apresentarem a mesma proporção sensibilidade/ resistência, correspondem aos isolados potencialmente mais virulentos.

5.6 Resistência ao suco gástrico

O perfil de concentração bacteriana em UFC/mL e porcentagem de sobrevivência dos 11 isolados após 60 e 90 minutos de exposição ao suco gástrico são apresentados na Figura 17.

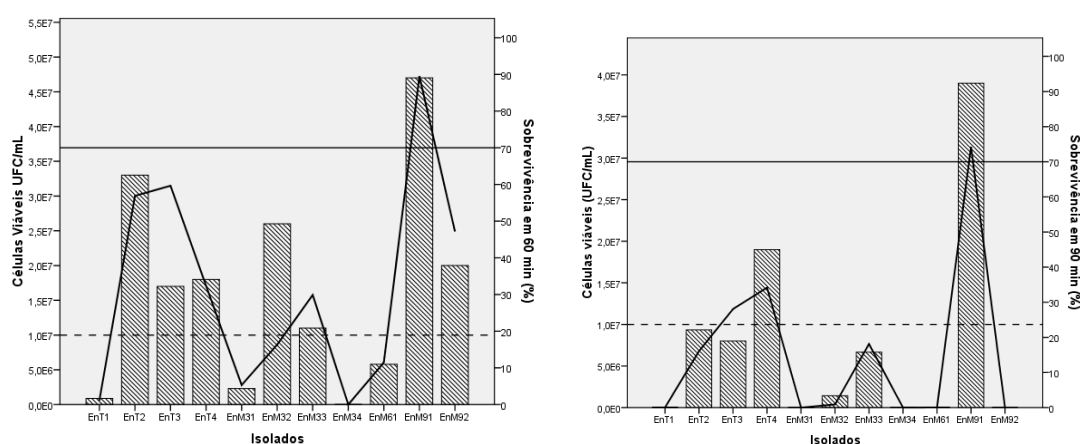


Figura 17. Perfil de células viáveis e porcentagem de sobrevivência dos isolados após 60 e 90 minutos de exposição ao suco gástrico artificial (cloreto de sódio: 2,0 g; pepsina: 3,2 g; ácido clorídrico concentrado: 7 mL; água destilada: 1000 mL; e pH final de 2). As barras representam as contagens em UFC/mL de cada *Enterococcus faecalis*, as linhas aos percentuais de sobrevivência, reta sólida corresponde ao ponto de corte para viabilidade de 70 % dos isolados após o tempo referido de exposição e, reta tracejada, ao ponto de corte para sobrevivência a partir de 10^7 UFC/mL.

Charteris et al (1997) que trabalharam com isolados de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., utilizaram como critério de seleção para micro-organismos potencialmente probióticos, cepas que apresentassem viabilidade superior a 70% no teste de sobrevivência gástrica. Diante deste critério, apenas o isolado EnM91, estaria apto como potencial probiótico.

Considerando-se a concentração do isolado para atuar como probiótico, FERREIRA (2012) apresenta como critério de seleção uma concentração em UFC/mL de 10^6 para *Lactobacillus* spp. e 10^7 para *Bidobacterium* spp., baseado no local de atuação no TGI, que correspondem ao intestino delgado e cólon respectivamente.

Diante destes dois critérios, os isolados EnT2, EnT3, EnT4, EnM32, EnM33, EnM91 e EnM92 representam as estirpes mais adequadas, considerando o tempo de 60 min de exposição ao suco gástrico, ao passo que para uma maior exigência, como tempo médio de 90 min de exposição, apenas os isolados EnT4 e EnM91 atenderiam ao requisito da resistência.

5.7 Resistência a sais biliares

Os resultados dos 11 isolados de *Enterococcus* spp. multiplicados em caldo MRS (controle) e MRS + 0,3 % de oxgall estão apresentados na Figura 18.

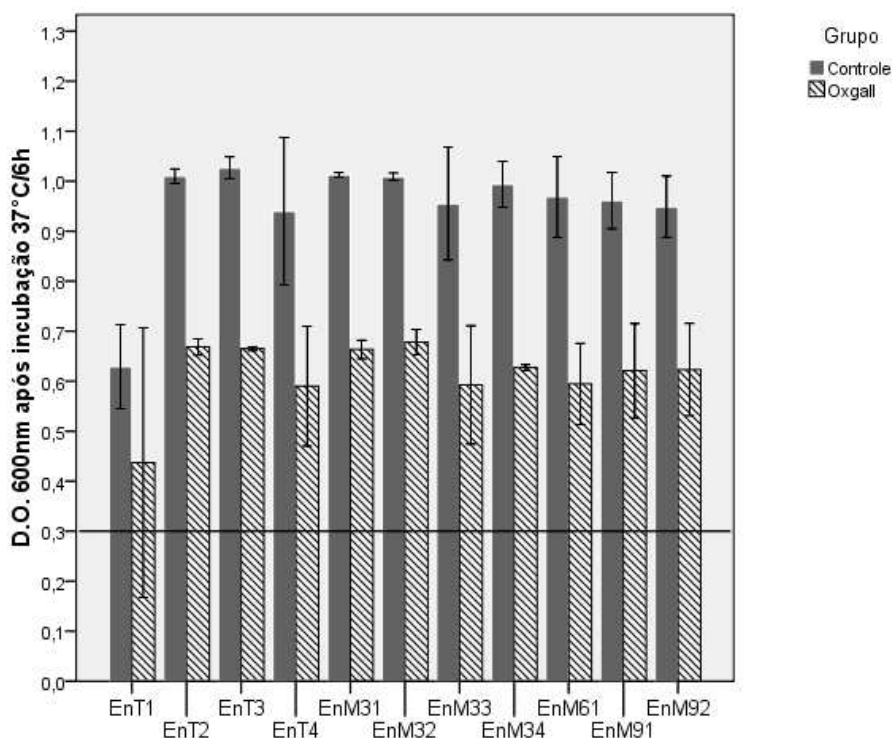


Figura 18. Resistência aos sais biliares dos 11 isolados após 6 h de incubação à 37 °C em caldo MRS (controle) e caldo MRS acrescido de 0,3 % de oxgall a 600 nm.

A partir dos resultados encontrados, pode-se dizer que todos isolados apresentaram-se resistentes aos efeitos tóxicos dos sais biliares, pois segundo Gilliland et al. (1984), uma estirpe é considerada resistente quando apresenta uma D.O > 0,3 após 6 h de exposição. Desta forma, tais isolados se mostraram promissoras para futuras análises para seleção de probióticos.

5.8 Antagonismo a patógenos

Para verificação da capacidade inibitória de cada isolado frente aos micro-organismos indicadores, foi verificado que os isolados apresentaram distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, exceto por EnM91 e EnM31. Por esta razão, o teste de Kruskal-Wallis foi aplicado apresentando $p < 0,0044$, indicando que há diferenças no desempenho antagônico geral dos isolados frente aos quatro micro-organismos patogênicos e indicadores analisados.

Pelo teste Mann-Whitney, foi possível determinar que EnT2 foi o isolado com maior atividade antimicrobiana, e as cepas EnT3, EnT4, EnM31, EnM32, EnM33, EnM34, EnM61 e EnM91 estatisticamente iguais ($p > 0,05$). No entanto, EnT1 e EnM92 apresentaram capacidade de inibição estatisticamente inferiores ao EnT2 (Mann-Whitney $p = 0,008$ e $0,032$, respectivamente) (Figura 19), sugerindo potencial antagônico inferior.

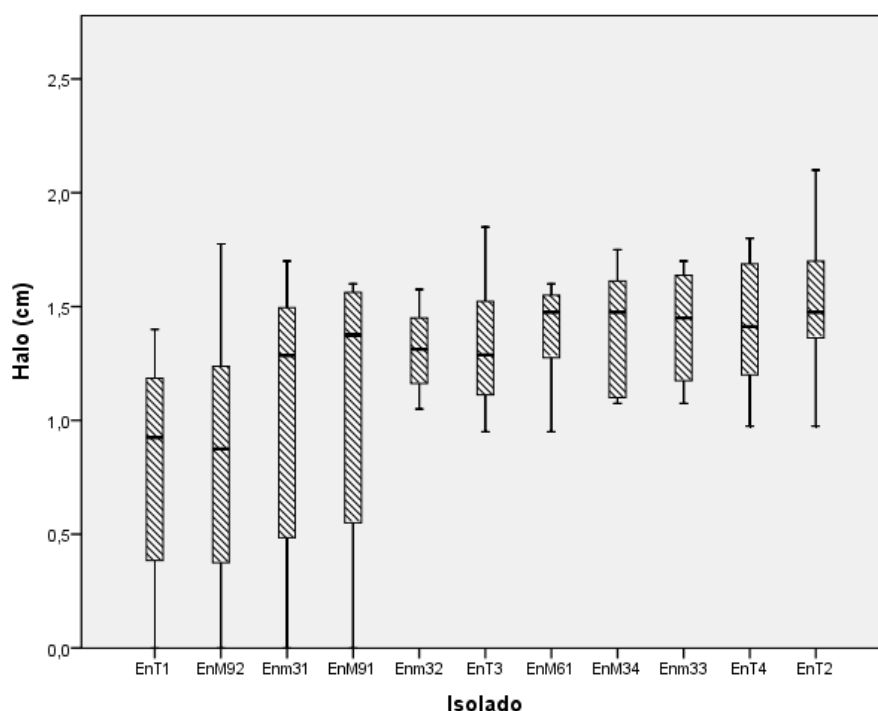


Figura 19. Capacidade de inibição de cada isolado de *Entococcus* spp. frente a quatro micro-organismos patogênicos e indicadores: *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Salmonella* sp. (ATCC 13076) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313).

Dentre os isolados pertencentes ao grupo de maior potencial antagonístico, EnM31 e EnM91 apresentaram valores mais dispersos para os halos de inibição quando comparados aos demais isolados com desempenho equivalente (Figura 3). Assim, sugere-se que, EnT2, EnT3, EnT4, EnM32, EnM33, EnM34 e EnM61 possuem melhor capacidade geral de inibição.

A Figura 20 a seguir sumariza a capacidade dos isolados agrupados em inibir o crescimento de cada patógeno e micro-organismo indicador.

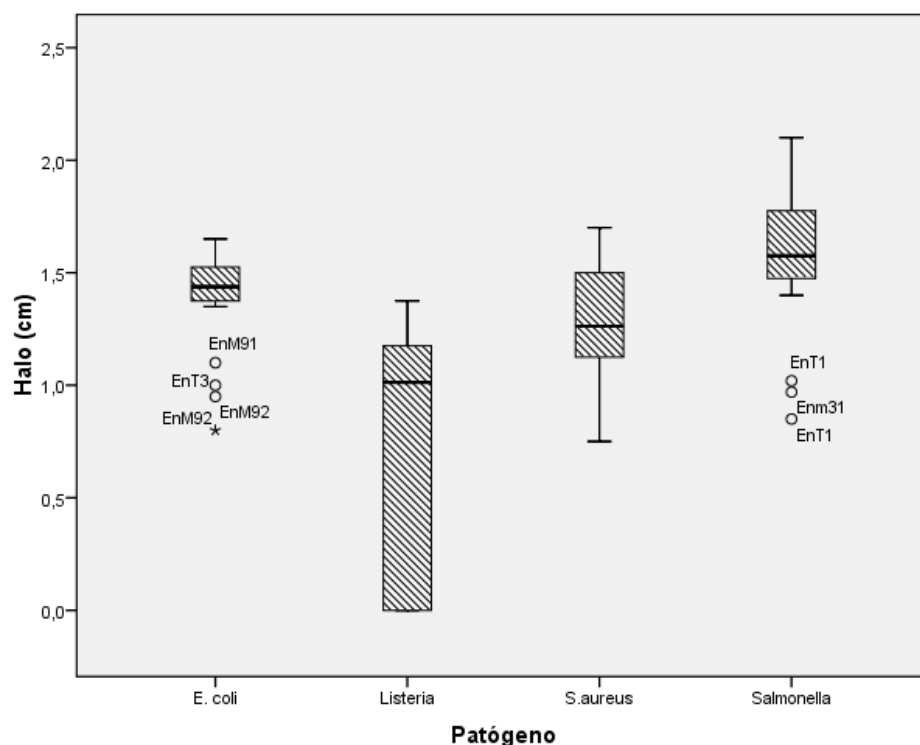


Figura 20. Perfil de inibição dos isolados de *Enterococcus* spp. para cada patógeno e micro-organismo indicador avaliado. ° representam outliers e * extreme value.

Para os patógenos analisados de forma isolada, verificou-se que *Salmonella* (mediana 1,58) foi o mais sensível, com halos variando de 9 mm (EnT1) a 19mm (EnT2) . A inibição frente à *E. coli* (mediana 1,44) foi a que apresentou menor variação nos valores encontrados sendo que, para este caso, os isolados EnM92, EnT3 e EnM91 apresentaram capacidade de inibição inferiores aos demais. *Listeria monocytogenes* foi o patógeno mais resistente (mediana igual a 1,01) com tamanho de halo variando de 0 mm quando antagonizado por EnT1, EnM31, EnM91 e EnM92 a 11 mm (EnT2, EnT3, EnT4, EnM32 e EnM33) (Tabela 5). Por fim, de um modo geral os isolados apresentaram boa competência em inibir o crescimento de *S. aureus* (mediana de 1,26).

Observa-se também que os isolados EnT1, EnM31, En91 e EnM92, incapazes de inibir a *Listeria*, foram os mesmos outliers de *Salmonella* (EnT1 e EnM31) e *E. coli* (EnM92 e EnM91). Observando a Figura 19, tem-se que estes isolados influenciaram na capacidade de inibição geral, uma vez que

constituem o grupo de menor inibição (EnT1 e EnM92) e maior oscilação dentro do grupo de maior inibição (EnM31 e EnM91).

Tabela 5. Atividade antimicrobiana dos isolados de *Enterococcus* spp. frente aos patógenos.

Amostra	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>	<i>E. coli</i>
EnT1	0,89 ± 0,16	0,94 ± 0,12	0	1,37 ± 0,03
EntT2	1,39 ± 0,05	1,94 ± 0,23	1,17 ± 0,28	1,57 ± 0,07
EntT3	1,36 ± 0,3	1,62 ± 0,32	1,12 ± 0,07	1,21 ± 0,37
EntT4	1,2 ± 0,11	1,79 ± 0,02	1,17 ± 0,28	1,52 ± 0,11
EnM31	1,31 ± 0,23	1,34 ± 0,51	0	1,47 ± 0,07
EnM32	1,16 ± 0,12	1,54 ± 0,05	1,15 ± 0,14	1,39 ± 0,02
EnM33	1,41 ± 0,41	1,45 ± 0,03	1,15 ± 0,11	1,64 ± 0,02
EnM34	1,32 ± 0,28	1,66 ± 0,12	1,07 ± 0	1,54 ± 0,16
EnM61	1,55 ± 0,07	1,55 ± 0,03	1,06 ± 0,16	1,41 ± 0,05
EnM91	1,44 ± 0,23	1,54 ± 0,09	0	1,31 ± 0,3
EnM92	0,85 ± 0,14	1,62 ± 0,21	0	0,9 ± 0,14

Verificou-se variação em relação a capacidade inibitória entre os diferentes patógenos e dentre as diferentes estirpes enterocócicas. Esta complementação é desejável por capacitar como um todo o papel de proteção a patógenos dessas estirpes.

O uso de diferentes concentrações de NaOH foi empregada para avaliar se a natureza de inibição provém de ácidos orgânicos. Foi verificado que a concentração de 10 mol/L de NaOH não só eliminou o halo de inibição, como inibiu diretamente o patógeno avaliado, o que condiz que tal concentração não é favorável para tal avaliação. As menores concentrações (0,1 e 0,01 mol/L) não apresentaram diferenças quanto ao halo de inibição e a maioria das amostras apresentaram anulação da inibição com a concentração de 2 mol/L e poucas amostras apresentaram diminuição do halo de inibição com a concentração de 1 mol/L (Figura 21). Desta forma, pode-se dizer que o efeito inibitório desencadeados pelos isolados não contam apenas com ácidos orgânicos, mas também com outros compostos, tais como bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, entre outros.

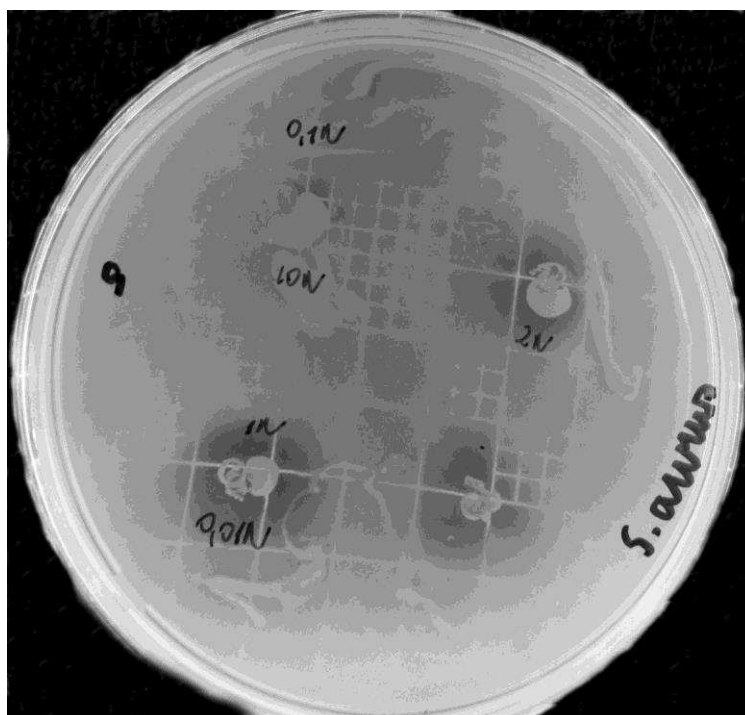


Figura 21. Efeito de diferentes concentrações de NaOH sobre o halo de inibição gerado pelo plaqueamento do isolado de *Enterococcus faecalis* do leite humano frente à *Staphylococcus aureus*.

Analisando todos testes realizados, a Tabela 6 sumariza os isolados com maior e menor potencial probiótico. Verifica-se que EnT1 é o menos indicado e EnM32, EnM61 e EnM91 os mais promissores para uso como probiótico.

Tabela 6. Relação dos *Enterococcus faecalis* com potencial probiótico.

Teste	Potencial probiótico	Menor desempenho probiótico
Soro	EnM31, EnM32, EnM33, EnM61 e EnM91	EnT1, EnT2, EnT4 e EnM34
Antibióticos	EnM32, EnM34, EnM61 e EnM91	EnT1 e EnM31
Suco gástrico	EnT2, EnT3, EnT4 e EnM91	EnT1, EnM31, EnM34, EnM61 e EnM92
Sais biliares	Todas	-
Antagonismo	EnT2, EnM32 e EnM61	EnT1 e EnM92

6. DISCUSSÃO

6.1. Seleção e identificação das bactérias predominantes do LH.

Os critérios seletivos de bactérias do LH com potencial probiótico foram baseados em aspectos fenotípicos de segurança pela expressão da hemolisina e gelatinase.

A verificação da produção da hemolisina é importante pois, trata-se de uma característica bastante comum à micro-organismos patogênicos que requerem o íon ferro à partir da hemoglobina durante seu metabolismo. Desta forma, a capacidade do micro-organismo em lisar hemácias pode desencadear como consequência anemia e edema (VESTERLUND et al., 2007).

No caso dos enterococos, a atividade hemolítica pode ser desencadeada pela citolisina, uma toxina hemolítica (atuando também como bacteriocina) que aparece em até 60 % dos *E. faecalis* isolados de surtos, sendo exclusiva desta espécie (MUNDY et al., 2000). A citolisina é codificada pelo operon constituído de oito genes: *cytR1*, *cytR2*, *cytLL*, *cytLS*, *cytIM*, *cytB*, *cytA* e *cytI* (MUNDY et al., 2000). Dentre os aspectos patogênicos desencadeados por esta toxina está o rompimento da membrana de glóbulos vermelhos e diversas outras células humanas (VELASCO et al., 2000).

Logo, o fenótipo β -hemolítico e a presença de genes que codificam a citolisina são indesejados nos isolados com destino de uso alimentar, como os probióticos, por medidas de segurança.

A atividade hemolítica estava presente na grande maioria dos isolados predominantes no LH em todas as fases de maturação, incluindo todos aqueles obtidos no meio Rogosa e maiores incidência nos isolados com os menores (5 dias) e maiores tempos de lactação (60 e 90 dias) do meio MRS. Desta forma, todos isolados β -hemolíticos foram desconsiderados do estudo. As 23 estirpes identificadas pertencem à ME do LH, presentes em diversas fases de maturação e estão predominando nesse alimento na faixa de 10^5 UFC/ mL, e consiste em uma informação importante, indicando que esses isolados são inócuos, ou seja, não são passíveis de causar danos epiteliais.

Considerando o meio Rogosa, o trabalho desenvolvido por Chaves (2009), que obteve seus isolados a partir de fezes de RN utilizando este meio, revelou que apenas 3 dos 61 isolados (4,92 %) eram γ -hemolíticos em sangue de carneiro. Camargo et al (2014) trabalhando com *Enterococcus* spp. de

diferentes alimentos verificaram que 72 % dos seus isolados eram hemolíticos e pertencentes à espécie *E. faecium*.

Semedo et al. (2003) encontraram que enterococos agem melhor sobre eritrócitos de cavalo, humano e coelhos do que de carneiro. Como este teste foi aplicado antes da identificação do micro-organismo, logo, recomenda-se que para estudos futuros estes isolados sejam reavaliados, pois micro-organismos γ -hemolíticos podem apresentar atividade α ou β -hemolítico com uso destes outros sangues.

Medeiros (2014) comparou o teste da hemolisina em ágar sangue de cavalo desfibrinado com a incidência do gene *cylA* em *E. faecalis* de origem alimentar e clínica. Os resultados revelaram maior incidência do gene em isolados clínicos (54,4 %) do que de alimentos (7,2 %) e entre estes isolados positivos, 74,2 % dos clínicos e 50 % dos alimentos, apresentaram hemólise no ágar sangue. Desta forma, verifica-se que o fenótipo negativo em ágar sangue pode ser positivo quanto a presença do gene *cylA*. Jiménez et al. (2008) analisando fatores de virulência de 8 isolados de *E. faecalis* do colostro humano, não detectou a presença do *cylA*. Estes estudos sugerem que a tanto a hemólise, quanto a incidência do gene *cylA* em *E. faecalis* podem ser influenciados pela origem do micro-organismo, onde isolados clínicos tendem a ser mais virulentos do que isolados alimentícios e aqueles oriundos do LH, parecem ser ainda mais seguros.

A gelatinase trata-se de uma metaloendopeptidase capaz de hidrolisar insulina, caseína, hemoglobina, fibrinogênio, colágeno e gelatina (SU et al., 1991). Acredita-se que a principal função da gelatinase na patogênese enterocócica é o fornecimento de nutrientes para as bactérias a partir da degradação do tecido do hospedeiro (FISHER & PHILLIPS., 2009).

Todos isolados ausentes da atividade hemolítica também apresentaram ausência do fenótipo da gelatinase. Camargo et al (2014) encontraram alta incidência da gelatinase de *E. faecalis* oriundos de vários alimentos, com porcentagens de incidência em 50 % nos queijos, 80 % de aves, 66,7 % de vegetais e 50 % de porcos, e estes isolados raramente apresentaram atividade hemolítica. Gútiez et al. (2013) verificaram 100 % do fenótipo da gelatinase nos isolados de *E. faecalis* oriundos de alimentos, ambiente e clínico, assim como seu determinante de produção (*gelE*), mas

apenas 15 % foram hemolíticos. Medeiros et al. (2014) observaram que 54,5 % de *E. faecalis* de origem clínica e 13,9 % de origem alimentícia positivos para *gelE*, porém incapazes de degradar a gelatina 12 %, ou seja, o fenótipo pode condizer com ausência da gelatinase, mas esta espécie pode carrear um gene silencioso de expressão. Jiménez et al. (2008) também verificaram alta incidência de *gelE* nos *E. faecalis* do colostro humano (87,5 %). Desta forma, os resultados encontrados neste trabalho mostraram maior segurança dos *E. faecalis* comparado à esta espécie na literatura, mas recomenda-se avaliar, se possível em estudos futuros, o teste genotípico para verificação da presença do gene *gelE*.

Os isolados γ -hemolíticos e gelatinase negativos, identificados pelo sequenciamento do gene 16S do rDNA revelaram a predominância de *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp. no LH, pois foram obtidos de diferentes mães, em diferentes tempos (15, 30, 60 e 90 dias de lactação) e de placas com contagens variando entre $1,0 \times 10^2$ até $1,3 \times 10^3$ UFC/mL e $1,2 \times 10^2$ a $5,0 \times 10^5$ UFC/mL, respectivamente.

Um estudo semelhante desenvolvido por de Solís et al. (2010) mostrou que o plaqueamento do LH em ágar MRS em todos períodos de lactação (1, 10, 30 e 90 dias pós-parto) revelaram o gênero *Streptococcus* como o mais representativo, seguido de *Staphylococcus*, sendo *Staphylococcus epidermidis* a espécie mais frequente, corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho. Jiménez et al. (2008) analisando o colostro encontraram *Staphylococcus* spp. como gênero predominante (91,67 %), com *S. epidermidis* (83,33 %) e *S. lugdunensis* (22,22 %) como as espécies mais representativas. Hekkilä e Saris (2003) também identificaram *Staphylococcus* spp. como a bactéria comensal predominante no LH após 90 dias, representando 64 % dos isolados, com *S. epidermidis* como espécie predominante (50 %) e *S. hominis* (3,1 %), *S. capitis* (2,9 %), *S. aureus* (1,8 %) e *S. lugdunensis* (0,4 %) também presentes em menor proporção.

Considerando-se a persistência na predominância da espécie em diversas pesquisas, estudos mais aprofundados poderão esclarecer o papel dessa espécie na colonização inicial da microbiota do RN. Begović et al. (2013) ao avaliarem o impacto dos fatores de virulência que *S. epidermidis* obtidos de LH poderiam oferecer aos RNs, encontraram alta atividade lipolítica e

proteolítica, além de apresentarem genes associados a adesão e formação de biofilmes (mecanismos importantes para infecções nosocomiais em RN). Desta forma, eles confirmaram o risco que *S. epidermidis* podem representar à saúde do RN, mas que também são necessários mais estudos sobre os papéis que podem ser assumidos pelas diferentes espécies de bactérias do intestino humano, e não só das espécies consideradas benéficas.

Apesar dos *Staphylococcus* spp. isolados no presente estudo apresentarem fenótipos seguros em relação à ausência de atividades beta hemolítica e de gelatinase, o estudo foi realizado para conhecer LAB endógenas, predominantes nas diversas fases do leite humano, e desta forma, as espécies estafilocócicas foram armazenadas adequadamente para estudos posteriores, e prosseguiu-se às análises das espécies enterocócicas, componentes do grupo de BAL.

Com relação às LAB, no colostro, Jiménez et al. (2008) encontrou porcentagens de amostras positivas para os gêneros de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* de apenas 2,77 %. Solís et al. (2010) não obteve *Lactobacillus* spp. no colostro, sendo encontrado apenas nos dias 10, 30 e 90 após o parto, com porcentagem entre 4 a 11 % e o gênero *Bifidobacterium* spp. foi detectado em 3 % no leite de 1 dia, 11 % com 30 dias e 4 % com 90 dias. Hekkilä e Saris (2003) avaliando 30 amostras de LH até 90 dias do parto e 10 amostras entre 90 e 421 dias, encontraram 9 % de LAB, representados por *Lactobacillus rhamnosus*, *L. crispatus*, *Lactococcus lactis* e *Leuconostoc mesenteroides*.

Logo, as chances de se conseguir obter os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* é baixa, sendo o colostro o período mais delicado de obtenção destes isolados. Além disso, verifica-se que as espécies comumente empregadas como probióticos são raras considerando-se esta matriz.

O teste presuntivo de Costa (2012), que plaqueou as amostras de LH deste trabalho já havia detectado que os enterococos predominavam no LH em todas fases de lactação, mas esperava-se que o plaqueamento em meio MRS fosse suficiente pra conseguir selecionar lactobacilos ou bifidobacterias (Anexo C). Desta forma, estudos mais aprofundados se fazem necessários pra poder obter um meio mais seletivo para estes gêneros considerando-se a matriz LH.

Para *Enterococcus* spp., Solís et al (2010) isolaram este gênero apenas nas amostras de 1 e 10 dias, nas porcentagens de 3 e 8 %, respectivamente. Jiménez et al (2008) observaram a presença deste gênero em aproximadamente 50 % das amostras de colostro analisadas, sendo o segundo gênero predominante, com *Staphylococcus* o gênero predominante, e *E. faecalis* foi a espécie mais representativa (41,66 %). No leite maduro após 90 dias, Hekkilä e Saris (2003) encontraram *Enterococcus* spp em baixa proporção (4,3 %), corroborando *E. faecalis* como principal representante.

Importa lembrar que no presente estudo, somente os isolados que se apresentaram como gama hemolíticos e sem atividade de gelatinase foram posteriormente sequenciados, identificados e avaliados para determinadas funcionalidades. Portanto, uma vez que nos estudos publicados essa estratégia não foi utilizada, pode-se sugerir a possibilidade desse gênero ser mais freqüente do que aqui reportado.

Embora vários estudos tenham demonstrado *Enterococcus* spp. como potenciais probióticos para uso em humanos e animais, representados pelas espécies *E. faecium* e *E. faecalis*, sendo que esta última tem sido mais utilizada em ração animal. No entanto, estirpes de diferentes espécies do gênero têm sido relaciona a certas patogenidades, como infecções nosocomiais, bacteremia com ou sem casos de endocardites (MOELLERING, et al., 1974), infecções do trato urinário (MALONE et al., 1986) e/ ou septicemia neonatal (DOBSON & BAKER, 1990), além de poderem carrear genes de resistência a antibióticos (SHEPARD & GILMORE, 2002). Desta forma, a indicação do gênero deve ser vista com restrição principalmente, para indivíduos de alto risco, como crianças e idosos (ARAÚJO e Ferreira, 2013). No entanto, estudos são necessários para esclarecer o papel de tais espécies na colonização inicial do RN, pois fazem parte da ME do LH e da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis durante toda sua vida.

6.2. Resistência ao soro humano.

O teste de resistência bacteriana aos componentes imunológicos presentes no soro foi realizado seguindo a metodologia sugerida por Vesterlund et al. (2007), que analisaram a porcentagem de sobrevivência de isolados de *Lactobacillus* spp. obtidos de fezes, sangue e produtos lácteos, do

soro ativo pelo soro inativado termicamente, utilizando a técnica de plaqueamento. Estes autores encontraram que *Lactobacillus* spp. oriundos de produtos lácteos tendem a ser ligeiramente mais resistentes (91,2 %) do que os isolados de sangue (77,6 %) e das fezes (70,8 %), apesar de não haver diferença estatística entre as respostas considerando-se 5% de significância. Além disso, eles encontraram que todas estirpes analisadas foram sensíveis ao efeito bactericida do soro quando comparado ao soro inativado termicamente (56 °C/ 20 min), contradizendo os resultados deste estudo, pois tanto no teste de citometria quanto o plaqueamento, houve maior taxa de morte e menor crescimento no soro DT do que no AT, respectivamente.

A tendência do soro inativado termicamente em exercer maior efeito inibitório frente a todos os isolados analisados, inclusive patógeno e probióticos (exceto para o ensaio de citometria), com relação ao soro ativo, indica que o aquecimento potencializou de alguma forma a ação inibitória microbiana. Este comportamento não esperado pode ser relacionado ao observado por Mackowiak & Marling-Cason (1983), que procuraram relatar a importância da febre sobre o efeito benéfico da atividade antimicrobiana do soro sobre bactérias gram-negativas e positivas oriundas da superfície do corpo e clínico. Neste estudo, as bactérias foram inoculadas no soro inativado termicamente (56 °C/2h) e incubadas a 33, 37 e 41 °C. Como resultado, foi verificada correlação positiva entre temperatura e susceptibilidade ao soro, ou seja, quanto maior a temperatura, maior o efeito inibitório do soro. Apesar destes autores não conseguirem esclarecer os mecanismos responsáveis pelo relacionamento entre atividade bactericida e temperatura, eles sugerem que deve haver um importante sistema antimicrobiano endógeno, que é estimulado pelas temperaturas encontradas em episódios febris.

O ensaio por plaqueamento não possibilitou analisar o efeito bactericida do soro em termos de taxa de morte, pois as contagens após incubação foram superiores ao tempo inicial, ou seja, foi necessário analisar o efeito do soro em termos de crescimento relativo dos isolados, que corresponde o quanto os componentes do soro foram capazes de impedir o crescimento ótimo das bactérias, comparadas a um controle, neste caso, foi utilizado o próprio meio de cultura pra casa isolado (MRS para *E. faecalis* e *L. gasseri* e BHI para *C. sakazakii* e *S. aureus*).

Os resultados do plaqueamento revelaram que o grupo patógeno apresentou maior susceptibilidade ao soro AT do que o grupo probiótico, sugestivo de que os elementos do sistema imune do soro humano (proteínas do complemento) reconhecem os patógenos como organismo estranho, promovendo reação inflamatória. Já o grupo teste apresentou maior crescimento em soro AT e DT comparado ao grupo patógenos, sugerindo que são menos suscetíveis aos componentes imunológicos do soro e, portanto, menos sujeitos a produzirem exacerbada reação inflamatória em contato com o trato gastrointestinal.

O teste de citometria revelou que a taxa de morte dos probióticos em soro AT foi superior àquelas geradas pelo grupo patógeno. Este resultado contradiz os obtidos pelo plaqueamento, onde o soro AT promoveu menor crescimento relativo no grupo patógeno, sugerindo maior efeito inibitório. Apesar dos resultados estarem sendo avaliados de forma diferentes, tem-se que a literatura prioriza os resultados gerados pelo método tradicional de plaqueamento do que a técnica de citometria para ensaios de viabilidade bacteriana. Logo, pode-se sugerir que patógenos são mais susceptíveis aos componentes imunológicos do complemento sanguíneo do que bactérias probióticas, mas são necessárias maiores investigações da segurança dos *E. faecalis*, bem como abordar um maior número de representantes para ambos grupos controles, para garantir que o comportamento não foi tendencioso pelo uso de um pequeno número amostral ($N \leq 3$).

6.3. Resistência a antibióticos

Todos *E. faecalis* analisados apresentaram resistência aos antibióticos do grupo aminoglicosídeos, aqui representados pela amicacina e gentamicina. Estes antibióticos são comumente empregados no tratamento de infecções causadas por bactérias gram -, exercendo efeito bactericida. Embora sejam fármacos importantes e amplamente utilizados, os mesmos são extremamente tóxicos, limitando sua utilização.

O mecanismo de ação dos aminoglicosídeos é provocar leitura equivocada do código do RNAm e afetar a permeabilidade celular (SILVA, 2006). Todas espécies de enterococos apresentam resistência intrínseca a baixas concentrações de aminoglicosídeos (MIC 4-256 µg/mL) (CHOW, 2000).

A gentamicina é o representante dos aminoglicosídeos mais utilizado contra enterococos, apresentando MIC variando de 6 a 48 µg/mL (CHOW, 2000). O presente estudo mostrou que 10 µg deste antimicrobiano não foi efetivo contra *E. faecalis*. Riboldi (2009) encontrou apenas 22,2 % dos *E. faecalis* de diferentes alimentos resistentes, resultado similar ao encontrado por Gama (2008), em 34,7 % em amostras alimentícias e em 37,5 % de amostras de origem humana. Apesar da divergência dos resultados destes dois estudos, tem-se que estes autores testaram a sensibilidade dos isolados com 120 µg/mL da gentamicina. Logo a maior porcentagem de resistência encontrada no presente estudo pode ser sugerida pela menor concentração testada do antibiótico.

O mecanismo de resistência dos enterococos a aminoglicosídeos relaciona-se à mudança na estrutura da membrana, que leva a baixa taxa de entrada desses agentes na célula bacteriana, devido à baixa permeabilidade da parede celular a tais moléculas. A limitada absorção destas drogas nos enterococos pode estar ligada ao seu metabolismo anaeróbio facultativo (CHOW, 2000).

Na classe dos glicopeptídeos, a vancomicina é utilizada no tratamento de infecções graves por micro-organismos gram-positivos (GONZÁLES-PIÑERA et al., 1998a). Seu mecanismo de ação provem da inibição da formação da parede celular, diferindo-se de outras substâncias com ação sobre a parede celular, por não atuarem na biossíntese de enzimas produtoras desta parede, mas sim nos substratos dessas enzimas, os precursores do peptidoglicano. Atuam formando complexos com o dímero D-alanina-D-alanina (D-Ala-D-Ala), uma parte do pentapeptídeo precursor do peptidoglicano. Essa ligação leva a defeitos nas ligações entre os precursores, ocasionando perda da integridade da parede celular, lisando-a (WALSH et al., 1996).

O perfil apresentado pelos isolados frente a vancomicina (30µg) revelaram características intermediária e resistente. A grande problemática de linhagens enterococcicas resistentes a vancomicina (VRE) que colonizam um paciente, consiste em sua persistência no TGI e possibilidade de disseminação para outros pacientes (CHENG et al. 2004). Desta forma, sugere-se que testes genéticos mais aprofundados sejam realizados com os isolados deste estudo, para garantir a segurança dos mesmos, antes de indica-los como potenciais

probióticos, principalmente dos isolados EnT1, EnT3, EnM31, EnM91 e EnM92, que apresentaram perfil de resistência a esse antibiótico.

Os antibióticos pertencentes aos macrolídeos são bacteriostáticos, inibindo a síntese proteica pela ligação reversível às subunidades ribossômicas 50S de micro-organismos (GONZÁLES-PIÑERA et al., 1998b). O principal mecanismo de resistência dos Enterococos a este grupo é conferida por enzimas que metilam um resíduo de adenina na porção 23S da subunidade 50S do rRNA, impedindo a ligação do antimicrobiano (eritromicina) ao ribossomo. As espécies enterocócicas desse estudo apresentaram sensibilidade intermediária à eritromicina, corroborando resultados encontrados por Riboldi et al (2009) que analisando a susceptibilidade de estirpe de *E. faecalis* originadas de diversos alimentos encontrou 77,8 % das estirpes classificadas como sensíveis, 11,1 % com sensibilidade intermediária e também 11 % de estirpes resistentes. Trento (2012) utilizando a concentração de 5 µg deste mesmo antimicrobiano revelou que todos isolados de *Enterococcus* spp do colostro do LH foram resistentes, mas este resultado pode ter sido conferido pela baixa concentração do antibiótico.

Enterococos de origem clínica apresentam baixa suscetibilidade aos β-lactâmicos, devido principalmente à superprodução de uma proteína de ligação de penicilinas (PBP) de baixa-afinidade à penicilina, ou por mutações nas PBP que as torna menos suscetíveis a inibição pelas penicilinas. A resistência intrínseca difere entre os antibióticos desse grupo, com as penicilinas exercendo maior atividade frente a estes micro-organismos, seguidas por carbapenens e cefalosporinas, com a menor atividade (RIBOLDI, 2007). Esta informação confere com os resultados obtidos no presente trabalho, pois foi verificado que três, dos quatro representantes do grupo cefalosporinas apresentaram sinais de resistência, ao passo que apenas uma das penicilinas (oxacilina) sugeriu esta característica. A resistência intrínseca as cefalosporinas é tão elevada que o mesmo não pode ser empregado no tratamento de pacientes infectados com *Enterococcus* (SILVA, 2006).

Dentro da categoria penicilinas, ampicilina é a mais efetiva (MARKOWITZ et al., 1991), e o caráter de resistência dos isolados foi somente para o antimicrobiano oxacilina em isolados de 15 dias (50 %) e 30 dias (75 %). De acordo com as informações fornecidas pela NCCLS (2003) os enterococos

podem ser resistentes à penicilina (MIC $\geq$ 128 μ g/ mL) e à ampicilina (MIC $\geq$ 64 μ g/mL), por conta das PBPs ou, com menor frequência, devido à produção de β -lactamase. Porém para os isolados deste trabalho obtidos de LH, não foi verificada característica de resistência para ambos, mesmo utilizando concentrações bastante inferiores ao sugerido para MIC. Este resultado foi similar ao encontrado por Riboldi (2009) onde dos 27 isolados de *E. faecalis* obtidos de diferentes alimentos, 88,9 % apresentaram perfil de sensibilidade a ampicilina.

No grupo carbapenens, representado neste trabalho apenas pelo meropenem, trata-se de um antimicrobiano mais ativo frente à bactérias Gram-negativas (SILVA, 2006), porém sua atividade frente ao *E. faecalis* se mostrou bastante efetivo na concentração utilizada (10 μ g).

Desta forma, o caráter resistente a alguns antibióticos foram bastante associados com perfis de uso de baixa concentração do agente teste e de origem intrínseca, pela incompatibilidade do antibiótico com a parede celular da bactéria, que impede sua entrada e, conseqüentemente, não permite sua atuação bactericida, bem como pela presença de enzimas que interferem na ligação do antibiótico ao seu sítio de atuação. Apenas a resistência à vancomicina merece atenção especial, pois esta propriedade pode ser oriunda de caráter adquirido e, conseqüentemente, pode ser transferida horizontalmente a outras bactérias que ocupem o mesmo nicho ecológico, como o TGI.

Como sugestões para próximos estudos, várias sequências de oligonucleotídeos já foram estudadas e desenvolvidas para averiguar a presença de genes que expressam resistência a antibióticos específicos, detectável pela técnica de PCR convencional, assim é possível avaliar se o caráter resistente é decorrente de características intrínsecas ou por genes.

6.4. Resistência as barreiras do trato gastrointestinal

De acordo com a ANVISA, dentre os requisitos exigidos para alegação de probiótico, há a necessidade de uma documentação que comprove a eficácia quanto a resistência da cultura à acidez gástrica e aos sais biliares, considerados barreiras para que a estirpe atinja seu local de atuação quais

sejam, intestino delgado geralmente para espécies do gênero *Lactobacillus* ou o cólon, para *Bifidobacterium*.

A primeira barreira significativa do TGI é a acidez gástrica. Assim, para as estirpes estudadas manterem sua viabilidade junto ao alimento carreador e atingir sítios específicos do TGI, deverão resistir às condições ácidas características do suco gástrico (BERADA et al., 1991) por períodos variados. O tempo de esvaziamento gástrico varia conforme a alimentação. Para metade do esvaziamento gástrico de um RN, o tempo médio é de 28 minutos (NEWELL et al., 1993), Em crianças alimentadas com fórmulas esse tempo pode variar de 63 – 78 min para aqueles que recebem fórmula infantil (EWER et al., 1994; CAVELL, 1981). Desta forma, pode-se sugerir que o tempo de 60-90 minutos de exposição ao suco gástrico é adequado para avaliação da sobrevivência dos isolados.

Baseando-se nos critérios de Charteris et al. (1997) e Ferreira (2012), apenas EnM91 estaria apto como potencial probiótico, mas se apenas a exigência da concentração de 10^7 UFC/mL (FERREIRA, 2012) for suficiente, com 90 minutos EnT4 se enquadraria como promissor e, com 60 min, EnT2, EnT3, EnM32, EnM33 e EnM92 também atenderiam ao requisito.

Martín et al (2005) verificaram sobrevivência variada entre *Lactobacillus* spp. isolados de LH em ensaio de simulação ao modelo gastrointestinal dinâmico, onde *L. fermentum* CECT5716 foi o mais resistente, com percentual de sobrevivência de 74,37 % e, *L. gasseri* CECT5714 e CECT5715 com 30,25 % e 29,54 % mais sensíveis. Apesar desta diferença, estes autores afirmaram que todos apresentaram potencial probiótico, principalmente se forem destinados a crianças e utilizando leite como veículo, pois representam uma passagem mais curta e menos restritiva do TGI e devido a presença de componentes protetores do leite sobre LAB.

Para o gênero *Enterococcus*, Lertworapreecha et al. (2011) trabalhando com 60 isolados de *E. faecium* do TGI de frangos verificaram que apenas 25% de seus isolados foram capazes de sobreviver ao pH 2,0. Rodríguez et al. (2012) encontraram que dos 34 *Enterococcus* spp oriundo de fezes de RN saudáveis, apenas três foram capazes de resistir ao pH 3,0. Trento (2012) verificou que entre seus seis isolados oriundos do LH, apenas uma delas foi capaz de sobreviver ao pH 2,0 após 60 min de exposição.

Comparando os resultados descritos com as estirpes do presente estudo, pode-se sugerir que essas são mais resistentes do que as reportadas até o momento, uma vez que todas resistiram, em concentrações variadas, após 60 e 90 minutos de exposição ao SGA.

Ressaltamos também que este teste foi realizado de acordo com a ASM que se refere as condições gástricas para adultos, portanto, estas bactérias teriam condições melhores de sobrevivência no RN.

Sugere-se que, embora não existam parâmetros específicos para este teste, uma vez definida a bactéria a ser avaliada, concentrações em torno das que são normalmente utilizadas para veicular probióticos (10^9 UFC/g) devam ser utilizadas para inicialização desse teste. No entanto o efeito dessas concentrações elevadas no RN é desconhecido.

A resistência a bile é outra barreira que um micro-organismo precisa ultrapassar para atingir seu sítio de atuação no TGI (BRASIL, 2008). A bile lançada próxima ao íleo atua como detergente, emulsificando gorduras e facilitando a digestão. Sua ação pode afetar a concentração microbiana por causar desorganização celular, devido à composição da sua membrana, que contém lipídeos e ácidos graxos. Sua ação pode afetar a concentração microbiana por causar desorganização celular podendo influenciar a viabilidade celular bacteriana e suas interações (Valdez et al, 1997).

Alguns micro-organismos no TGI são capazes de hidrolisar as ligações amida dos sais biliares pela atividade enzimática da hidrolase de sais biliares (BHS), tais como enterococos, bacteroides, bifidobactérias e outros (HILL & DRASAR, 1968), criando sais biliares desconjugados, pela separação da glicina e taurina a partir da porção esteroide (DU TOIT et al., 1998), reduzindo assim, os efeitos tóxicos dos sais biliares conjugados, uma vez que as BHS podem atuar como proteína de choque detergente, permitindo a sobrevivência sob o estresse biliar intestinal (DE SMET et al, 1995). Diante destas informações, era esperado que os *E. faecalis* neste estudo fossem resistentes aos sais biliares 0,3 %, fato este observado para todos isolados, independente do período de obtenção.

Este resultado foi semelhante ao encontrado por Trento (2012), onde isolados de LH identificados por perfil de fermentação como *E. durans* e *E. avium*, apresentaram-se resistentes após 4h de exposição aos sais biliares sob

a mesma concentração. Da mesma forma, Rodríguez et al. (2012), trabalhando com *Enterococcus* spp. de fezes de RN, mostrou que todos seus 34 isolados foram capazes de crescer na presença de 3 g. L⁻¹ de oxgall, confirmando assim, a alta resistência aos sais biliares deste gênero.

Vale considerar que o estresse desencadeado pelos sais biliares frente às bactérias no TGI é mais complexo do que nas condições *in vitro* por pelo menos três razões: i) a concentração da bile não é estática ao longo do TGI, pois o tempo de residência da digesta varia em cada segmento; ii) os sais biliares formam micelas com fosfolípidos e, portanto, apresenta menor atividade antibacteriana do que solução artificial de sais biliares pura e; iii) *in vivo* o estresse sucessivo pela acidez gástrica e a bile podem exercer um efeito antimicrobiano superior ao desencadeado por estas mesmas barreiras isoladamente (MARTEAU et al, 1997).

Pode-se considerar também que o presente estudo busca por potenciais probióticos para RN, e nestes a velocidade de síntese dos sais biliares é menor do que no adulto e, conseqüentemente, o pool de sais biliares é reduzido. No RN normal, a concentração de sais biliares varia de 1,5 a 5,0 mmoles/L, enquanto no adulto o normal é de 7,0 a 20,0 mmoles/L. No prematuro é ainda mais baixa (1 a 2 mmoles/L) e quase sempre inferior à concentração miscelar crítica (2 mmoles/L). Outro fator que limita o pool de sais biliares é a menor eficiência da circulação entero-hepática, o que resulta em menor fluxo biliar (EUCLYDES, 2014). Desta forma, as chances dos isolados conseguirem ultrapassar por esta barreira intestinal é otimizada.

6.5. Antagonismo a patógenos.

A nomenclatura das bacteriocinas são baseadas de acordo com as espécies que as produzem, desta forma, as produzidas por *Enterococcus* spp. são denominadas enterocinas (JAVED, 2009). A ação inibitória destas proteínas é resultante da interferência na permeabilidade da membrana e das funções celulares essenciais, como replicação do DNA e translocação (CLEVELAND et al., 2001).

E. faecalis deste estudo mostraram-se bastante efetivos frente aos quatro micro-organismos indicadores analisados, porém com perfis variados

pois, de um modo geral, inibiram com maior eficiência as cepas de *Salmonella*, seguido de *E. coli*, *S. aureus* e *Listeria monocytogenes* foi o patógeno menos inibido, pois quatro (EnT1, EnM31, En91 e EnM92) dos 11 analisados, foram incapazes de inibi-lo.

Quando NaOH foi acrescentado ao teste, verificou-se a presença do NaOH 1 e 2 mol/ L próximo ao local de inoculação das estirpes enterocócicas (EnT1, EnT2, EnT4, EnM34, EnM91 e EnM92) inibiu o crescimento de *Salmonella*, indicando que a inibição observada deveu-se a ácidos orgânicos, as outras estirpes continuaram inibindo este patógeno mesmo em presença da neutralização, indicando que a inibição deveu-se a metabólitos de outra natureza (por exemplo, bacteriocinas).

Quanto a estirpe mais resistente (*Listeria*), das sete estirpes enterocócicas que promoveram inibição, quatro a natureza do inibidor deveu-se a ácidos orgânicos (EnT3, EnM32, EnM33 e EnM34). Nos outros patógenos, da mesma forma, a natureza do inibidor não foi apenas de ácidos orgânicos, mas provavelmente por outros compostos, como bacteriocinas e/ou peróxido de hidrogênio.

Maldonado-Barragán et al (2009) mostraram que a enterocina C, produzida por *E. faecalis* C901, obtido de colostro humano, é bastante ativo contra *E. faecalis* de colostro, leite humano e exudado vaginal, sugerindo que esta bacteriocina poderia impedir a colonização do intestino infantil por outras cepas de *E. faecalis* patogênicas, protegendo, assim, o RN contra algumas infecções. Rodríguez et al. (2012) mostrou que *E. faecalis* oriundos de fezes de RN saudáveis, apresentaram a enterocina AS-48, confirmando seu efeito anti-*listeria*., pois inibiu *L. innocua* BL 86/26 e *L. monocytogenes* Ohio. Trento (2012) também verificou que *Enterococcus* spp. isolados de LH foram efetivos na inibição de *Listeria monocytogenes*, mas inofensivos contra *S. aureus* e *E. coli*. Maisnier-Patin et al (1996) analisando o efeito da enterocina EFS2, produzida por *E. faecalis* de queijo francês, encontraram total eficácia inibitória deste composto a *Listeria monocytogenes*, mas apenas 26,67 % frente a *Staphylococcus aureus*. Desta forma, pode-se sugerir que as enterocinas produzidas por *E. faecalis* apresentam um bom desempenho antagônico frente a *Listeria* spp., mas agem pouco em relação a *S. aureus* e bactérias gram-negativas. Logo, o efeito antagônico encontrado neste estudo frente a

Salmonella spp. e *E. coli* pode ter sido mais influenciado por outras fatores, como ácidos orgânicos ou peróxido de hidrogênio.

7. CONCLUSÕES

Embora o objetivo do trabalho fosse isolar LAB do LH com potencial probiótico, as estratégias de isolamento das formas predominantes nas diferentes fases de lactação, resultaram no isolamento de bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* e bactérias do ácido láctico do gênero *Enterococcus* (*E. faecalis*).

Os enterococos apresentaram características probióticas interessantes, no entanto, pelo fato de todas pertencerem a espécie *Enterococcus faecalis*, a sua indicação como probiótico exige precaução.

O estágio de conhecimento sobre composição e diversidade de bactérias lácticas no TGI do RN não nos permite de forma conclusiva fazer a indicação destas estirpes enterocócicas para uso nos BLH, embora se saiba que este gênero faça parte da microbiota endógena intestinal do RN.

O presente estudo, de caráter exploratório, permitiu a pré-seleção de estirpes com melhor potencial próbiótico, tanto em sua performance quanto em seu perfil de segurança. Sugere-se que as cepas EnM32, EnM61 e EnM91, que apresentaram melhores desempenho nos testes executados, sejam estudadas de modo mais detalhado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, J. B., HWANG, H. J., PARK, J. H. Physiological responses of oxygen-tolerant anaerobic *Bifidobacterium longum* under oxygen. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 11, pp. 443–451, 2001.

AIRES, M.M. Fisiologia. 4 ed. RJ. Guanabara Koogan, 2012,1252p.

ALLEN, S. J.; WAREHAM, K.; WANG, D.; BRADLEY, C.; HUTCHING, H.; HARRIS, W.; DHAR, A.; BROWN, H.; FODEN, A.; GRAVENOR, M. B.; MACK, D. Lactobacilli and bifidobacteria in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* diarrhoea in older inpatients (PLACIDE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. **The lancet**. v.382, pp. 1249-1257, 2013.

ALMEIDA, J. A. G. A evolução dos bancos de leite no Brasil [videocassete]. Rio de Janeiro: Núcleo de Vídeo - CICT/Fundação Oswaldo Cruz; 1992.

ALVARÉZ-BARRIENTOS, A.; ARROYO, J.; CANTÓN, R.; NOMBELA, C.; SÁNCHEZ-PÉREZ, M. Application of flow cytometry to clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n.2, pp. 167-195, 2000.

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY (ASM), UNITED STATES PHARMACOPEIA. Gastric Juice. In: **Manual of methods for general bacteriology**. Washington, pp. 208-220, 1981.

AMMOR, M. S.; FLÓREZ, A. B.; MAYO, B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**. v. 24, pp. 559-570, 2007.

AMMOR, M. S.; FLÓREZ, A. B.; VAN HOEK, A. H.A.M.; REYES-GAVILÁN, C.G.D.L.R.; AARTS, H.J.M.; MARGOLLES, A.; MAYO, B. Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**. V. 14, pp. 6-15, 2008.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos**. Brasília, 159 p, 2008.

ARIEF, I. I.; WULANDARI, Z.; ADITIA, E. L.; BAIHAQI, M.; NORAIMAH, HENDRAWAN. Physicochemical and microbiological properties of fermented lamb sausages using probiotic *Lactobacillus plantarum* IIA-2C12 as starter culture. **Procedia Environmental Sciences**. v.40, pp. 352-356, 2014.

ARNOLD, L. D. W.; LARSON, E. Immunologic benefits of breast milk in relation to human milk banking. **American Journal Infectology Control** v. 21, pp. 235-242, 1993.

ARUNACHALAM, K. D. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. **Nutrition Research**, v. 19, n. 10, pp. 1559-1597, 1999

AUDISIO, M. C.; TORRES, M. J.; SABATÉ, D. C.; IBARGUREN, C.; APELLA, M. C. Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. **Microbiological Research**. v. 166, pp. 1-13, 2011.

BAUMGARTNER, A., KUEFFER, M., SIMMEN, A., GRAND, M. Relatedness of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from clinical specimens and such from food-stuffs, humans and technology. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 31, pp. 489–494, 1998.

BAWER, A. W.; KIRLY, W. M. M., SHERRIS, J. C. TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**. v.45, pp. 493-493, 1966.

BEGLEY, M.; GAHAN, C. G. M., HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 29, pp. 625-651, 2005.

BEGOVIĆ, J.; JOVČIĆ, B.; PAPIĆ-OBRAĐOVIĆ, M.; VELJOVIĆ, K.; LUKIĆ, J.; KOJIC, M.; TOPIŠIROVIĆ, L. Genotypic diversity and virulent factors of *Staphylococcus epidermidis* isolated from human breast milk. **Microbiological Research**. v. 168, pp. 77-83, 2013.

BENNO, Y.; HE, F.; HOSODA, M.; HASHIMOTO, H.; KOJIMA, T.; YAMAZAKI, K.; LINO, H.; MYKKANEN, H.; SALMINEN, S. Effects of Lactobacillus GG yogurt on human intestinal microecology in Japanese subjects. **Nutrition Today**, v. 31, pp. 333-335, 1989.

BERADA N., LEMELAND J., LAROCHE G., THOUVENOT P., PIAIA M. *Bifidobacterium* from fermented milks: Survival during gastric transit. **Journal of Dairy Science**, v. 74, pp. 409–13, 1991.

BERGER-BÄCHI, B. Resistance mechanisms of Gram-positive bacteria. **International Journal Medicine Microbiology**, v. 292, pp. 27- 35, 2002.

BIAVATI, B., SGORBATI, B., SCARDOVI, V. The genus Bifidobacterium, In: BALOWS, S., TRUPER, G.H., DWORKIN, M., HARDER, W., SCHLEIFER, K.H. (Ed.). **The prokaryotes**. New York: Springer Verlag, pp. 816-833, 1992.

BOGSAN, C. S. B.; FERREIRA, L.; MALDONADO, C.; PERDIGON, G.; ALMEIDA, S. R.; OLIVEIRA, M. N. Fermentation of unfermented milk using *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* HN019: Technological approach

determines the probiotic modulation of mucosal cellular immunity. **Food Research International**. v. 64, pp. 283-288, 2014.

BORBA, L. M. **Efeito do processo de pasteurização do leite humano no crescimento de *Bifidobacterium* spp. "IN VITRO"**. Tese (doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa – Viçosa. 2001. 121p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Dez passos para uma alimentação saudável: **Guia alimentar para crianças menores de dois anos**: um guia para o profissional da saúde na atenção básica / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2 ed. – 2 reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, 2013. 72p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Lista de alegações de propriedades funcionais aprovadas, 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acessado em 08/09/14.

BRUNO, M. E. C., MONTVILLE, T. J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, pp. 3003-3010, 1993.

BURNS, S. M.; HUYLE, S. I. Comparison of loss of serum resistance by defined lipopolysaccharide mutants and an acapsular mutant of uropathogenic *Escherichia coli* O75:K5. **Infection and Immunity**, v. 66, pp. 4244-4253, 1998.

CAMARGO, C. H.; BRUDER-NASCIMENTO, A.; LEE, S. H.. I.; FERNANDES JÚNIOR, A.; KANENO, R.; RALL, V.L.M. Prevalence and phenotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated from food in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 45, n. 1, pp. 111-115, 2014.

CAPRA, M. L.; TIBALDO, M. M.; VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J. A.; QUIBERONI, A. Technological and probiotic characterisation of *Lactobacillus casei/paracasei* strains and their phage-resistant mutants. **International Dairy Journal**. v.37, pp. 39-47, 2014.

CARROLL, M.V.; SIM, R. B. Complement in health and disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 63, pp. 965-975, 2011.

CAVELL, B. Gastric emptying in infants fed human milk or infant formula. **Acta Paediatrica Scandinavica**. v. 70, n. 5, pp. 639-641, 1981.

CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular Biology and Evolution**, V. 17, pp. 540–552, (2000).

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **International Journal of Dairy Technology**. v. 51, n. 4, pp. 123-36, 1998.

CHATEAU, N.; DESCHAMPS, A. M.; HADH-SASSI, A. Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates from a probiotic consortium. **Letters Applied Microbiology**. v.18, pp. 42-44, 1994.

CHAVES, K. S. **Avaliação de características probióticas e de segurança de *Lactobacillus* spp. isolados a partir de recém-nascidos**. Viçosa-MG: Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa; 2009. 93p.

CHENG, A. C.; HARRINGTON, G.; RUSSO, P.; LIOLIOS, L.; SPELMAN, D. Rate of nosocomial transmission of vancomycin-resistant enterococci from isolated patients. **Internal Medicine Journal**. v. 34, pp. 510-512, 2004.

CHERY, J.; DVOSKIN, D.; MORATO, F. P.; FAHOUM, B. *Lactobacillus fermentum*, a pathogen in documented cholecystitis. **International Journal os Sugery Case Reports**. v. 4, pp. 662-664, 2013.

CHIKAI, T.; NAKAO, H.; UCHIDA, K. Deconjugation of bile acids by human intestinal bacteria implanted in germ-free rats. **Lipids**. v. 22, pp. 669–671, 1987.

CHOMARAT, M.; ESPINOUSE, D. *Lactobacillus rhamnosus* septicemia in patients with prolonged aplasia receiving ceftazidime-vancomycin. **Europen Journal Clinical Microbiology Infection Disease**. v. 10, p.44, 1991.

CHOU, L.; WEIMER, B. Isolation and characterization of acid-and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**. v. 82, pp. 23– 31, 1999.

CHOW, J. W. Aminoglycoside resistance in Enterococci. **Clinical Infectioous Diseases**. v. 31, pp. 586-589, 2000.

CHUNG, H. S.; KIM, Y.B.; CHUN, S. L.; JI, G. E. Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria. **International Journal of Food Microbiology**. v.47, pp. 25 – 32, 1999.

CLEVELAND J.; MONTVILLE T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**. v. 71, pp. 1-20, 2001.

COLLINS, M. D.; GIBSON, G. R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbiota ecology of the gut. **Am. Journal of Clinical Nutrition**. v. 69, n. 5, p. 1052S-57S. 1999.

CONTADOR, R.; DELGADO-ADÁMEZ, J.; DELGADO, F. J.; CAVA, R.; RAMÍREZ, R. Effect of thermal pasteurization or high pressure processing on immunoglobulin and leukocyte contents of human milk. **International Dairy Journal**. v. 32, pp. 1-5, 2013.

COSTA, E. C. **Caracterização microbiológica e físico-química de leite humano em diferentes períodos de lactação**. Viçosa-MG: Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa; 2012. 78p.

CUNHA, L. R.; FERREIRA, C. L. L. F.; DURMAZ, E.; GOH, Y. J.; SANOZKY-DAWES, R. B.; KLAENHAMMER, T. R. Characterization of *Lactobacillus gasseri* isolates from a breast-fed infant. **Gut microbes**. v.3, n.1, pp. 15-24, 2012.

CUNHA, L. R. **Parâmetros de segurança de bactérias bífidas isoladas de recém-nascidos, com indicação de uso como probiótico em bancos de leite humano**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Viçosa; 2006. 117p.

DARILMAZ, D. O.; ASLIM, B.; SULUDERE, Z.; AKCA, G.; Influence of gastrointestinal system conditions on adhesion of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* strains to caco-2 cells. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.54, n.5, pp. 917-926, 2011.

DE GROOTE, M. A.; FRANK, D. N.; DOWELL, E.; GLODE, M. P.; PACE, N. R. *Lactobacillus rhamnosus* GG bacteremia associated with probiotic use in a child with short gut syndrome. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 24, pp. 278–280, 2005.

DELLAGIO, F.; ROISSART H.; TORRIANI, S.; CURK, M. C.; JANSSENS, D., Caracteristiques generales des bacteries lactiques, cap. I. *In: Bacteries Lactiques I* Roissar, H & Liqueur FM (eds). Loria Chemin de Saint Georges, 1994, 605p.

DELVAUX, J. C. **Comunidade Microbiana e Nitrogênio Mineral no Solo sob Florestas de Eucalipto em Função do Fluxo de Carbono para a Rizosfera**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 2012.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Microbiology**. v.23, n.1, pp. 130-135, 1960.

DE SMET, I.; HOORDE, L. V.; WOESTYNE, M. V.; CHRISTIAENS, H.; VERSTRAETE, W. Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 79, pp. 292-301, 1995.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E. J. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: De Vuyst, L.; Vandamme, E. J. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. **Microbiology, Genetics and Applications**. pp. 91-142, 1994.

DOBSON, S. R. M.; BAKER, C. J. Enterococcal Sepsis in Neonates: Features by Age at Onset and Occurrence of Focal Infection. **Pediatrics**. v. 85, n. 2, pp. 165 – 171, 1990.

DUNNE, C.; MURPHY, L.; FLYNN, S.; O'MAHONY, L.; O'HALLORAM, S.; FEENEY, M.; MORRISSEY, D.; THORNTON, G.; FITZGERALD, G.; DALY, C.; KIELY, B.; QUIGLEY, E. M. M.; O'SULLIVAN, G. C.; SHANAHAN, F.; COLLINS, J. K. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.76, pp. 279-292, 1999.

DU TOIT, M.; FRANZ, C. M. A. P.; DICKS, L. M. T.; SCHILLINGER, U.; HABERER, P.; WARLIES, B.; AHRENS, F.; HOLZAPFEL, W. H. Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. **International Journal of Food Microbiology**. v. 40, pp. 93-104, 1998.

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, n.4, pp. 1628-1635, 2001.

ELLI, M.; ZINK, R.; RYTZ, A.; RENIERO, R.; MORELLI, L. Iron requirement of *Lactobacillus* spp. in completely chemically defined growth media. **Journal of Applied Microbiology**. v. 88, pp. 695-703, 2000.

EMMETT, P. M.; ROGERS, I. S. Properties of human milk and their relationship with maternal nutrition. **Early Human Development**, v. 49, pp. 7-28, 1997.

EUCLYDES, M. P. **Nutrição do Lactente: Base científica para uma alimentação adequada**. Viçosa: 2ª ed. Viçosa, 2000. 488p.

EUCLYDES, M. P. **Nutrição do Lactente: Base científica para uma alimentação adequada**. Viçosa-MG: ed. UFV, 2014. 616p.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: <http://www.bacterio.net/index.html>. Acesso em: 15 set. 2014.

EWER, A. K.; DURBIN, G. M.; MORGAN, M. E. I.; BOOTH, I. W. Gastric emptying in preterm infants. **Archives of Disease in Childhood**. v. 71, pp. 24-27, 1994.

FAO/WHO. **Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba FAO/WHO; 2001.

FAO/WHO. **Probiotics in Food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation**. In: FAO Food and Nutrition paper 85, 2006.

FERREIRA, C. L. L. F. Grupo de Bactérias Lácticas e Aplicação Tecnológica de Bactérias Probióticas. In: Prebióticos e Probióticos – Atualização e Prospecção. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2012. 226p.

FERREIRA, C. L. L. F. Grupo de bactérias lácticas: caracterização e aplicação tecnológica de bactérias lácticas probióticas. In: Ferreira, CLLF, ed. Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção. Suprema Gráfica e Editora, Rio Branco, MG. 7-26p, 2003.

FIOCRUZ: Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano. Disponível em: <<http://www.redeblh.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=393>. Acesso em 10 Jun, 2013.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**. v.115, pp. 1749-1757, 2009.

FLEMING, H. P.; ETCHELLS, J. L.; COSTILOW, R. N. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber briner. **Applied Microbiology**. v. 30, n.6, pp. 1040-1042, 1975.

FOOKS, L. J.; GIBSON, G. R. Probiotics as modulators of the gut flora. **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. 1, pp. S39–S49, 2002.

FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H., STILES, M. E. Enterococci at the crossroads of food safety? **International of Food Microbiology**. v.47, n. 1, pp. 1-24, 1999.

FULLER, R. History and development of probiotics. In: R Fuller (Ed) **Probiotics. The Science basis**. New York. Chapman and hall, pp. 111-144, 1992.

GAGNON, M.; KHEADR, E. E.; BLAY, G. L.; FLISS, I. In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, pp. 69-78, 2004.

GAMA, B. A. **Análise da resistência antimicrobiana e de genes de virulência de *Enterococcus* spp.** Porto Alegre. Dissertação (mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

GARRITY, G. M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Vol II. In Sneath H, Mair NS, Sharpe ME, Holt JC (eds). Baltimore: Williams & Wilkins; 1986.

GILLILAND, S. E.; STALEY, T. E.; BUSH, L. J. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct. **Journal of Dairy Science**, v. 67, pp. 3045–3051, 1984.

GIBSON, G. R.; FULLER, R. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **The Journal of Nutrition**, v. 130, pp. 391S-395S, 2000.

GONZÁLES-PIÑERA, J. G.; PENIÉ, J. B.; RODRÍGUEZ, M. A.; REYES, A. M.; MORA, E.; LESCAY, M. Glicopéptidos. **Acta medica**. v. 8, n. 1, pp. 54-57, 1998a.

GONZÁLES-PIÑERA, J. G.; PENIÉ, J. B.; RODRÍGUEZ, M. A. R.; ALFONSO, P. P. P.; ALONSO, N. L. Macrólidos. **Acta medica**. v. 8, n. 1, pp. 71-74, 1998b.

GRILLO, V. T. R. S.; GONÇALVES, T. G. G.; CAMPOS JÚNIOR, J.; PANIÁGUA, N. C.; TELES, C. B. G. Incidência bacteriana e perfil de resistência a antimicrobianos em pacientes pediátricos de um hospital público de Rondônia, Brasil. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 34, n.1, pp. 117-123, 2013.

GUEIMONDE, M; LAITINEN, K; SALMINEN, S; ISOLAURI, E. Breast milk: A source of Bifidobacteria for infant gut development and maturation? **Neonatology**, v. 92, pp. 64-66, 2007.

GÚTIEZ, L.; GÓMEZ-SALA, B.; RECIO, I.; DEL CAMPO, R.; CINTAS, L. M.; HERRANZ, C.; HERNÁNDEZ, P. E. *Enterococcus faecalis* strains from food, environmental, and clinical origin produce ACE-inhibitory peptides and other bioactive peptides during growth in bovine skim milk. **International Journal of Food Microbiology**. v. 166, pp. 93-101, 2013.

HEKILLA, M. P.; SARIS, P. E. J. Inhibition os *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. **Journal of Applied Microbiology**. Oxford, v. 95, pp. 471-478, 2003.

HERRERO, M.; MAYO, B.; GONZÁLEZ, B. and SUÁREZ, J. E. Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 81, pp. 565-570, 1996.

HILL, M. J.; DRASAR, B. S. Degradation of bile salts by human intestinal bacteria. **Gut**. v. 9, n. 1, pp. 22-27, 1968.

HOLDEMAN, L. V.; CATO, E. P.; MOORE, W. E. C. Anaerobe Laboratory Manual. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, USA, 1987, 167p.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. Gram positive cocci. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Holt, J. C. Krieg, N. R., Sneath, P. H. A.; Staley, J. T. & Williams, S. T. (eds.). 9. Ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994. p. 527.

HOLZAPFEL, W. H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**. v. 24, pp. 343-362, 1995.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUIS IN'T VELD, J. H. J. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**. v. 41, pp. 85–101, 1998.

HUSAIN, S. Effect of ferric iron on siderophore production and pyrene degradation by *Pseudomonas fluorescens* 29L. **Current Microbiology**. v. 57, pp. 331–334, 2008.

JACKSON, L. C.; REYES, L. A. M.; CORDIÉS, M. L. H. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. **Acta Medica**. v. 8, n. 1, pp. 13-27, 1998.

JALDIN, M. G. M., SANTANA, R. B. **Anatomia da mama e fisiologia da lactação**. In: REGO, J.D. São Paulo: (Ed) Aleitamento Materno, Atheneu, pp. 41– 54, 2006.

JAVED, I. **Characterization of bacteriocin produced by lactic acid bacteria isolated from dairy**. Tese (Doctor of Philosophy, Ph.D) Quaid-i-Azam University, Islamabad, 2009, 167p.

JAY, J.M. Microbiologia de alimentos. 6.ed. – Portp Alegre: Artmed, pp. 30-48, 2005.

JIMÉNEZ, E.; DELGADO, S.; FERNÁNDEZ, L.; GARCÍA, N.; ALBÚJAR, M.; GÓMEZ, A.; RODRÍGUEZ, J. M. Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for

potential virulence factors. **Research in Microbiology**. v. 159, pp. 595-601, 2008.

KANEMITSU, K.; NISHINO, T.; KUNISHIMA, H.; OKAMURA, N.; TAKEMURA, H.; YAMAMOTO, H.; KAKU, M. Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci. **Journal of Microbiological Methods**. v. 47, pp. 11–16, 2001.

KATO, I.; YOKOKURA, T.; MUTAI, M. Correlation between increase in Ia-bearing macrophages and induction of T cell dependent antitumor activity by *Lactobacillus casei* in mice. **Cancer Immunology Immunotherapy**. v. 26, n. 3, pp. 215-221, 1988.

KATOH, K.; MISAWA, K.; KUMA, K.; MIYATA, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**. v. 30, pp. 3059–3066, (2002).

KLEIN, G. Antibiotic resistance and molecular characterization of probiotic and clinical *Lactobacillus* strain in relation to safety aspects of probiotics. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 8, n. 2, pp. 267- 281, 2011.

KLEIN, G.; HALLMANN, C.; CASAS, I. A.; ABAD, J.; LOUWERS, J. and REUTER, G. Exclusion of vanA, van B and vanC type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. **Journal of Applied Microbiology**. v. 89, pp. 815-824, 2000.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. v. 41, pp. 103–125, 1998.

KOLL, P.; MANDAR, R.; SMIDT, I.; HUTT, P.; TRUUSALU, K.; MIKELSAAR, R.; SHCHEPETOVA, J.; KROGH-ANDERSEN, K.; MARCOTTE, H.; HAMMARSTROM, L.; MILKELSAAR, M. Screening and Evaluation of Human Intestinal Lactobacilli for the Development of Novel Gastrointestinal Probiotics. **Current Microbiology**. v. 61, n. 6, pp. 560-566, 2010.

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. **Journal of American Dietetic Association**. v. 101, 229-238 quiz 239-241, 2001.

KLAENHAMMER T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 12, pp. 39-85, 1993.

KLARE, I.; KONSTABEL, C.; WERNER, G.; HUYS, G.; VANKERCKHOVEN, V.; KAHLMETER, G.; HILDEBRANDT, B.; MÜLLER-BERTLING, S.; WITTE,

W.; GOOSSENS, H. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 59, n. 5, pp. 900-912, 2007.

KURDI, P.; KAWANISHI, K.; MIZUTANI, K.; YOKOTA, A. Mechanism of growth inhibition by free bile acids in *Lactobacilli* and Bifidobacteria. **The Journal of Bacteriology**. v. 188, pp. 1979-1986, 2006.

LARA-VILLOSLADA, F.; OLIVARES, M.; SIERRA, S.; RODRÍGUEZ, J. M.; BOZA, J.; XAUS, J. Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. **British Journal of Nutrition**, v. 98, pp. 96-100, 2007.

LEAHY, S. C.; HIGGINS, D. G.; FITZGERALD, G. F.; VAN SINDEREN, D. A review – Getting better with bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**. v. 98, pp. 1303-1315, 2005.

LERTWORAPREECHA, L.; POONSUK, K.; CHALERMCHIAKIT, T. Selection of potential *Enterococcus faecium* isolated from Thai native chicken for probiotic use according to the in vitro properties. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**. v. 33, n. 1, pp. 9-14, 2011.

MACKAY, A. D.; TAYLOR, M. B.; KIBBLER, C. C.; HAMILTON-MILLER, J. M. *Lactobacillus* endocarditis caused by a probiotic organism. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 5, pp. 290–292, 1999.

MACKOWIAK, P. A. & MARLING-CASON, M. Hiperthermic enhancement of serum antimicrobial activity: Mechanism by which fever might exert a beneficial effect on the outcome of gram-negative sepsis. **Infection and immunity**. v. 39, n.1, pp. 38-42, 1983.

MAISNIER-PATIN, S.; FORNI, E.; RICHARD, J. Purification, partial characterization and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolates from a cheese. **International Journal of Food Microbiology**. v. 30, pp. 255-270, 1996.

MALDONADO-BARRAGÁN, A.; CABALLERO-GUERRERO, B.; JIMÉNEZ, E.; JIMÉNES-DÍAS, R.; RUIZ-BARBA, J. L.; RODRÍGUEZ, J. M. Enterocin C, a class IIb bacteriocin produced by *E. faecalis* C901, a strain isolated from human colostrum. **International Journal of Food Microbiology**. v. 133, pp. 105-112, 2009.

MALONE, D. A.; WAGNER, R. A.; MYERS, J. P.; and WATANAKUNAKORN, C. Enterococcal bacteremia in two large community teaching hospitals. **American Journal of Medicine**. v. 81, pp. 601-606, 1986.

MARKOWITZ, S. M.; WELLS, V. D.; WILLIAMS, D. S.; STUART, C. G.; COUDRON, P.; WONG, E. S. Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of β -lactamase-producing, aminoglycoside-resistant isolates of *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial agentes and chemotherapy**. v.35, n. 6, pp. 1075-1080, 1991.

MARTEAU, P.; MINEKUS, M.; HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, J. H. J. Survival of lactic acid bacteria in dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. **Journal of Dairy Sciences**. v.80, pp.1031-1037, 1997.

MARTÍN, R.; LANGA, S.; REVIRIEGO, C.; JIMÉNEZ, E.; MARÍN, M. L.; XAUS, J.; FERNÁNDEZ, L.; RODRÍGUEZ, J. M. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. **Journal of Pediatrics**. v. 143, pp. 754-758, 2003

MARTÍN, R.; OLIVARES, M.; MARÍN, M. L.; FERNÁNDEZ, L.; XAUS, J.; RODRÍGUEZ, J. M. Probiotic potential of 3 Lactobacilli strains isolated from breast milk. **Journal of Human Lactation**. v. 21, n. 1, pp. 8-17, 2005.

MARTIN, R.; HEILIG, H. G. H. J.; ZOETENDAL, E. G., JIMÉNEZ, E., FERNÁNDEZ, L., SMIDT, H., RODRÍGUES. J. M. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. **Research in Microbiology**. v. 158, n. 1, pp. 31-37, 2007.

MATHUR, S.; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review. **International journal of Food Microbiology**. v. 105, pp. 281-295, 2005.

MEDEIROS, A. W.; PEREIRA, R. I.; OLIVEIRA, D. V.; MARTINS, P. D.; D'AZEVEDO, P. A.; DER SAND, S. V.; FRAZZON, J.; FRAZZON, A. P.G. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 45, n. 1, pp. 327-332, 2014.

MESSAOUDI, S.; MANAI, M.; KERGOURLAY, G.; PRÉVOST, H.; CONNIL, N.; CHOBERT, J. M.; DOUSSET, X. *Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity. **Food Microbiology**. v. 36, pp. 296-304, 2013.

MINGEOT-LECLERCQ, M.P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P.M. Aminoglycosides: Activity and resistance. **Antimicrobial agentes and chemotherapy**. v. 43, n. 4, pp. 727-737, 1999.

MITSUOKA, T. Bifidobacteria and their role in human health. **Journal of Industrial Microbiology**. v. 6, pp. 263-268, 1990.

MOELLERING, R. C.; WATSON JR., B. K, and KUNZ, L. J. Endocarditis due to group D streptococci: comparison of disease caused by *Streptococcus bovis* with that produced by the enterococci. **American Journal of Medicine**. v. 57, pp. 239-250, 1974.

MOUGHAN, P. J.; BIRTLES, M. J.; CRANWELL, P. D.; SMITH, W. C.; PEDRAZA, M. The piglet as a model animal for studying aspects of digestion and absorption in milk-fed human infants. **World Review of Nutrition Dietetics**. v. 67, pp. 40-113, 1992.

MROZ, Z. Supplementary organic acids and their interactive effects with microbial phytase in diets for pigs and poultry. **Proc. Annual Conference Phytase in Animal Nutrition**. v.1, 2000.

MUNDY, L. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. Relationships between Enterococcal virulence and antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**. v.13, n. 4, pp. 513-522, 2000.

MURRAY, B. The life and times of the *Enterococcus*. **Clinical Microbiology Reviews**. v.3, n.1, pp. 46-65, 1990.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard — Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NCCLS. Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana: 15º Suplemento Informativo. M100-S15, v. 25, n.1, 2005.

NEUMANN, E.; FERREIRA, C. L. L. F. *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjunct: “in vitro” susceptibility to gastric juice, bile salts, lysozyme and chemotherapeutic agents. **Revista de Microbiologia**. v. 26, pp.59-65, 1995.

NEWELL, S. J.; CHAPMAN, S.; BOOTH, I. W. Ultrasonic assessment of gastric emptying in the preterm infant. **Archives of Disease in Childhood**. v. 69, pp. 32-36, 1993.

NOLTE, F. S. & CALIENDO, A. M. 2003. Molecular detection and identification of microorganisms, p.234-256. In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Tenna Pfaller M.A. & Tenover F.C. (Eds), Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. ASM Press, Washington.

OLIVEIRA, M. E. G.; GARCIA, E. F.; OLIVEIRA, C. E. V.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. M. E.; MADUREIRA, A. R. M. F.; CONCEIÇÃO, M. L.; EGYPTO-

QUEIROGA, R. C. R.; SOUZA, E. L. Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. **Food Research International**. v. 64, pp. 241-247, 2014.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n.1, 21 p., 2002.

ORLA-JENSEN, S. La classification des bactéries lactiques. **Lait**. v. 4, pp. 468–474, 1924.

ORRHAGE, K.; BRISMAR, B.; NORD, C.E. Effect of supplements with *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal microbiota during administration of clindamycin. **Microbial Ecology in Health and Disease**. v. 7, pp. 17–22, 1994.

PANT, N.; MARCOTTE, H.; BRÜSOW, H.; SVENSSON, L.; HAMMARSTRÖM, L. Effective prophylaxis against rotavirus diarrhea using a combination of *Lactobacillus rhamnosus* GG and antibodies. **BMC Microbiology**. v. 7, pp. 1471-1480, 2007.

PARVEZ, S.; MALIK, K. A.; KANG, S. Ah.; KIM, H. Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**. v. 100, n. 6, pp. 1171-1185, 2006.

PEREZ, P. F.; DORÉ, J.; LECLERC, M.; LEVENEZ, F.; BENYACOU, J., SERRANT, P. Bacterial Imprinting of the Neonatal Immune System: Lessons From Maternal Cells. **Pediatrics**. v. 119, n. 3, pp. 724 – 732, 2007.

PIARD, J. C, DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. **Lait**. v.71, pp. 525-541, 1991.

PINHEIRO, M. S. **Mastite puerperal e seus condicionantes na nutriz portadora de *Staphylococcus aureus***. Rio de Janeiro: 2008. 144p. Tese (Doutorado em Saúde da Criança e da Mulher). Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

REDONDO, N. C. **Avaliação *in vitro* de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL183 e do *Lactobacillus henveneticus* spp. jugurti 416**. Araraquara: 2008. 109p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

RIBOLDI, G. P. **Perfil de resistência antimicrobiana e análise genotípica de *Enterococcus* spp. isolados de alimentos em Porto Alegre, RS**. Porto Alegre: 2007. 121p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

RIBOLDI, G. P.; FRAZZON, J.; D'AZEVEDO, P. A.; FRAZZON, A. P. G. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp isolated from food in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 40, pp. 125-128, 2009.

RIORDAN, J. The biological specificity of breastmilk. In: RIORDAN, J.; AUERBACH, K. G. Breastfeeding and human lactation. 2nd ed. Sudbury: **Jones and Bartlett Publishers**. p. 118, 1999.

RODRÍGUEZ, E.; ARQUÉS, J. L.; RODRÍGUEZ, R.; PEIROTÉN, A.; LANDETE, J. M.; MEDINA, M. Antimicrobial properties of probiotic strains isolated from breast-fed infants. **Journal of Functional Foods**. v. 4, pp. 542-551, 2012.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; MATTO, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**. v. 84, pp. 197-215, 2000.

SAITOU, N. & NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolution**. v. 4, n. 4, pp. 406–425, 1987.

SALMINEN, S.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: Successful strains and future challenges. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v. 70, pp. 347-358, 1996.

SALMINEN, M. K.; RAUTELIN, H.; TYNKKYNNEN, S.; POUSSA, T.; SAXELIN, M.; VALTONEN, V.; JÄRVINEN, A. *Lactobacillus* bacteremia, clinical significance, and patient outcome, with special focus on probiotic *L. rhamnosus* GG. **Clinical Infectious Diseases**. v. 38, pp. 62–69, 2004.

SANDERS & KLAENHAMMER. Invited review: The scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **Journal Dairy Science**. v. 84, pp. 319 – 331, 2001.

SARANTINOPOULOS, P.; ARDRIGHETTO, C.; GEORGALAKI, M. D.; REA, M. C.; LOMBARDI, A.; COGAN, T. M.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. **International Dairy Journal**. v. 11, pp. 621-647, 2001.

SCHLEIFER, K. H. & KLIPPER-BÄLZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. Rev. as *Enterococcus faecalis* comb.nov. and *Enterococcus faecium* comb.nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 34, pp 31-34, 1984.

SEMEDO, T.; SANTOS, M. A.; MARTINS, P.; LOPES, M. F. S.; MARQUES, J. J. F.; TENREIRO, R.; CRESPO, M. T. C. Comparative study using type strains

and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in Enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 6, pp. 2569-2576, 2003.

SHAH, N. P.; WARNAKULSURIYA, E.; LANKAPUTHRA, E. V. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. In yogurt. **International Dairy Journal**. v.7, pp. 349-356, 1997.

SHEPARD, B. D. & GILMORE, M. S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes Infection**. v. 4, pp. 215 – 224, 2002.

SHERMAN, M. P. New concepts of microbial translocation in the neonatal intestine: Mechanisms and prevention. **Clinics in perinatology**. v. 37, n.3, pp. 565-579, 2010.

SILVA, P. Conceitos básico da antibioticoterapia. In: SILVA, P. Farmacologia, 7 ed., - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SILVA, E. R.; ABDALLAH, V. O.; OLIVEIRA, A. M. M. Qualidade microbiológica do leite humano ordenhado no domicílio: eficácia de uma ação educativa. In 5ª Semana Acadêmica. Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

SOLÍS, G.; REYES-GAVILAN, D. L.; FERNÁNDEZ, N.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. **Anaerobe**. v.16, pp. 307-310, 2010.

SU, Y. A.; SULAVIK, M. C.; HE, P.; MAKINEN, K. K.; MAKINEN, P. L.; FIEDLER, S. WIRTH, R. AND CLEWELL, D.B. Nucleotide Sequence of the Gelatinase Gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. **Infection and Immunity**. v. 59, pp. 415-420, 1991.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram positive bacteria. **Bacteriological Reviews**. v. 40, pp. 722-756, 1976.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; and KUMAR, S. (2013) **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0**. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

TANNOCK, G. W.; COOK, G. Enterococci as members of the intestinal microflora of humans. In: Gilmore, M. S. (Ed.), *The Enterococci – Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*, Washington DC: ASM Press, pp. 101-132, 2002.

TAYLOR, P. W. Measurement of the bactericidal activity of serum. In M. Sussman (ed.). The virulence of *Escherichia coli*. Academic Press Ltd., London, England. pp. 445–457, 1985.

TAVARES, W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfecciosos. São Paulo: Atheneu, 1990.

TEIXEIRA, L. M. & FACKLAM, R.R. *Enterococcus*. In: MURRAY, P.R. et al (eds.). **Manual of Clinical Microbiology**. 8. Ed. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, pp. 422-433, 2003.

TESHIMA, E. **Seleção de bactérias bifidas isoladas de lactentes e modulação da microbiota intestinal por meio de probióticos, prebióticos e simbióticos**. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001. 113p.

TOURÉ, R.; KHEADR, E.; LACROIX, C.; MORONI, O.; FLISS, I Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 95, pp. 1058-1069, 2003

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. Ed. Artes Médicas Sul, 6aed, Porto Alegre, 2000.

TRENTO, F. K. H. S. **Leite Humano como fonte de bactérias láticas produtoras de bacteriocinas e com potencial probiótico**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012. 83p.

VALDEZ, G. F.; MARTOS, G.; TARANTO, M. P.; LORCA, G. L.; OLIVER, G.; HOLGADO, A. P. R. Influence of bile on β -galactosidase activity and cell viability of *Lactobacillus reuteri* when subjected to freeze-drying. **Journal Dairy Science**. v. 80, pp. 1955-1958, 1997.

VARAVALHO, M. A., THOMÉ, J. N., TESHIMA, E. Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças Gastrointestinais. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 29, n. 1, pp. 83-104, jan./jun. 2008.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**. v. 18, pp. 714-728, 2008.

VELASCO, R. G.; ACOSTA, K.; ADRIANA, G.; CHÁVEZ, M. Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de *Enterococcus faecalis*. **Lab Acta**. v. 14, n. 1, pp. 9-10, 2002.

VESTERLUND, S.; VANKERCKHOVEN, V.; SAXELIN, M.; GOOSSENS, H.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: Presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. **International Journal of Food Microbiology**. v. 116, pp. 325–331, 2007.

WALSH, C.T.; FISHER, S. L.; PARK, I. S.; PRAHALAD, M.; WU, Z. Bacterial REsistance to vancomycin: five genes and one missing hydrogen bond tell the story. **Chemistry & Biology**. v.3, n. 1, pp.21-28, 1996.

WILLIAMSON, R.; LE BOUGUÉNEC, C.; GUTMANN, L.; HORAUD, T. One or two low affinity penicillin-binding proteins may be responsible for the range of susceptibility of *Enterococcus faecium* to benzylpenicillin. **Journal of General Microbiology**. v. 131, pp. 1933-1940, 1985.

WRIGHT, A. V. Regulating the safety of probiotics – The European Approach. **Current Pharmaceutical Design**. v. 3, pp. 17-23, 2005.

WORD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The optimal duration of exclusive breastfeeding: report of an expert consultation. Geneva; 2001.

YASUI, H. et al. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, Dordrecht, v. 76, n. 1, pp. 383-389, 1999.

ZACARÍAS, M. F.; BINETTI, A.; LACO, M.; REINHEIMER, J. VINDEROLA, G. Preliminary technological and potential probiotic characterization of bifidobacteria isolated from breast milk for use in dairy products. **International Dairy Journal**. v. 21, pp. 548-555, 2011.

ANEXOS

Anexo A: Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – UFV



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário(a), em uma pesquisa. Leia cuidadosamente o que segue e me pergunte sobre qualquer dúvida que você tiver. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir e, no caso, aceite fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que consta em duas vias. Uma via pertence a você e a outra ao pesquisador responsável. Em caso de recusa você não sofrerá nenhuma penalidade.

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem por finalidade encontrar espécies bacterianas do leite humano seguras e com potencial probiótico, para serem reintroduzidos nos leites depositados nos Bancos de Leite Humano;
2. Ao participar desse trabalho estarei contribuindo para melhorar a qualidade dos leites oferecidos nos Bancos de Leite Humanos que serão posteriormente ofertados à recém-nascidos desfavorecidos de receberem o leite de sua própria mãe;
3. Terei que doar para a realização dessa pesquisa, o seguinte material biológico: 300 mL de sangue ;
4. A minha participação como voluntário deverá ter a duração de até 30 minutos;
5. Durante a execução do projeto poderão ocorrer riscos de constrangimento devido à coleta de informações de dados pessoais como nome, idade, tipo sanguíneo, que serão atenuados com o devido sigilo de todos os dados informados e, no momento da coleta de sangue, poderá haver alguma dor decorrente da punção da pele. Complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente de pequeno porte. Se houver pequena perda de sangue da veia no local da punção geralmente há um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. A coleta de sangue será realizada em local apropriado e por pessoa especializada, para que no caso de algum tipo de reação, como tonturas ou desmaios, a pessoa será atendida prontamente por um profissional da área. Ao mesmo tempo estarei recebendo como benefícios pela minha participação café e biscoitos.
6. Os materiais empregados na coleta serão descartáveis e de uso individual;
7. Os procedimentos aos quais serei submetido não provocarão danos morais, físicos, financeiros ou religiosos e minha identidade será mantida sob sigilo;
8. Não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo;

9. Poderei deixar de participar do estudo a qualquer momento sem prejuízo do meu tratamento.
 10. Meu nome será mantido em sigilo, assegurado assim a minha privacidade e se desejar, deverei ser informado dos resultados dessa pesquisa;
 11. Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos poderei entrar em contato com a equipe científica pelo telefone (31) 3899 2959 ou (31) 9132 2406;
- OBS: Este TCLE foi redigido em conformidade com os requisitos da Resolução CNS 466 de 2012

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar do estudo “CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS E DE SEGURANÇA DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO ISOLADAS DE LEITE HUMANO COM POTENCIAL PARA USO EM BANCOS DE LEITE”, na qualidade de voluntário (a).

Viçosa, _____ de _____ de 2014.

Assinatura do voluntário

Atenciosamente

Michele Harumi Omura
Departamento de Tecnologia de Alimentos
michele_hom@hotmail.com

Responsáveis pela pesquisa:

Nome: Michele Harumi Omura

Endereço: Av. P.H. Rolfs, s/n, Campus Universitário – Viçosa (MG), CEP: 36570-900 – Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO)

Endereço particular: Av. Bernardes Filho, 162/302, Lurdes – Viçosa (MG), CEP: 36570-000

Telefone: (31) 3899-2959 ou (31) 3899-2960

Telefone particular: (31) 9132-2406

Nome: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira

Endereço: Av. P.H. Rolfs, s/n, Campus Universitário – Viçosa (MG), CEP: 36570-900 – Departamento de Tecnologia em Alimentos

Endereço particular: Travessa Irmã Francisca, 31/903, Clélia Bernardes – Viçosa (MG), CEP: 36570-000

Telefone: (31) 3899-1756

Telefone particular: (31) 8881-6535

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa
– CEP/UFV

Avenida Peter Henry Rolfs, s/n, prédio Arthur Bernardes, piso inferior, Campus
Universitário – Viçosa (MG) – CEP: 36570-900

Telefone: (31) 3899-2492; correio eletrônico: cep@ufv.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
VIÇOSA - UFV



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Características Probióticas E De Segurança De Bactérias Do Ácido Lático Isoladas De Leite Humano

Pesquisador: Célia Lúcia de Lucena Fortes Ferreira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 28002414.1.0000.5153

Instituição Proponente: Departamento de Tecnologia de Alimentos

Patrocinador Principal: Departamento de Tecnologia de Alimentos

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 663.168

Data da Relatoria: 03/06/2014

Apresentação do Projeto:

A partir de isolados de bactérias do ácido lático do leite humano, será verificada a segurança destes isolados pelo teste de resistência ao soro humano. Para tanto, será necessário realizar a coleta de 300 mL de sangue de indivíduos saudáveis para obtenção do soro, que será o material de estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar os aspectos funcionais e de segurança de bactérias lácticas (BAL) isoladas do leite humano em diferentes fases de maturação.

Objetivo Secundário:

A. Selecionar BAL isoladas do leite humano em diferentes fases de lactação. B. Determinar a segurança das BAL selecionadas e potencialmente probióticas por meio dos testes da atividade hemolítica, gelatinase e resistência ao soro humano. C. Determinar a funcionalidade das BAL selecionadas por meio da avaliação de resistência a sais biliares, suco gástrico e antagonismo a patógeno.

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, prédio Arthur Bernardes, piso inferior
Bairro: campus Viçosa CEP: 36.570-000
UF: MG Município: VIÇOSA
Telefone: (31)3899-2492 Fax: (31)3899-2492 E-mail: cep@ufv.br

Continuação do Parecer: 003.168

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequadamente descritos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Atende aos critérios do CEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Atende aos critérios do CEP.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma pendência.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Ao término da pesquisa é necessária a apresentação do Relatório Final e após a aprovação desse, deve ser encaminhado o Comunicado de Término dos Estudos.

Projeto analisado durante a 3ª reunião de 2014.

VICOSA, 27 de Maio de 2014.

Assinado por:
Patrícia Aurélio Del Nero
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, prédio Arthur Bernardes, piso inferior
Bairro: campus Viçosa CEP: 36.570-000
UF: MG Município: VICOSA
Telefone: (31)3899-2402 Fax: (31)3899-2402 E-mail: cep@ufv.br

Página 03 de 03

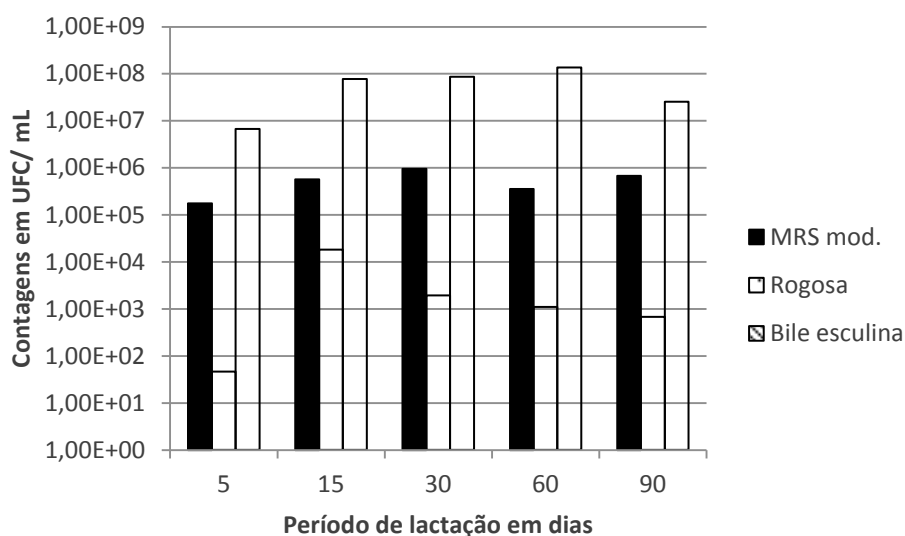
Anexo B: Resultados dos plaqueamentos de Costa (2012).

Contagens do cultivo do leite humano no meios MRS e Rogosa nos diferentes tempos analisados, expressos em UFC/ mL.

		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	TOTAL	MÉDIA
T5	MRS	4,40E+01	1,10E+02	7,90E+03	1,52E+03	1,35E+02	0,00E+00	9,30E+02	1,10E+05	4,20E+04	6,90E+03	6,55E+03	1,76E+05	1,60E+04
	ROG	2,70E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,50E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,25E+01	4,60E+01	4,18E+00
T15	MRS	1,05E+02	1,21E+02	1,48E+03	1,30E+03	2,02E+04	2,36E+05	1,28E+03	1,04E+05	1,60E+05	6,80E+02	4,70E+04	5,72E+05	5,20E+04
	ROG	2,80E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,50E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,79E+04	0,00E+00	1,44E+02	1,81E+04	1,64E+03
T30	MRS	8,75E+02	1,32E+02	1,96E+04	4,00E+03	5,10E+05	1,67E+02	4,75E+03	1,11E+04		8,45E+02	4,05E+05	9,56E+05	9,56E+04
	ROG	2,70E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,67E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00		0,00E+00	0,00E+00	1,94E+03	1,94E+02
T60	MRS	3,40E+02	1,80E+02	7,60E+02	5,95E+02	4,50E+03	2,95E+05	4,90E+04	3,50E+03		0,00E+00	2,50E+02	3,54E+05	3,54E+04
	ROG	1,49E+02	0,00E+00	2,80E+02	0,00E+00	4,40E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00		6,25E+02	0,00E+00	1,10E+03	1,10E+02
T90	MRS	1,16E+03	5,40E+03	6,00E+02	2,60E+05	5,90E+04	3,47E+05	8,20E+03	1,90E+02		0,00E+00	2,70E+02	6,82E+05	6,82E+04
	ROG	2,63E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00		4,10E+02	0,00E+00	6,73E+02	6,73E+01

T5, T15, T30, T60 e T90 correspondem ao período de lactação do leite humano. Meios de cultivos utilizado: MRS (de Man, Rogosa and Sharpe Medium) e ROG (Rogosa). M1-M11 represantam as 11 mães recrutadas para doações dos leites analisados.

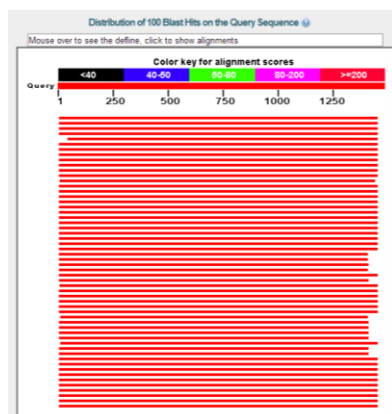
Predominância das LAB do leite humano, expressos em UFC/ mL para os meios seletivos: MRS (*Bifidobacterium* spp.), Rogosa (*Lactobacillus* spp.) e Bile Esculina (*Enterococcus* spp.).



Anexo C: Alinhamento das sequências do gene 16S do rDNA.

Resultado do BLAST do sequenciamento do gene 16S rDNA, analisados por similaridade nas sequências depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Amostra 1: *Enterococcus faecalis*

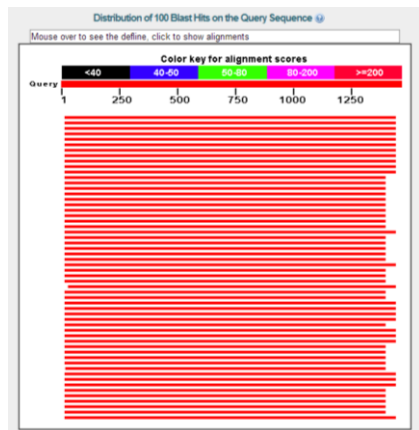


Sequência original:

```
NNNNATCNCCTCACTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAAGGTTACCTACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAA
CGTATTCACCGCGGCGTGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTACGAGAGAGCTTTAAGAGATTTGCAT
GACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGTAATTTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGT
CACCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACTCTCACGACACGAGCTGACGACA
ACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCGAAGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAACAGGATGTCAAGACCTGGTAGCAGGTTCTTCGCGAATGCTTAGAATTA
AACCACAGTGCTCCACCGATTGGGCGGAGCCCCAGTCAAATCCTGTGAGTTACAACCTGAGCGGTAGTACTCCCCAGCAGCAGGAGTGATTAATGCATTTGAATGC
AGCACTGAAGGGCGGAAACCTCCAACACGAAGCACTCATCGTGTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTCGAGCCTCAGCGT
CAGTTACAGACCAGAGAGCCGCTTCGCCACCGGTGTTCTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCACACTCTCTCTTCTGCACTCAAGTCTCC
CAGTTTCCAATGACCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACC
TACGTATTACCGCGACTGCTGGCACGTAGTTTACCGGTGGCTTTTCTCGCTTAGATACCGTCAAGGGACGTTTCAGTTACTAACGTCCTTGTCTTCTTAACAACAGA
GTTTTACGATCCGAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTGAGACTTTTGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGT
GTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATC
AGCGACACCCGAAAGCGCTTTCACCTCTATGCCATGCGGCATAAACTGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTATCCCCCTCTGATGGGTAGGTTACCC
ACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCCTCTTTCCAATTGAGTGCAAGCACTCGGGAGGAAAGAAGCGCTCGACTTCCANNTTAAGNNNNNNNNNNANNNNNNN
```

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2468	2468	97%	0.0	98%	NR_115765.1
☐	Enterococcus faecalis V583 strain V583 16S ribosomal RNA, complete sequence	2462	2462	97%	0.0	98%	NR_074637.1
☐	Enterococcus faecalis strain LMG 7937 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2455	2455	97%	0.0	97%	NR_114782.1
☐	Enterococcus faecalis strain JCM 5803 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2436	2436	97%	0.0	97%	NR_040789.1
☐	Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2401	2401	94%	0.0	98%	NR_113901.1
☐	Enterococcus rivorum strain S299 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2342	2342	97%	0.0	96%	NR_117043.1
☐	Enterococcus moraviensis strain NBRC 100710 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2270	2270	97%	0.0	95%	NR_113937.1
☐	Enterococcus haemoperoxidus strain NBRC 100709 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2270	2270	97%	0.0	95%	NR_113936.1
☐	Enterococcus rotai strain CCM 4630 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2263	2263	97%	0.0	95%	NR_108137.1

Amostra 2: *Staphylococcus epidermidis*

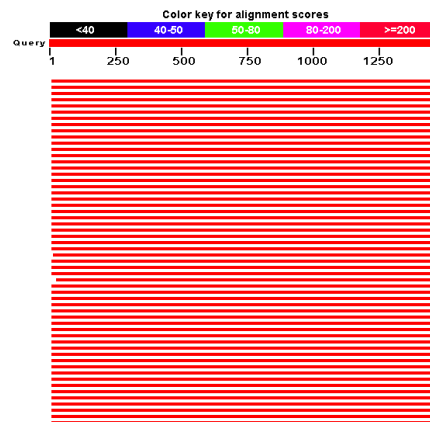


Sequência original:

```
NNNNNAGNNGTCNNNTACGACGGCTAGCTCCAATGGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAAC
GTATTCACCGTAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATATAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAACAGAACTTTATGGGATTGCTTGAC
CTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAATCATAAGGGGCGATGATGATTTGACGTCATCCCACCTTCCTCCGGTTTGTAC
CGGCAGTCAACTTAGAGTGCCCACTTAATGATGGCACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACC
ATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGGAAAACTCTATCTCTAGAGGGGTACAGAGGATGTCAAGATTGGTAAGGTTCTTGCGCGCTAGCTTCGAATTAAAC
CACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCGTCAAATTCCTTTGAGTATCAACCTTGCGGTGCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAG
GGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTATCCCCACGCTTTCGCACATCAGCGTCAGTTACAGA
CCAGAAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTGCGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCAA
TGACCCTCCACGGTTGAGCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAACCGCCTACGCGCGCTTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACC
GCGGCTGCTGCGACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGATTAGGTACCGTCAAGACGTGCATAGTTACTTACACATTTGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTACGATCCGA
AGACCTTCATCACTCACGCGGCTTGTCCGTGAGGCTTTGCGCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGT
GTGCGCGATCACCTCTCAGGTGCGGTACGCATCGTTGCCTTGGAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCGGCGCGGATCCATCTATAAGTGACAGCAAAC
CGTCTTTCATCTATTGAACCATGCGGTTCAATATATTATCCGGTATTAGTCCGGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCACCCGT
CCGCCGCNANNTNGNGNANGANNACAGCTCCTCGTCTGCTCGCTCGACTTGCANTATTNNGAACCGCCCTNNNNNTN
```

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Staphylococcus epidermidis strain Fussel 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2531	2531	97%	0.0	99%	NR_036904.1
☐	Staphylococcus epidermidis RP62A strain RP62A 16S ribosomal RNA, complete sequence	2529	2529	97%	0.0	99%	NR_074995.1
☐	Staphylococcus epidermidis strain NBRC 100911 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2527	2527	97%	0.0	99%	NR_113957.1
☐	Staphylococcus capitis subsp. urealyticus strain MAW 8436 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2492	2492	97%	0.0	98%	NR_027519.1
☐	Staphylococcus caprae strain ATCC 35538 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2492	2492	97%	0.0	98%	NR_024665.1
☐	Staphylococcus saccharolyticus strain JCM 1768 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2486	2486	97%	0.0	98%	NR_113405.1
☐	Staphylococcus saccharolyticus strain S 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2486	2486	97%	0.0	98%	NR_029158.1
☐	Staphylococcus capitis subsp. capitis strain JCM 2420 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2481	2481	97%	0.0	98%	NR_113348.1
☐	Staphylococcus capitis strain LK 499 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2481	2481	97%	0.0	98%	NR_036775.1
☐	Staphylococcus caprae strain DSM 20608 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2471	2471	97%	0.0	98%	NR_119252.1
☐	Staphylococcus petrasii subsp. petrasii strain CCM 8418 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2431	2431	97%	0.0	97%	NR_118450.1

Amostra 3: *Staphylococcus epidermidis*

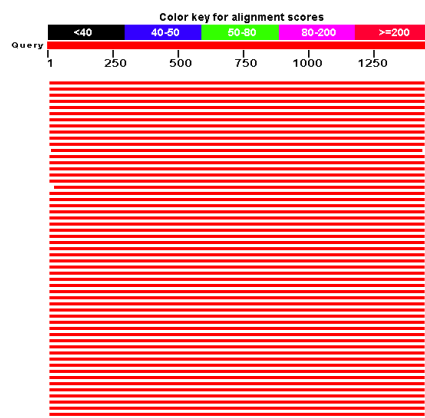


Sequência original:

```
CNNAANNNTNTCACCTTCGACGGCTAGCTCCAAATGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGA
ACGTATTCACCGTAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATATAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAAGTGAACAACCTTTATGGGATTTGCT
TGACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTATTGTCCATTGTAGCAGTGTGTAGCCCAAATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTT
GTCACCGGCAGTCAACTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGAC
GACAACCATGCACCACTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGGATANNAGACTCTATCTCTAGAGGGGATCAGAGGGATGTGCAAGATTTNGTAAGTTTCATGCG
CGCTAGCTTCGAATCTAAACCACATGCTCCTAACAGCTGGTGCGGGTCCCCGNTTTCAAATTCCTTTGTAGTTTCAACCTTGCGGGTCATACTCCCCAGTCTGTG
AGTGCTTAATCAGGCATTAGCTGCAGCACTAAGGAGAGGAAACCCCCCTAACACATAGCACTCATCCGCTTACGAGATGTGGGACGAACAGGATATCTAATCCTG
TCTGATCCCCACGCTATTTCGCACATCAGCGTCAGATACAGACCAGAAAAATCGCCTTCGCCACTCGTGTTCTCCATATCTCTGCGCATGTCACCGCTACACATGG
AATTCACCTCTCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCAATGACCCCTCCACGGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCCTACGCGCGCT
TTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGATTAGGTACCGTCAAGACGTGCATA
GTTACTTACACATTTGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTACGATCCGAAGACCTTCATCACTCACGCGGCGTTCGCTCCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGGAAGATT
CCCTACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCTTGGTAAGCCGTTACC
TTACCAACTAGCTAATGCGGCGCGGATCCATCTATAAGTGACAGCAAAACCGTCTTCACTATTGAACCATGCGGTTCAATATATTATCCGGTATTAGCTCCGGTT
TCCCGAAGTTATCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACGTACAGAGGAGCAAGCTCCTCGTCTGTTTNGCNNN
```

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Staphylococcus epidermidis strain Fussel 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2353	2353	98%	0.0	96%	NR_036904.1
☐	Staphylococcus epidermidis strain NBRC 100911 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2350	2350	98%	0.0	96%	NR_113957.1
☐	Staphylococcus epidermidis RP62A strain RP62A 16S ribosomal RNA, complete sequence	2348	2348	98%	0.0	96%	NR_074995.1
☐	Staphylococcus capitis subsp. urealyticus strain MAW 8436 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2314	2314	98%	0.0	96%	NR_027519.1
☐	Staphylococcus caprae strain ATCC 35538 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2314	2314	98%	0.0	96%	NR_024665.1
☐	Staphylococcus capitis subsp. capitis strain JCM 2420 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2309	2309	98%	0.0	96%	NR_113348.1
☐	Staphylococcus saccharolyticus strain JCM 1768 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2309	2309	98%	0.0	96%	NR_113405.1
☐	Staphylococcus capitis strain LK 499 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2309	2309	98%	0.0	96%	NR_036775.1
☐	Staphylococcus saccharolyticus strain S 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2305	2305	98%	0.0	96%	NR_029158.1
☐	Staphylococcus caprae strain DSM 20608 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2292	2292	98%	0.0	96%	NR_119252.1

Amostra 4: *Staphylococcus lugdunensis*

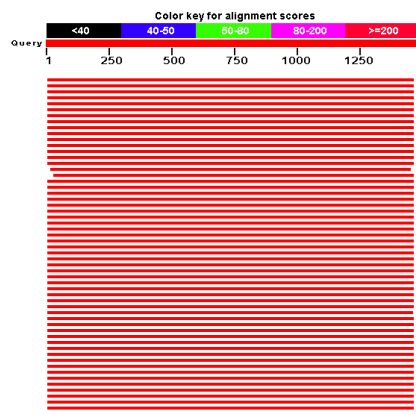


Sequência original:

```
CNNNNNTNGTCNCCTTCGACGGCTAGCTCCAAATGGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAA
CGTATTCACCGTAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGTCGAGTTGCGAGACTACAATCCGAACTGAGAACAACCTTTATGGGATTTGCTT
GACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTT
GTCACCGGCAGTCAACTTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGAC
GACAACCATGCACCACCTGTCACCTTGTCCCCGAAGGGGAAAAATCTCTATCTTCTAGAGCGGTCAAAGGATGTCAAGATTTGGTAAGGTTTCATCGCGCTAGCTT
CGAACTAAACCACATGCTCCACCAGCTTGTGCGGGTCCCGTCAATTCCCTTGAGTTTCAACCCGCGGTCTGACTCCCCAGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCT
GCAGCACTAAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGATCCCCACGCTTTCGCACATCA
GCGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTGCGCATTTACCGCTACACATGGAATTCACCTTTCCTCTCTGCACTCAAG
TTTTCCAGTTTCCAATGACCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAACCGCCTACGCGCGCTTACGCCCAATAATCCGGATAACGCTTG
CCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGTAGTTAGCCGTGGCTATCNTGATTAGGTACCGTCAAGACGTGCACAGTTACTTACAGTTCCTTCTCCCTAATA
ACAGAGTTTTACGATCCTAAGACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTGAGGCTTTCGCCCATTCGCGAAGATTCCCTACTGCTGCCCTCCGAGGAGTCTG
GACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGCGCTACGTATCGTTGCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCACTAGCTAATACGGCGCGGGTC
CATCTATAAGTGATAGCAAAACCATCTTCACTATTGAACCATGCGGTTCAACATATTATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCGAAGTTGTCACGCTTATAGGTAG
GTTACCCACGTGTTACTACCCGTCCGCCGCTAACGTCAAAGGAGCAAGCTCCTATCTGTTGCTGCACTTGCAGTATTAAAGCNGGCCNNATGNGNNNA
```

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Staphylococcus lugdunensis strain ATCC 43809 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2571	2571	97%	0.0	99%	NR_024668.1
☐	Staphylococcus lugdunensis HKU09-01 strain HKU09-01 16S ribosomal RNA, complete sequence	2566	2566	97%	0.0	99%	NR_074868.1
☐	Staphylococcus devriesei strain KS-SP_60 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2495	2495	97%	0.0	98%	NR_116627.1
☐	Staphylococcus petrasii subsp. petrasii strain CCM 8418 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2494	2494	97%	0.0	98%	NR_118450.1
☐	Staphylococcus haemolyticus strain JCM 2416 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2490	2490	97%	0.0	98%	NR_113345.1
☐	Staphylococcus haemolyticus JCSC1435 strain JCSC1435 16S ribosomal RNA, complete sequence	2488	2488	97%	0.0	98%	NR_074994.1
☐	Staphylococcus pasteurii strain ATCC 51129 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2479	2479	97%	0.0	98%	NR_024669.1
☐	Staphylococcus hominis subsp. hominis strain DM 122 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2475	2475	97%	0.0	98%	NR_036956.1
☐	Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus strain GTC 1228 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2473	2473	97%	0.0	98%	NR_041323.1
☐	Staphylococcus warneri SG1 strain SG1 16S ribosomal RNA, complete sequence	2462	2462	97%	0.0	98%	NR_102499.1

Amostra 5: *Staphylococcus lugdunensis*

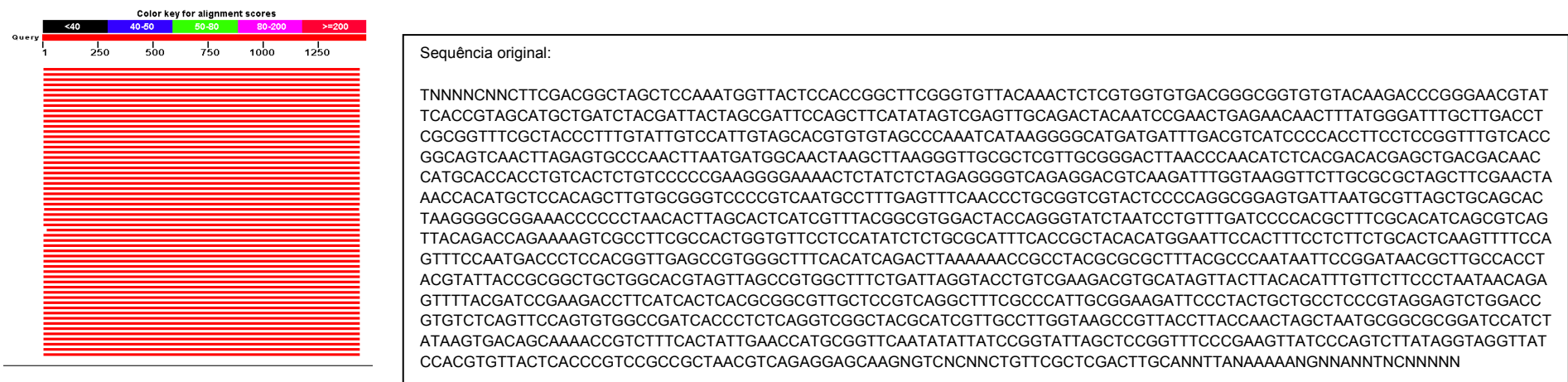


Sequência original:

```
CNNNAANNNTNTGTCCACTTCGACGGCTAGCTCCAAATGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGG
GAACGTATTCACCGTAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAACCTGAGAACAACCTTTATGGGATTG
CTTGACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGG
TTTGTACCGGGCAGTCAACTTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTG
ACGACAACCATGCACACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGGAAAAACNNNNNTCTATCTTCTAGAGCGGTCAAAGGATGTCAAGATTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
GCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCTGACTCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTA
GCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGATCCCCACGCTTTCGCACAT
CAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTCTCTCCATATCTCTGCGCATTTACCGCTACACATGGAAATTCACCTTTCCTCTTCTGCACT
CAAGTTTTCCAGTTTCCAATGACCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTACGCGCGCTTTACGCCAATAATTCGGGATAAC
GCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGATTAGGTACCGTCAAGACGTGCACAGTTACTTACAGTGTGTTCTTCCC
TAATAACAGAGTTTTACGATCCTAAGACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTGCGCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCCTCCCGTAGGA
GTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGGCTACGTATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATACGGCGC
GGGTCCATCTATAAGTGATAGCAAAACCATCTTTCATATTGAACCATGCGGTTCAACATATTATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCGAAGTTGTCCAGTCTTATA
GGTAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCGCGCGTAACTGCAAGGAGCAAGCTCCTTATCTGTTGCTCGACTTGCATNTATNAGGNANNCCCANNNNNN
NN
```

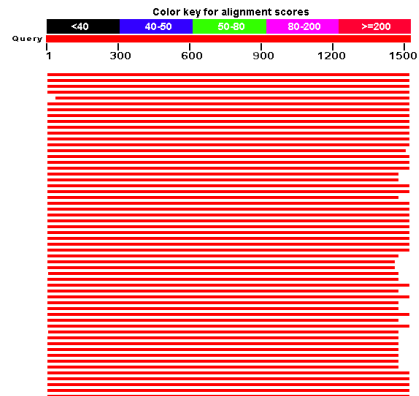
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Staphylococcus lugdunensis strain ATCC 43809 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2603	2603	98%	0.0	99%	NR_024668.1
☐	Staphylococcus lugdunensis HKU09-01 strain HKU09-01 16S ribosomal RNA, complete sequence	2597	2597	98%	0.0	99%	NR_074868.1
☐	Staphylococcus devriesei strain KS-SP_60 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2527	2527	98%	0.0	98%	NR_116627.1
☐	Staphylococcus petrasii subsp. petrasii strain CCM 8418 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2525	2525	98%	0.0	98%	NR_118450.1
☐	Staphylococcus haemolyticus strain JCM 2416 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2521	2521	98%	0.0	98%	NR_113345.1
☐	Staphylococcus haemolyticus JCSC1435 strain JCSC1435 16S ribosomal RNA, complete sequence	2519	2519	98%	0.0	98%	NR_074994.1
☐	Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus strain GTC 1228 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2512	2512	98%	0.0	98%	NR_041323.1
☐	Staphylococcus pasteurii strain ATCC 51129 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2510	2510	98%	0.0	98%	NR_024669.1
☐	Staphylococcus hominis subsp. hominis strain DM 122 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2508	2508	98%	0.0	98%	NR_036956.1
☐	Staphylococcus warneri SG1 strain SG1 16S ribosomal RNA, complete sequence	2494	2494	98%	0.0	98%	NR_102499.1

Amostra 6: *Staphylococcus epidermidis*



	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Staphylococcus epidermidis strain NBRC 100911 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2534	2534	97%	0.0	99%	NR_113957.1
☐	Staphylococcus epidermidis strain Fussel 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2532	2532	97%	0.0	99%	NR_036904.1
☐	Staphylococcus epidermidis RP62A strain RP62A 16S ribosomal RNA, complete sequence	2527	2527	97%	0.0	99%	NR_074995.1
☐	Staphylococcus capitis subsp. urealyticus strain MAW 8436 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2505	2505	97%	0.0	98%	NR_027519.1
☐	Staphylococcus capitis subsp. capitis strain JCM 2420 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2494	2494	97%	0.0	98%	NR_113348.1
☐	Staphylococcus caprae strain ATCC 35538 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2494	2494	97%	0.0	98%	NR_024665.1
☐	Staphylococcus capitis strain LK 499 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2494	2494	97%	0.0	98%	NR_036775.1
☐	Staphylococcus saccharolyticus strain JCM 1768 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2488	2488	97%	0.0	98%	NR_113405.1
☐	Staphylococcus saccharolyticus strain S 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2484	2484	97%	0.0	98%	NR_029158.1
☐	Staphylococcus caprae strain DSM 20608 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2483	2483	97%	0.0	98%	NR_119252.1

Amostra 7: *Enterococcus faecalis*

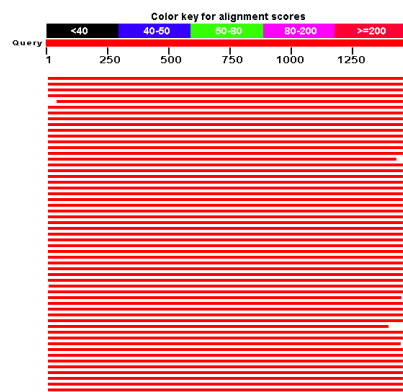


Sequência original:

```
NNNNNNNTANGCGGCTGGCTCCAAAAGGGTACTCTCACC GACTTCGGGNGTTACAACTCTCGGGGTGGACNNGGGGGTGTGTACAAGGCCGGGGAACGNTT
CACC GCGGCGGGCTGATCCGCAATTACAAGCGATTCCGGTTTCTTGC GTGGAAGTTGCAACCTGCAATCCAAATTGAAAGAAGTTTTAGGAGATTGCTTGACCT
CGCGGTCTAGCGACTCGTTGTTTTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCAAAAGGGGCAGGAGGATTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTAC
CGGCAGTCTCGCTAAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACA
ACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGAAGCACTATCTCTCTAGTGGGCACAGAATGTCAGAGACGATGGTCAAGATTCTTCTAAGATGCTTACGAA
ATAGAACCATGCTCAACCAACTTNGNNTGCAGAGACCCGCGTCGAAGTTGCCTGTGAGATTTAACCTTGTGAGCAGCAAGTACCCCGCGTAGTAGGAGCG
GATGTAGTGC GGTTGCGATGCGAGCACTCAAGGGGCGGAAACGCGGCCAAGCACTTAGCTACTCATCGTGTACAGATGTGGACTAGCAACGGGTATATACATC
CTGTGTGAATCCCCACGCTTTCGAGCATCATCAGTCAGTTACAGACAAGAAAGACGCAGTAAC TACCCCTGGGGTGCATCCATATATCTACGCATTTCTCACC GC
AACACATGGGGAATACTACACTGTAATCTTCTTGCACTCAAGTGTACCAGTGTTCAACTGAGACCCCCACCGGCTGGAGACGGGGGGAGCTTTCACATCAGAAAT
TATAAAAAAGACTGCAAGAACTCGCGTTATACGCCCAATAAAATCCCGAGAACGCTTGCGACCTACATATGTACACCCGCGTGATGATGACACATNAATCACACGT
AGTTTCTCTGGTTAGAATAACCGTCNNAGGGGCCGTCAGTTACTAACGTCCTTGTCTCTCTAACAACAGAGTTTAACGATCCGAAAACATTCTTCACTCACGC
GGCGTCACTCGGTGAGCTTTGGCACATTTTCGAAGATTCCGGAAGATTGCCTCCCGTAGGAGTCTGTAGGAGTCTCAGTCCCTGTCAGTTCGATCACCTCTCA
GGTCGTCTCAGCATGGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCATCCACACCCGAAAGCGCCTTCACTGTCTAT
CCATGCGGCATAAACTGGTTCAAGGTATTAGCACGTGTTTCCAAGTGTTCCTCCATTTGATGCGTTGGTATAGCTAGGGTAACTCACCCGTCCTCCCTCTTCTTTG
CAACGAGAGCAGGCCCTGGGGAGGAAAGAAGCGCTCGACTGCATGNNN
```

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Enterococcus faecalis V583 strain V583 16S ribosomal RNA, complete sequence	1290	1290	99%	0.0	83%	NR_074637.1
☐	Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1290	1290	99%	0.0	83%	NR_115765.1
☐	Enterococcus faecalis strain LMG 7937 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1282	1282	99%	0.0	83%	NR_114782.1
☐	Enterococcus faecalis strain JCM 5803 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1256	1256	99%	0.0	83%	NR_040789.1
☐	Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1249	1249	97%	0.0	83%	NR_113901.1
☐	Enterococcus rivorum strain S299 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1188	1188	99%	0.0	82%	NR_117043.1
☐	Enterococcus rotai strain CCM 4630 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1147	1147	99%	0.0	81%	NR_108137.1
☐	Enterococcus moraviensis strain NBRC 100710 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1144	1144	99%	0.0	81%	NR_113937.1
☐	Enterococcus haemoperoxidus strain NBRC 100709 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1144	1144	99%	0.0	81%	NR_113936.1
☐	Enterococcus silisiacus strain R-23712 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1142	1142	99%	0.0	81%	NR_042405.1

Amostra 8: *Enterococcus faecalis*

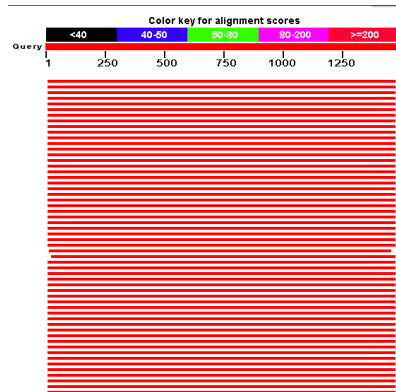


Sequência original:

```
NNNNNNNNNCNCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAAGTTACCTACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGA
ACGTATTACCCGCGCGTGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGCTTCATGCAAGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAAGCTTTAAGAGATTG
CATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGTACTTCCATTGTAGCAGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGG
TTTGTACCCGCGAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTG
ACGACAACCATGCACCCTGTCACTTTGTCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTGA
ATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTGCTACTCCCCAGGCGGAGTCTTAATGCGTTTGCTGCA
GCACTGAAGGGCGGAAACCTCCAACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGT
CAGTTACAGACCAGAGAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTCTCATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATCCACTCTCTCTTCTGCACTCAAGTCTC
CCAGTTTCCAATGACCTCCCCGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCC
ACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGCTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAGGGGACGTTCACTTAACGTCCTTGTCTTCTCTAACAAC
AGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTCACTACGCGCGCTTGTCTCGGTCAGACTTTGTCCTATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG
CCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGCGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCCA
TCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCTTCACTCTTATGCCATGCGGCATAAACTGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCTCTGATGGGTAG
GTTACCCACGTGTTACTACCCGTCGCCCACTCTCTTCCAATTGAGTGCAAGCACTCGGGAGNAAAGAAGCGTTGCGACTGCATGTATAGCACGCCGNNNNNC
NNC
```

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2651	2651	98%	0.0	99%	NR_115765.1
☐	Enterococcus faecalis V583 strain V583 16S ribosomal RNA, complete sequence	2645	2645	98%	0.0	99%	NR_074637.1
☐	Enterococcus faecalis strain LMG 7937 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2638	2638	98%	0.0	99%	NR_114782.1
☐	Enterococcus faecalis strain JCM 5803 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2617	2617	98%	0.0	99%	NR_040789.1
☐	Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2584	2584	96%	0.0	99%	NR_113901.1
☐	Enterococcus rivorum strain S299 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2525	2525	98%	0.0	98%	NR_117043.1
☐	Enterococcus moraviensis strain NBRC 100710 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2459	2459	98%	0.0	97%	NR_113937.1
☐	Enterococcus haemoperoxidus strain NBRC 100709 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2459	2459	98%	0.0	97%	NR_113936.1
☐	Enterococcus rotai strain CCM 4630 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2451	2451	98%	0.0	97%	NR_108137.1
☐	Enterococcus silésiacus strain R-23712 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2446	2446	98%	0.0	97%	NR_042405.1

Amostra 9: *Staphylococcus epidermidis*



Sequência original:

```
NNNNNTNAANACNTTCGACGGCTAGCTCCAAATGGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGGGGTGTGTACAAGACCCGGGAAC
GTATTCACCGTAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATATAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAAGTGAACAACATTTATGGGATTTGCTTG
ACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTATCCCCACCTTCTCCGGTTTGT
CACCGGCAGTCAACTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGA
CAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGGAAAACTCAGTATCTCTACGAGGGATCTAGAGGACGTGCAAGATTTGGTAAGGTTCTTGCGCGCTAG
CTTCGAATCAAACCACATGCTCCTACAGCTCGTGTGGGTCCCCGTCAATTCTCTTGGAGTGTCACCTCGCGGTCTGACTCCCCAGGTGGAGTGAATTAATGA
GTTAGCGGCAGCAATAAGGGAGCGGAAACCTCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTGACGACGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGATCCCCACGCTTT
CGCACATCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTCCATATCTCTGCGCATTTACCGCTACACATGGAATTCACCTTTCTCTTCT
GCACTCAAGTTTTCCAGATTTCCAATGACCCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTATCACCATCAGACTATAAAAAACCGACCTACGCGCGCTTTACGACCCAAGTA
ATTCCAGGATAACGCTTGCCGACCTACGTATTACCGCGGCTTGCTGGTCACGTAGATCAGCCGTGGGCTTTCTGATTACGGTACCGTCAAGACGTGCATAGTTAC
TTACACATTTGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTTACGATCCGAAGACCTTCATCACTCAGCGGCGTTGCTCCGTACGGCTTTCCGCCATTGCGGAAGATTCCCTA
CTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTGCGGTACGCATCGTTGCTTGGTAAGCCGTACCTTACC
AACTAGCTAATGCGGCGCGGATCCATCTATAAGTGACAGCAAAACCGCTCTTCACTATTGAACCATGCGGTTCAATATATTATCCGGTATTAGTCCGGTTTCCCG
AAGTTATCCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTACCCGTCCGCGCTAACGTCAGAGGAGCAAGCTCCTCGTCTGTTGCTCGACTGCATGTATAG
CACGCCGCGNNNNNNNC
```

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Staphylococcus epidermidis strain Fussel 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2423	2423	98%	0.0	97%	NR_036904.1
☐	Staphylococcus epidermidis strain NBRC 100911 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2420	2420	98%	0.0	97%	NR_113957.1
☐	Staphylococcus epidermidis RP62A strain RP62A 16S ribosomal RNA, complete sequence	2418	2418	98%	0.0	97%	NR_074995.1
☐	Staphylococcus capitis subsp. capitis strain JCM 2420 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2385	2385	98%	0.0	96%	NR_113348.1
☐	Staphylococcus capitis subsp. urealyticus strain MAW 8436 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2385	2385	98%	0.0	96%	NR_027519.1
☐	Staphylococcus caprae strain ATCC 35538 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2385	2385	98%	0.0	96%	NR_024665.1
☐	Staphylococcus capitis strain LK 499 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2385	2385	98%	0.0	96%	NR_036775.1
☐	Staphylococcus saccharolyticus strain JCM 1768 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2379	2379	98%	0.0	96%	NR_113405.1
☐	Staphylococcus saccharolyticus strain S 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2372	2372	98%	0.0	96%	NR_029158.1
☐	Staphylococcus caprae strain DSM 20608 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2362	2362	98%	0.0	96%	NR_119252.1

Amostra 10: *Enterococcus faecalis*

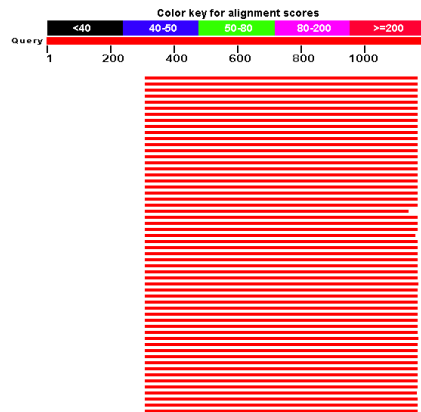


Sequência original:

```
ANNGCTNCAAAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTG
CTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGAAGAGCTTTAAGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGC
GACTCGTTGTACTTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGTTTGTACCGGCAGTCTCG
CTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
CTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGANGACAAAGGATGTCAAGACCCGNGTANNAGCTGCTTCGCGATAGTCTTCCAATTAACACCAC
ATGCTCCGACAGCTATGTGGNCGGAAACCCGATCAATTCCGTTTGAGTTTCAACCTCGTAGCGGAAGTACCCCCACGCACCCAGGGCANGTTAATTGCGACTG
CTGCAGCACTCAAGGGCGCAAACCATGCGACAGAACTTAGCACTCATCGTTTAGCGGCTGAGTGGACTAGCCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCAAGCACGC
TTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCTGAGCAACCAAGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCACCTCTCCTCT
TCTGCACTCAAGTCTCCCAAGNTTCAACAATGACCCTCACCGGCTGAGCCGGGGGGCTTTACATCAGACTTAAGAAAACAGCCTGCGCTCGCGTTACGCCCAAT
AAATCCGGACAACGCNTTGCCACCTACGTATTACCGACAGACTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTNTTCATCGGTTAGATACCGTCAGGGGACGTTACGTTAC
TAACGTCTTTGTTCTTCTTAACAACAGAGTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGTCAAGCTTTGCTCCATTGCCGAAGATTCCCTA
CTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCAC
CAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCACTCTTATGCCATGCGGCATAAACTGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTC
CAAGTGTATCCCCCTCTGATGGGTAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCGCCACTCCTCTTTCCAATTGAGTGCAAGCACTCGGGAGNAAAGAACGCGTTCC
ACTGCATGTATTAGCACGNNNNNNNN
```

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2233	2233	98%	0.0	95%	NR_115765.1
☐	Enterococcus faecalis V583 strain V583 16S ribosomal RNA, complete sequence	2228	2228	98%	0.0	94%	NR_074637.1
☐	Enterococcus faecalis strain LMG 7937 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2220	2220	98%	0.0	94%	NR_114782.1
☐	Enterococcus faecalis strain JCM 5803 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2202	2202	98%	0.0	94%	NR_040789.1
☐	Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2198	2198	97%	0.0	94%	NR_113901.1
☐	Enterococcus rivorum strain S299 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2109	2109	98%	0.0	93%	NR_117043.1
☐	Enterococcus moraviensis strain NBRC 100710 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2043	2043	98%	0.0	92%	NR_113937.1
☐	Enterococcus haemoperoxidus strain NBRC 100709 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2043	2043	98%	0.0	92%	NR_113936.1
☐	Enterococcus rotai strain CCM 4630 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2036	2036	98%	0.0	92%	NR_108137.1
☐	Enterococcus termitis strain LMG 8895 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2032	2032	98%	0.0	92%	NR_042406.1

Amostra 11: *Staphylococcus epidermidis*

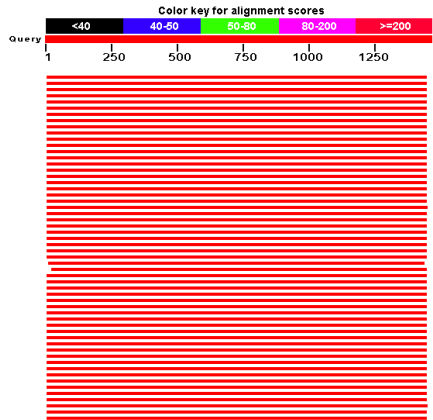


Sequência original:

```
TGAGGCAACAAGCATAAGGTGACAGCTCGTGAACGGAAGTACCCAAACATTCCCGCCGAGCCTGCGGCACCAGGGCTGCTACACCGGACATTCTCCCCGA
TACGGGAAGGACTCAAACCTAAGATCGGGTCAGCTAGGAGTCAACATTCTGTAAGTTCTTCGCGTTCTTCGAACTTGAACAAAAATGTCGGCACCACATAATTGC
GGTTGCTCCCCCTCGAAAGCAGTATAAAACAGATAATCGTCCACACCCCCGCGGGTTCGCACTCCCGAGGGTTACGGTGGAAGGTAGGCACCTTAATCCACCCT
AGCTCCAGCACTAAGGGTGCGGAAACCCCTAACACATAGTGACACACCCCTATGAAGGCGTGGGAATACCACGGCGCATCATTGGGCAGAACTCTGCCGGA
TCCACTACGCGTTCGCACATCAGCGTCAGATACAGACCTAGACAACCTCGCCTTCGACACTGGTGGTCTCCATATAAATATGCGCATTTAGCCAGCTACACAGG
GAATTCCAATTTCTCTTACGCACTCAAGACTTTCCAAATTTACAATGACCCTCGCACGCGTTGAGCCGTGGGCTCTAAACAAAAGACCCAAAAACCGCCTCC
GATCGCGCTTGACGCCCCAATAATTCAAGGAAAACCGGGCTTGCCACCTACGATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGATTAGGTACCG
TCAAGACGTGCATAGTTACTTACACATTTGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTATACGATCCGAAGACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTGAGGCTTTCGCC
CATTGCGGAAGATTCTTCTGCTGCTCCTCCGTAGGAGTTTGGCCCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCGCCCTCTCAGGTGCGGTACGCATCGTTTCCTT
GGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAACGCGGAGCGGATCCATCTATAAGTGACAGCAAAACCGTCTTTCATATTGAACCATGCGGTTCAATATATTATCCGG
TATGAGCTCCGGTTTCCCGAAGTTATCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCAAAGGGCCTCCGCTAACGTCAGAGGAGCAAGCTCCTTGTCAGTT
CGCTCGACTGGCATGTATAGTAAAAACCAATACCC
```

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Staphylococcus epidermidis strain NBRC 100911 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1059	1059	72%	0.0	90%	NR_113957.1
☐	Staphylococcus epidermidis strain Fussel 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1059	1059	72%	0.0	90%	NR_036904.1
☐	Staphylococcus epidermidis RP62A strain RP62A 16S ribosomal RNA, complete sequence	1053	1053	72%	0.0	90%	NR_074995.1
☐	Staphylococcus caprae strain DSM 20608 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1037	1037	72%	0.0	89%	NR_119252.1
☐	Staphylococcus capitis subsp. urealyticus strain MAW 8436 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1037	1037	72%	0.0	89%	NR_027519.1
☐	Staphylococcus capitis subsp. capitis strain JCM 2420 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1031	1031	72%	0.0	89%	NR_113348.1
☐	Staphylococcus caprae strain ATCC 35538 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1031	1031	72%	0.0	89%	NR_024665.1
☐	Staphylococcus capitis strain LK 499 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1031	1031	72%	0.0	89%	NR_036775.1
☐	Staphylococcus saccharolyticus strain JCM 1768 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1026	1026	72%	0.0	89%	NR_113405.1
☐	Staphylococcus saccharolyticus strain S 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1026	1026	72%	0.0	89%	NR_029158.1

Amostra 12: *Staphylococcus epidermidis*

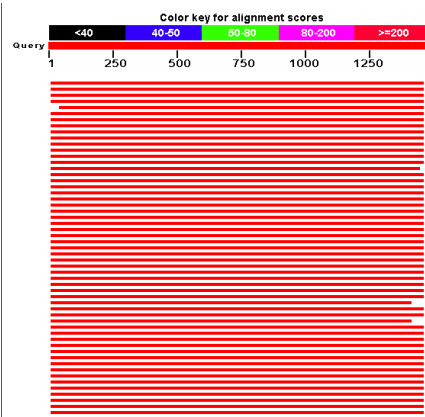


Sequência original:

NNNTNNTNTCTTCGACGGCTAGCTCCAAATGGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGT
ATTCACCGTAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATATAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAACAGAGAACAACCTTTATGGGATTTGCTTGAC
CTCGCGGTTTTTCGCTGCCCTTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCA
CCGGCAGTCAACTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACA
ACCATGCACCACTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGGAAAGNATCTTCTATCTCCTAGAGGGGTGAGAGGACGTCAAGATTTGGTAAGGTTTCATGCGCGCTAGCT
TCGAACTAAACCACATGCTCCACAGCTTGTGCTGGGTCCCGTCAATTCCTTTGAGTTACAACCTGCGGTGCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAG
CTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGAAGTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGATCCCCACGCTTTCGCACATC
AGCGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTGCGCATTTACCGCTACACATGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAA
GTTTTCCAGTTTCCAATGACCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTTAAAAAACCGCCTACGCGCGCTTTACGCCCAATAATTCGGATAACGCT
TGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGATTAGGTACCGTCAAGACGTGCATAGTTACTTACACATTTGTTCTTCCCTAAT
AACAGAGTTTTACGATCCGAAGACCTTCATCACTACGCGGCGTTGCTCCGTGAGGCTTTGCGCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCT
GGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGCGCTACGCATCGTTGCGCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCGGCGCGGAT
CCATCTATAAGTGACAGCAAAACCGTCTTCACTATTGAACCATGCGGTTCAATATATTATCCGGTATTAGCTCCGGTTCCCGAAGTTATCCAGTCTTATAGGTA
GGTTATCCACGTGTTACTCACCCGNCGCCGCTAACGTCAGAGGAGCAAGCTCCTCGTCTGTTGCTCGACTGCATGTATAGCANNNNNNNNCCNC

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Staphylococcus epidermidis strain Fussel 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2538	2538	98%	0.0	99%	NR_036904.1
☐	Staphylococcus epidermidis strain NBRC 100911 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2534	2534	98%	0.0	99%	NR_113957.1
☐	Staphylococcus epidermidis RP62A strain RP62A 16S ribosomal RNA, complete sequence	2532	2532	98%	0.0	99%	NR_074995.1
☐	Staphylococcus capitis subsp. urealyticus strain MAW 8436 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2499	2499	98%	0.0	98%	NR_027519.1
☐	Staphylococcus caprae strain ATCC 35538 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2499	2499	98%	0.0	98%	NR_024665.1
☐	Staphylococcus saccharolyticus strain JCM 1768 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2494	2494	98%	0.0	98%	NR_113405.1
☐	Staphylococcus saccharolyticus strain S 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2490	2490	98%	0.0	98%	NR_029158.1
☐	Staphylococcus capitis subsp. capitis strain JCM 2420 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2488	2488	98%	0.0	98%	NR_113348.1
☐	Staphylococcus capitis strain LK 499 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2488	2488	98%	0.0	98%	NR_036775.1
☐	Staphylococcus caprae strain DSM 20608 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2479	2479	98%	0.0	98%	NR_119252.1

Amostra 13: *Enterococcus faecalis*

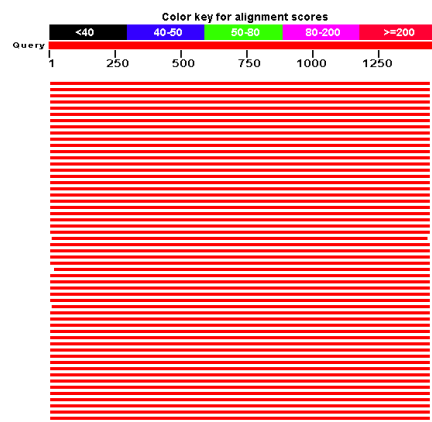


Sequência original:

```
NNNNNNNNCNCNTAGGCGGCTGGCTCCAAAAAGGTTACCTACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG
TATTCACCGCGGCGTGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGAAGAGAGCTTTAAGAGATTTGCAT
GACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGTACTTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTATCCCCACCTTCTCCGGTTT
GTCACCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCACTAAATGATGGCACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGAC
GACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCGCCGAAGGGAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGATAAGGTTCTTCGCGTGTNGCTTAGA
ATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGAGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTAGCGGTAGTACTCCCCAGGCGGAGTGTGAATGCGTTTGCTG
CAGCACTGAAGGGCGGAAACCTCCAACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGAGCCTCAGC
GTCAGTTACAGACCAGAGAGCGGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAAATCCACTCTCCTCTTCTGCAGTCAAGT
CTCCAGTTTCCAATGACCTCCCCGGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCT
TGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGTGGCAGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAGGGGACGTTCACTTACTAACGTCCTTGTCTTCTCTAA
CAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTGAGCTTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTC
TGGGCGGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCACTAGCTAATGCACCGCGG
GTCCATCCATCAGCGACACCGAAAAGCGCCTTTCACTCTTATGCCATGCGGCATAAACTGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTATCCCCCTCTGATG
GGTAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCGCCACTCCTCTTTCAATTGAGTGAAGCACTCGGGAGGAAAGAAGCGTTTCACTGCATGTTNTNNGCANNACN
NNNNNNNC
```

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2584	2584	97%	0.0	99%	NR_115765.1
☐	Enterococcus faecalis V583 strain V583 16S ribosomal RNA, complete sequence	2579	2579	97%	0.0	99%	NR_074637.1
☐	Enterococcus faecalis strain LMG 7937 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2571	2571	97%	0.0	99%	NR_114782.1
☐	Enterococcus faecalis strain JCM 5803 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2551	2551	97%	0.0	99%	NR_040789.1
☐	Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2521	2521	95%	0.0	99%	NR_113901.1
☐	Enterococcus rivorum strain S299 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2459	2459	97%	0.0	98%	NR_117043.1
☐	Enterococcus moraviensis strain NBRC 100710 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2386	2386	97%	0.0	97%	NR_113937.1
☐	Enterococcus haemoperoxidus strain NBRC 100709 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2386	2386	97%	0.0	97%	NR_113936.1
☐	Enterococcus rotai strain CCM 4630 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2379	2379	97%	0.0	97%	NR_108137.1
☐	Enterococcus silesiacus strain R-23712 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2374	2374	97%	0.0	96%	NR_042405.1

Amostra 14: *Staphylococcus epidermidis*

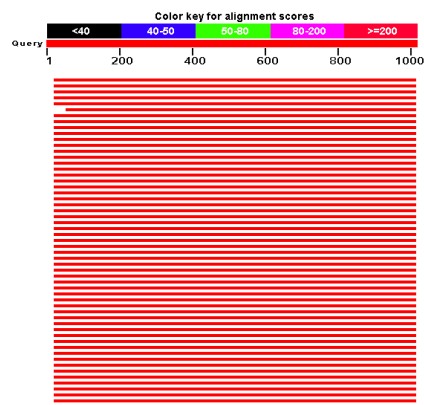


Sequência original:

```
CNNNNNNNTNGACGGGCTAGCTCCAATGGTACTCCACCGGCTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATT
CACCGTAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATATAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAAGTGAACAACCTTTATGGGATTTGCTTGACCTC
GCGGTTTCGCTACCCCTTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAATCATAAGGGGCGATGATGATTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGTTTGTACCG
GCAGTCAACTTAGAGTGCCCACTTAATGATGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAGACACGAGCTGACGACAACCA
TGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGGAAAACNCTATCTCCTAGAGGGGTGAGAGGATGTCAAGATTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAATTAAA
CCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTGCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAA
GGGCGCGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGATCCCCACGCTTTCGCACATCAGCGTCAGTTAC
AGACCAGAAAGTCGCTTCGCCACTGGTGTCTCCATATCTGCGCATTTACCGCTACACATGGAAATTCACCTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTT
CCAATGACCTCCACGGGTTGAGCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCCTACGCGCGCTTTACGCCCAATAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACG
TATTACCGCGGTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGATTAGGTACCGTCAAGACGTGCATAGTTACTTACACATTTGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTT
ACGATCCGAAGACCTTCATCACTCAGCGCGGCTTGTCCGTGAGGCTTTCGCCCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTG
TCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGCGCTACGCATCGTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCGGGCGCGGATCCATCTATAAG
TGACAGCAAAACCGTCTTTCATATTGAACCATGCGGTTCAATATATTATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCGAAGTTATCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACG
TGTTACTACCCGTCCGCCGCTAACGTCAGAGGAGCAAGCTCCTCGTCTGTTGCTGCACTGCATGTATATNCCCGCNACNNNNNNNNNN
```

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Staphylococcus epidermidis strain NBRC 100911 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2591	2591	97%	0.0	99%	NR_113957.1
☐	Staphylococcus epidermidis strain Fussel 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2590	2590	97%	0.0	99%	NR_036904.1
☐	Staphylococcus epidermidis RP62A strain RP62A 16S ribosomal RNA, complete sequence	2584	2584	97%	0.0	99%	NR_074995.1
☐	Staphylococcus capitis subsp. urealyticus strain MAW 8436 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2562	2562	97%	0.0	99%	NR_027519.1
☐	Staphylococcus capitis subsp. capitis strain JCM 2420 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2551	2551	97%	0.0	99%	NR_113348.1
☐	Staphylococcus caprae strain ATCC 35538 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2551	2551	97%	0.0	99%	NR_024665.1
☐	Staphylococcus capitis strain LK 499 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2551	2551	97%	0.0	99%	NR_036775.1
☐	Staphylococcus saccharolyticus strain JCM 1768 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2545	2545	97%	0.0	99%	NR_113405.1
☐	Staphylococcus saccharolyticus strain S 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2545	2545	97%	0.0	99%	NR_029158.1
☐	Staphylococcus caprae strain DSM 20608 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2542	2542	97%	0.0	99%	NR_119252.1

Amostra 15: *Enterococcus faecalis*

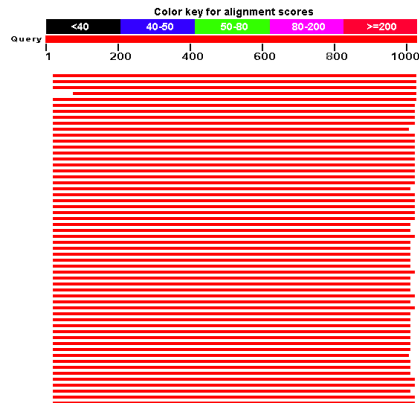


Sequência original:

```
AAATTCCTTTTAAATTAGAGGTAGGCCGCTGGCTCCAAGAGGTTACCCCTCCGACTTCGGGCGTTACGGAATCTCGTGGTGTGACGGGCGTTGTATTAGGAC
AGGGAACGTATTCACCGCAGCGTGCTGATCCGCTGTTACTAGCGATTCCGGTTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACGAAAGAGCTTTAACAAA
TTTGCATGACCTCGCGGTCTAACGACTCGTTGTAATTTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCT
CCGTTTTGTCACCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTACAATAAGGGTTGCGCTCGTAGCGGGACTTAACCCAACATCTCAGCACAG
AGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGACAAAGGATGTCAAGACCTGCTAAGGTTCTTCGCGTTGC
TTCTAATTAACCATGTTCCACCGCTTGTCGGGGCCCCCTCAATTCTTTGAGTTTCAACCTTGGGACGAACCTCCCATGAGGAGCGCTTATTGCGATTGCT
GCAGGGGTGAAGGGCGGAATTCCTCCAACCTTAGGATTTATTTTTACGGCGTGGACTACAAGGATATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTCGAGCCTCAT
CGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCTTTTCGCCACTGGTGTTCCTCCCATATATCTACGCATTTTACCGCTACACATGGAATTTCCCTCTCCTCTTCTGCACTCAA
GTCTCCAGTTTCCAATGACCCCTCCCGGTTGAGCCGGGGGGCTTTACATCAGACTTAAGAAACCGCCCTGCGCTCGCTTTTACGCCTCAATAAATCTGGGACA
ACGCTTGCCCTCCCTACTAATACCGGCGTCTTGCTGGCATCGTAACCTACGCCGGGTCTTTCTGGGCT
```

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Enterococcus faecalis V583 strain V583 16S ribosomal RNA, complete sequence	1406	1406	97%	0.0	93%	NR_074637.1
☐	Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1406	1406	97%	0.0	93%	NR_115765.1
☐	Enterococcus faecalis strain LMG 7937 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1404	1404	97%	0.0	92%	NR_114782.1
☐	Enterococcus rivorum strain S299 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1384	1384	97%	0.0	92%	NR_117043.1
☐	Enterococcus faecalis strain JCM 5803 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1380	1380	97%	0.0	92%	NR_040789.1
☐	Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1371	1371	94%	0.0	93%	NR_113901.1
☐	Enterococcus termitis strain LMG 8895 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1371	1371	97%	0.0	92%	NR_042406.1
☐	Enterococcus moraviensis strain NBRC 100710 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1363	1363	97%	0.0	92%	NR_113937.1
☐	Enterococcus haemoperoxidus strain NBRC 100709 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1362	1362	97%	0.0	92%	NR_113936.1
☐	Enterococcus plantarum strain CCM 7889 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1362	1362	97%	0.0	92%	NR_118050.1

Amostra 16: *Enterococcus faecalis*

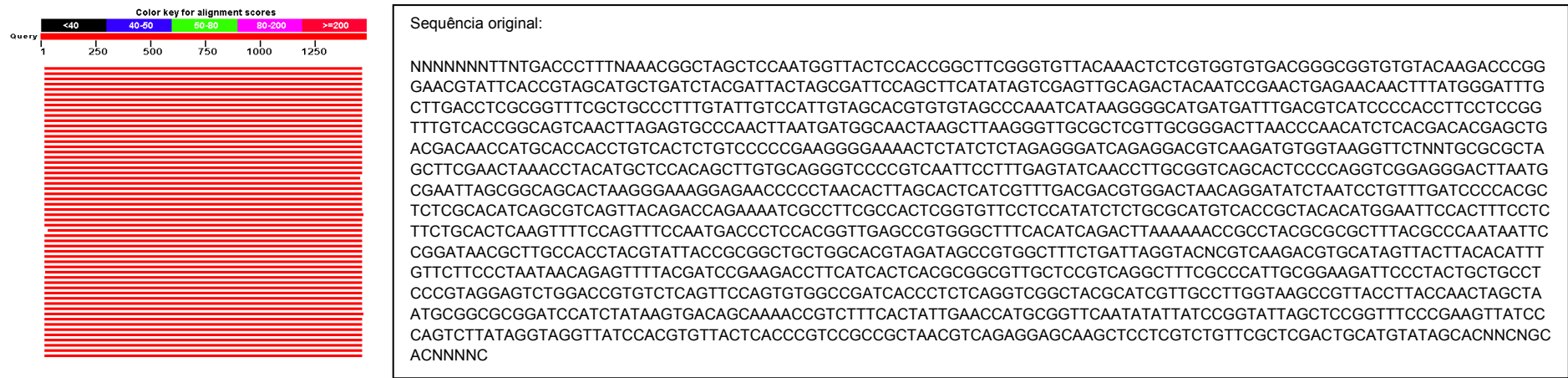


Sequência original:

```
CCCTGTTGTATCCCGGGTATGGTGGCTGGCTCCAAGGGGTACCTCAGCGACTTCGGGTGTTCCGACTCTTCGCCCTTTACGGGCGGTGTGTTCTAGGGCCGG
GAACGTATTCACCGCGTCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGGGGGCGAGTTGCAGCCTGCGGTCCGAAGTGAAGAGAGATT
TGCATGACCTCGCGGTCTAGCGGACTCGTCTCGTACTTCCCATTTTTCACGTGTGGAGCCAGGCCCAAGGGGCGTGATGATTTGACGTCATCCCTCCTTC
CTCCGGTTTGTACCGGGAGGCTCGCTAGAGTGCCACCTAAATGATGGCAACTAACAATAAGGGGTGCGCTCGTTGCGGGATTAAACCCACCATCTCACGACG
CGAGCTGACGACAACCATGGACCACCTGTTTCTTTGTCGCCGAAGGGAAGCTCTATCTCTAGAGAGGGCAAAGGATGACAAGACCTGGTTGGGTTCTTCGCGT
TGCTTCAAATTAACACACATGCTCCACCGCTTGTCGGGGCCCCGTCATTTCTTTGAGTTTCGACCGAGCGGTCTACTCCCCAGGCGGAGTGATGAATGCGG
TTGCTGCGGACCTGAAGGGCGGAAACCTCCAACACTTATCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTTCGAGC
CTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCACTCTCTCTTCTGCACT
CAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCTCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCTGCGCTCGCTTACGCCCAATAAATCCGGACAAC
GCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGGGCTTCTGGTTAGATACCGTCAGGGGACGTTCACTTACTAAGC
```

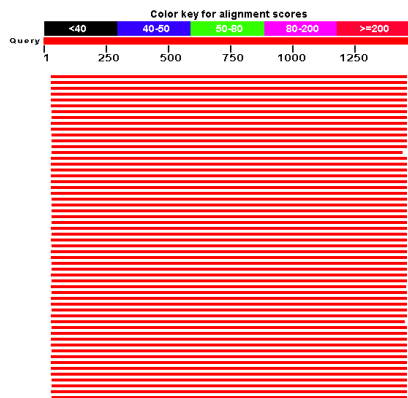
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Enterococcus faecalis V583 strain V583 16S ribosomal RNA, complete sequence	1515	1515	97%	0.0	94%	NR_074637.1
☐	Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1515	1515	97%	0.0	94%	NR_115765.1
☐	Enterococcus faecalis strain LMG 7937 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1507	1507	97%	0.0	94%	NR_114782.1
☐	Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1493	1493	92%	0.0	95%	NR_113901.1
☐	Enterococcus faecalis strain JCM 5803 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1489	1489	97%	0.0	93%	NR_040789.1
☐	Enterococcus rivorum strain S299 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1469	1469	97%	0.0	93%	NR_117043.1
☐	Enterococcus moraviensis strain NBRC 100710 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1459	1459	97%	0.0	93%	NR_113937.1
☐	Enterococcus haemoperoxidus strain NBRC 100709 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1458	1458	97%	0.0	93%	NR_113936.1
☐	Enterococcus plantarum strain CCM 7889 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1458	1458	97%	0.0	93%	NR_118050.1
☐	Enterococcus termitis strain LMG 8895 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1454	1454	95%	0.0	93%	NR_042406.1

Amostra 17: *Staphylococcus epidermidis*



	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Staphylococcus epidermidis strain Fussel 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2438	2438	97%	0.0	97%	NR_036904.1
☐	Staphylococcus epidermidis strain NBRC 100911 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2435	2435	97%	0.0	97%	NR_113957.1
☐	Staphylococcus epidermidis RP62A strain RP62A 16S ribosomal RNA, complete sequence	2433	2433	97%	0.0	97%	NR_074995.1
☐	Staphylococcus capitis subsp. capitis strain JCM 2420 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2399	2399	97%	0.0	97%	NR_113348.1
☐	Staphylococcus capitis subsp. urealyticus strain MAW 8436 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2399	2399	97%	0.0	97%	NR_027519.1
☐	Staphylococcus caprae strain ATCC 35538 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2399	2399	97%	0.0	97%	NR_024665.1
☐	Staphylococcus capitis strain LK 499 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2399	2399	97%	0.0	97%	NR_036775.1
☐	Staphylococcus saccharolyticus strain JCM 1768 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2394	2394	97%	0.0	97%	NR_113405.1
☐	Staphylococcus saccharolyticus strain S 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2394	2394	97%	0.0	97%	NR_029158.1
☐	Staphylococcus caprae strain DSM 20608 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2377	2377	97%	0.0	97%	NR_119252.1

Amostra 18: *Staphylococcus lugdunensis*

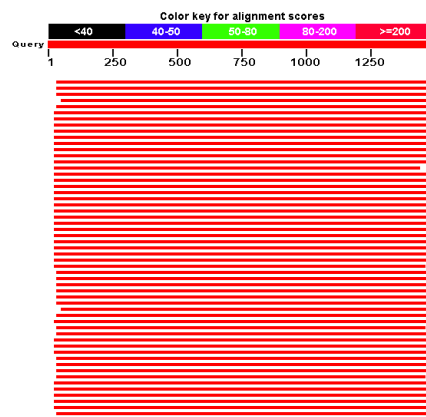


Sequência original:

NNNNNNNNNNNGATNNANNTNACGGCGANANTCCAAATGGTACTCCACCGGCTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACC
CGGGAACGTATTCACCGTAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAACAGAGAACAACCTTATGGGAT
TTGCTTGACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGATTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAATCATAAGGGGCATGATGATTGACGTCATCCCCACCTTCCTCC
GGTTTGTACCCGGCAGTCAACTTAGAGTGCCCACTAAATGATGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGC
TGACGACAACCATGCACCACTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGGAACTCTATCTCTAGAGCGGTCAAAGGATGTCAAGACTTTGGTAAAGATTCTTGCGCGTT
ACCTTCGAACATAACCTACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAAATCCTTTGAGTTTCAACCTTGCAGTCTGCTACTCCCCAGGCCGAGTGCTTAATGCGT
TAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTACCCACGCTTTCGCAC
ATCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTGCGCATTTACCGCTACACATGGAATTCACATTTCTCTTCTGCAC
TCAAGTTTTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTACGCGCGCTTACGCCCAATAATCCGGATAA
CGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGATTAGGTACCGTCAAGACGTGCACAGTTACTTACACGTTTGTCTTCC
CTAATAACAGAGTTTACGATCCTAAGACCTTCATCACTACGCGCGCTTGTCCGTGAGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCCTCCGTAGG
AGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGCGGTACGTATCGTTGCGCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCACAGTCAATACGGCG
CGGGTCCATCTATAAGTGATAGCAAAACCATCTTCACTATTGAACCATGCGGTTCAACATATTATCCGGTATTAGCTCCGGTTCCCGAAGTTGCCCAGTCTTAT
AGGTAGGTTACCCACGTGTTACTACCCNNCCGCCGCTAACGTCAAAGGAGCAAGCTCCTATCTGTTGCTCGACTGCATGTATAGCACGCCGNNNNNC

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Staphylococcus lugdunensis strain ATCC 43809 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2543	2543	97%	0.0	99%	NR_024668.1
☐	Staphylococcus lugdunensis HKU09-01 strain HKU09-01 16S ribosomal RNA, complete sequence	2538	2538	97%	0.0	99%	NR_074868.1
☐	Staphylococcus petrasii subsp. petrasii strain CCM 8418 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2466	2466	97%	0.0	98%	NR_118450.1
☐	Staphylococcus devriesei strain KS-SP_60 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2466	2466	97%	0.0	98%	NR_116627.1
☐	Staphylococcus haemolyticus strain JCM 2416 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2462	2462	97%	0.0	98%	NR_113345.1
☐	Staphylococcus haemolyticus JCSC1435 strain JCSC1435 16S ribosomal RNA, complete sequence	2460	2460	97%	0.0	98%	NR_074994.1
☐	Staphylococcus pasteurii strain ATCC 51129 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2455	2455	97%	0.0	98%	NR_024669.1
☐	Staphylococcus jeltensis strain SEQ110 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2451	2451	97%	0.0	98%	NR_118248.1
☐	Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus strain GTC 1228 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2447	2447	97%	0.0	98%	NR_041323.1
☐	Staphylococcus hominis subsp. hominis strain DM 122 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2442	2442	97%	0.0	97%	NR_036956.1

Amostra 19: *Enterococcus faecalis*

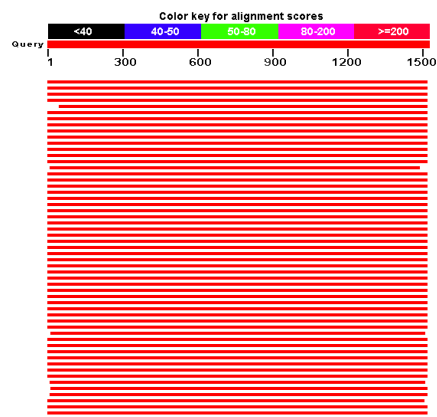


Sequência original:

```
NNNNNTNTANNNGCNNTAAACNGCTGTGGTCCATAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCG
GGAACGTATTCACCGCGGCGTGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAAGCTTTAAGAGAT
TTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGTAATTTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTC
CGGTTTGTACCGGCGAGTCTCGCTAGAGTGCCCACTAAATGATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGA
GCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAAGTTCTTCGCGTTGCT
TAGAATTAACACCATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTCAACCTTGCAGTCTGCTACTCCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTTGC
TGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTTCGAGCCTCA
GCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCGCCCTTCGCCACTGGTGTTCTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAG
TCTCCAGTTTCCAATGACCTCCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCT
TGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAGGGGACGTTTCACTTACTAAGTCCTTGTCTTCTCTAA
CAACAGAGTTTACGATCCGAAACCTTTCTCACTCACGCGGCGTGTGCTCGGTGAGACTTTCTGTCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTC
TGGGCCGTGTCTAGTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGCGGCTATGCATCGTGCCGTTGAGCCGTTACCTCACCACTAGTCAATGCACCGCGG
GTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCACTCTTATGCCATGCGGCATAAACTGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTATCCCCCTCTGATG
GGTAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCGCCACTCCTCTTTCCAATTGAGTGCAAGCACTCGGGAGGAAAGAAGCGTTTCACTGCATGTATAGGCNNCGNN
NTCANCNNNNNN
```

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2597	2597	96%	0.0	99%	NR_115765.1
☐	Enterococcus faecalis V583 strain V583 16S ribosomal RNA, complete sequence	2591	2591	96%	0.0	99%	NR_074637.1
☐	Enterococcus faecalis strain LMG 7937 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2584	2584	96%	0.0	99%	NR_114782.1
☐	Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2567	2567	95%	0.0	99%	NR_113901.1
☐	Enterococcus faecalis strain JCM 5803 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2564	2564	96%	0.0	99%	NR_040789.1
☐	Enterococcus rivorum strain S299 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2483	2483	96%	0.0	98%	NR_117043.1
☐	Enterococcus moraviensis strain NBRC 100710 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2410	2410	96%	0.0	97%	NR_113937.1
☐	Enterococcus haemoperoxidus strain NBRC 100709 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2410	2410	96%	0.0	97%	NR_113936.1
☐	Enterococcus rotai strain CCM 4630 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2403	2403	96%	0.0	97%	NR_108137.1
☐	Enterococcus silisiaicus strain R-23712 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2398	2398	96%	0.0	97%	NR_042405.1

Amostra 20: *Enterococcus faecalis*

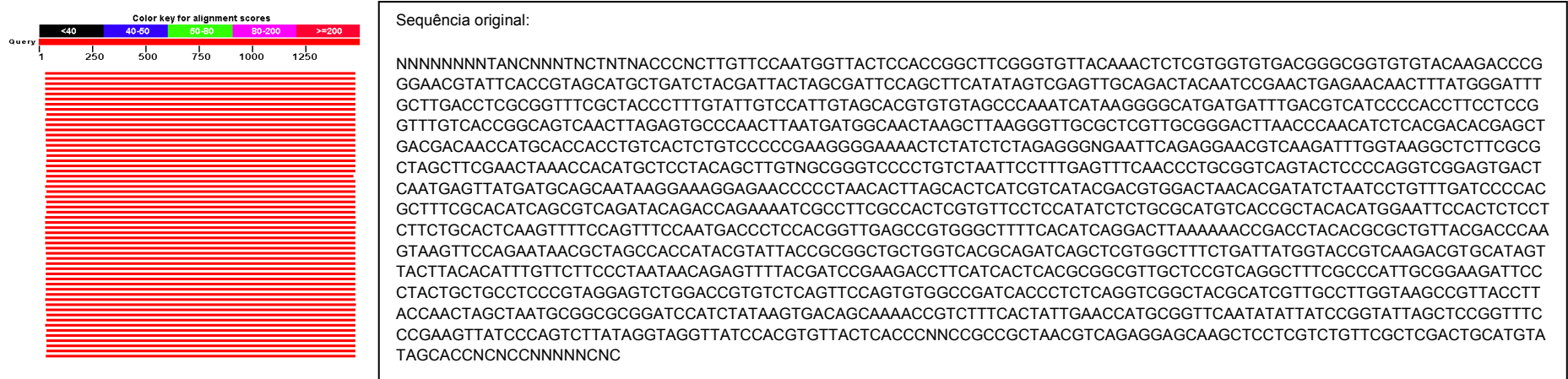


Sequência original:

```
CCATCTCTATGCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGA
ACGTATTCACCGCGGCGTGTGATCCTGCGATTTAATAGCGATCTCCGGCTTCAAAGCGAGGCGAGTATCCAGCCTGTCAATCCGGGAACGGGAGAGAAGC
TTTAAGAGGAATCCCCACGACCCCGCGGTCTAAAGCGACTCGTGTGACTCTCCATTGGGAGCACGTGTGATCCCCAGGTAATAAGGGGCAATGATGATT
GACGCTACCCCCACTCTTCCCTCCGGTTTGTCCACCGGCAGTCTCTGCTAAGAGTGCCCCAAATAAAGGAGGGCAACTAACAAATAAGGGTTGCGCTCGGT
GCGGGGACTTAACCCCAACATTCTACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAGCTCTTATCTCTAGAGTGGTCAAA
GGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGT
CGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTTGTGTCAGCACTGAAGGGCGGAAACCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTAT
CTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCTTCCGCACTGGTGTCTCTCATATATCTACGCATTTACCGCT
ACACATGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTACATCAGACTTAAGAAACCGCCTG
CGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAGG
GGACGTTCACTTACTAACGTCCTTGTCTTCTTAACAACAGAGTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCAGCGGCGTTGCTCGGTGAGACTTTCTGTCATTG
CCGAAGATTCCCTACTGCTGCTCCCCGTAGGAATCTGGGGCCGTGTCTCAGTCCCAAGTGGGGCCGATCACCTCTTCAAGGTCGGCTATGCATCCGGGGCC
TTGGGGGAGCCGTTACCTCACCACTAAGCTAAAGGCACGCGGGGGCCATCCATCAGCGGACACCCCGAAGAAGCGCTTTTCACTCTTATTGCCATGCCGCA
TAACTGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTATCCCCCTCTGATGGGTAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCGCGCACTCCTCTTCCAATTGAG
TGCAAGCACTCGGGAGGAAAGAAGCGTTCGACTGCATGTATAGCACGCCGCCATTGCC
```

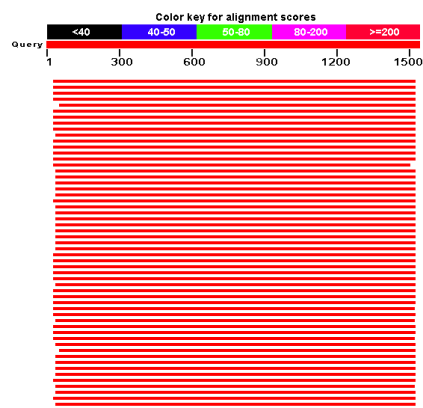
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2292	2292	99%	0.0	95%	NR_115765.1
☐	Enterococcus faecalis V583 strain V583 16S ribosomal RNA, complete sequence	2287	2287	99%	0.0	94%	NR_074637.1
☐	Enterococcus faecalis strain LMG 7937 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2279	2279	99%	0.0	94%	NR_114782.1
☐	Enterococcus faecalis strain JCM 5803 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2261	2261	99%	0.0	94%	NR_040789.1
☐	Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2226	2226	96%	0.0	95%	NR_113901.1
☐	Enterococcus rivorum strain S299 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2172	2172	99%	0.0	93%	NR_117043.1
☐	Enterococcus moraviensis strain NBRC 100710 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2100	2100	99%	0.0	92%	NR_113937.1
☐	Enterococcus haemoperoxidus strain NBRC 100709 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2100	2100	99%	0.0	92%	NR_113936.1
☐	Enterococcus termitis strain LMG 8895 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2093	2093	99%	0.0	92%	NR_042406.1
☐	Enterococcus rotai strain CCM 4630 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2093	2093	99%	0.0	92%	NR_108137.1

Amostra 21: *Staphylococcus epidermidis*



	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Staphylococcus epidermidis strain NBRC 100911 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2300	2300	96%	0.0	96%	NR_113957.1
☐	Staphylococcus epidermidis strain Fussel 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2298	2298	96%	0.0	96%	NR_036904.1
☐	Staphylococcus epidermidis RP62A strain RP62A 16S ribosomal RNA, complete sequence	2292	2292	96%	0.0	96%	NR_074995.1
☐	Staphylococcus capitis subsp. urealyticus strain MAW 8436 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2270	2270	96%	0.0	95%	NR_027519.1
☐	Staphylococcus capitis subsp. capitis strain JCM 2420 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2265	2265	96%	0.0	95%	NR_113348.1
☐	Staphylococcus capitis strain LK 499 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2265	2265	96%	0.0	95%	NR_036775.1
☐	Staphylococcus caprae strain ATCC 35538 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2259	2259	96%	0.0	95%	NR_024665.1
☐	Staphylococcus saccharolyticus strain JCM 1768 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2254	2254	96%	0.0	95%	NR_113405.1
☐	Staphylococcus caprae strain DSM 20608 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2254	2254	96%	0.0	95%	NR_119252.1
☐	Staphylococcus saccharolyticus strain S 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2254	2254	96%	0.0	95%	NR_029158.1

Amostra 22: *Enterococcus faecalis*

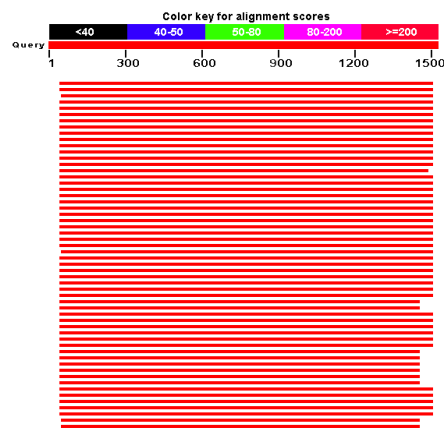


Sequência original:

```
NNNNNNNCGNNTGNTCNCTNTTAACCCCTGACTCAAAAAGGTTACCTCACCAGCTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAG
GCCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGAAGAGCTTTAA
GAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGTACTTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTGATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCT
TCCTCCGGTTTGTACCGGCGAGTCTCGTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGAC
ACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAACGANGTCNNNNCTGTGTAAGG
ATGTCTTCGCGTATCGCTTGCGAATTAACACACATTGCTCCGACTCACTTNGTGCGGAACCGCCCGTCACATGCCGTTTGAGTTTCAANTCCTATGCGGAAAGTA
CCTCCCGCTCAGGCAGGAGGTGATTAATTGCGACTGCTGCAGTCACTGAAGGGCGGAAACCCGCCAACACTTAGCAATCATCGTGTACGGCGCGGACTACCA
GGGTAGCTAATACTGAAGGATCCCCAGTGCGAAGGCGGCTTTCGAGCCTCAGAGTCACTTACAGACTCAGAGAGCCGCCGAGCAACAGGTGTTACATCCATA
TATCTACTGCATGCCGTAACGCTACACATGGAATAAGCACTCTACTTCTCCACTCAAGTCTCCTCAAGTTTCAAAAACGACCTCCCCGGGTTGAGCCGGAGG
GCTTTCACATCAGACTTAAGAAAACGCAATGCGCTCGCGTTACGCCCAAATAAATCCGACAACGCTTGACACTCGAACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAG
TTAGCCGTGGCTTTTNNNTGGTTAGATACCGTCAGGGGACGTTCAAGTTACTAACGTCCTTGTCTTCTCTAACAACAGAGTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACT
CAGCGGGCGTTGCTCGGTGACACTTTGTCCTATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCTCCTGAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAAGTGTGCGCCGATCAC
CCTCTCAGGTGCGGTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCA
CTCTTATGCCATGCGGCATAAACTGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTATCCCCCTCTGATGGGTAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCGCCCA
CTCCTCTTCCAATTGAGTGCAAGCACTCGGGAGGAAAGAAGCGTCGACTGCATGTATTAGCNCNNNGNANNNNNNN
```

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2106	2106	97%	0.0	93%	NR_115765.1
☐	Enterococcus faecalis V583 strain V583 16S ribosomal RNA, complete sequence	2100	2100	97%	0.0	93%	NR_074637.1
☐	Enterococcus faecalis strain LMG 7937 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2093	2093	97%	0.0	93%	NR_114782.1
☐	Enterococcus faecalis strain JCM 5803 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2073	2073	97%	0.0	92%	NR_040789.1
☐	Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2067	2067	95%	0.0	93%	NR_113901.1
☐	Enterococcus rivorum strain S299 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1980	1980	97%	0.0	91%	NR_117043.1
☐	Enterococcus moraviensis strain NBRC 100710 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1908	1908	97%	0.0	90%	NR_113937.1
☐	Enterococcus haemoperoxidus strain NBRC 100709 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1908	1908	97%	0.0	90%	NR_113936.1
☐	Enterococcus rotai strain CCM 4630 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1901	1901	97%	0.0	90%	NR_108137.1
☐	Enterococcus termitis strain LMG 8895 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1895	1895	96%	0.0	90%	NR_042406.1

Amostra 23: *Enterococcus faecalis*



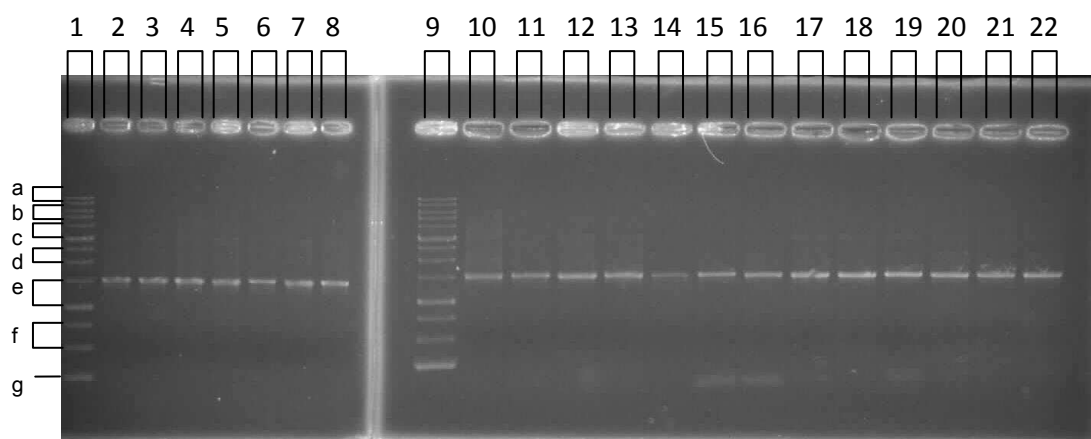
Sequência original:

```
ANNNNNNNNTTTAACCTNTAAACCCCTTATACCATAACGTACATATCCCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCG
GGAACGTATTCACCGCGCGCTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAAGCTTTAAGAGAT
TTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGTAATTTCCCATTTGATGACGCTGTGTAGCCCAGGTGATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTC
CGGTTTGTACCGGCGAGTCTCGCTAGAGTGCCCACTAAATGATGGCACTAACAAATAAGGGTTCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGA
GCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTTGTCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGGATGTACATTAGACCTGGCTACAAGTTCTTCGC
TGAGTGCTTAGATATGAAACCACATGCCTCCACTCGCTTGTGACTGGAGCCCAAGTCAATGCCGTTTGAGTTTCAACCTAGCAGTAAGTACTCCCCAGACGCGAG
TGCATAATACCTTTAAATTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCTACAACACTTATGCACTCATAGTTTACGGCGGATGGACTAACAGGGGAGTCTAATCCTCTGGG
CTACCCACGCTTTTCGAGCCTCAGAGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCCGTAGCCACCGGTGATTGCACTCACATATATCTACGCATTGCTACCCGCTACACATG
GAATAGCACTGTAGTCGCCTCTTCTCCACTCAAGTGTGCTCCAGTCTCCAACGACACCTCCCCGGGGTGAGCCGGGAGGGCGTCCGCATCAGATGATTAAGAAA
ACAGCAATGCGCACGGCTGTACGCCCAATAAATCCGGAACAACGCGTGTCAATTCATAAGTATTAACAGCAAGCTGCTGGCAGCGTAGNTTAGCCGCTGGCTTTC
TGTTTAGATACCGTCAGGGGACGTTCAAGTACTAACGTCCTTGTCTTCTCTAACAACAGAGTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGG
TCAGACTTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCCTCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAGGTCGGCTAT
GCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTCACTCTTATGCCATGCGGC
ATAAACTGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTATCCCCCTCTGATGGGTAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCGNCNCTCCTCTTTCCAATTGA
GTGCAAGCACTCGGGAGGAAAGAAGCNTCGACTGCATGTATAGCNNNNNGCNAATTGNNNN
```

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2054	2054	95%	0.0	93%	NR_115765.1
☐	Enterococcus faecalis V583 strain V583 16S ribosomal RNA, complete sequence	2049	2049	95%	0.0	92%	NR_074637.1
☐	Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2043	2043	95%	0.0	92%	NR_113901.1
☐	Enterococcus faecalis strain LMG 7937 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2041	2041	95%	0.0	92%	NR_114782.1
☐	Enterococcus faecalis strain JCM 5803 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2023	2023	95%	0.0	92%	NR_040789.1
☐	Enterococcus rivorum strain S299 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1934	1934	95%	0.0	91%	NR_117043.1
☐	Enterococcus moraviensis strain NBRC 100710 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1873	1873	95%	0.0	90%	NR_113937.1
☐	Enterococcus haemoperoxidus strain NBRC 100709 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1873	1873	95%	0.0	90%	NR_113936.1
☐	Enterococcus rotai strain CCM 4630 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1866	1866	95%	0.0	90%	NR_108137.1
☐	Enterococcus silesiacus strain R-23712 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1860	1860	95%	0.0	90%	NR_042405.1

Anexo D: Gel de Eletroforese do gene 16S do rDNA

Amplificação do gene 16S dos *Enterococcus faecalis*. A banda de maior intensidade representa, de acordo com o marcador utilizado, que todas amostras analisadas amplificaram um fragmento de aproximadamente 1500pb. As amostras Sta7, EnT3 e EnM92 não constam neste gel porque o envio das amostras pra Coréia ocorreu duas vezes, na primeira apenas estes três isolados apresentaram resultados satisfatórios, os demais precisaram ser refeitos e reencaminhados pro sequenciamento.



Os números representam a identificação das amostras e as letras o tamanho da banda em números de pares de bases, compreendendo 2 valores por letras (superior e inferior apenas por questões estéticas).

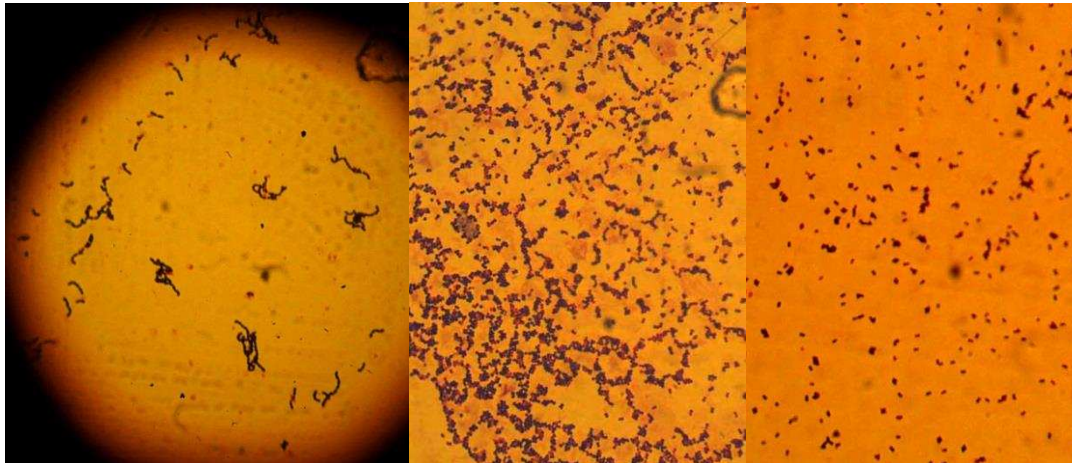
1 = marcador molecular, 2 = EnT3, 3 = Sta1, 4 = Sta2, 5 = Sta3, 6 = Sta4, 7 = Sta5, 8 = EnM33, 9 = marcador molecular, 10 = EnT1, 11 = EnT2, 12 = Sta6, 13 = EnT4, 14 = Sta8, 15 = EnM32, 16 = Sta9, 17 = Sta10, 18 = Sta11, 19 = EnM91, 20 = Sta12, 21 = EnM61 e 22 = EnM34.

a = 10.000 e 8.000, b = 6.000 e 5.000, c = 4.000 e 3.000, d = 2.500 e 2.000, e = 1.5000 e 1.000, f = 750 e 500 e g = 250.

Anexo E: Coloração de Gram dos diferentes isolados obtidos.

Morfologia dos isolados do leite humano pela técnica de coloração de Gram.

(a) *Enterococcus faecalis* EnM34; (b) *Staphylococcus epidermidis* Sta1 e; (c) *Staphylococcus lugdunensis* Sta5.



(a) *E. faecalis*

(b) *S. epidermidis*

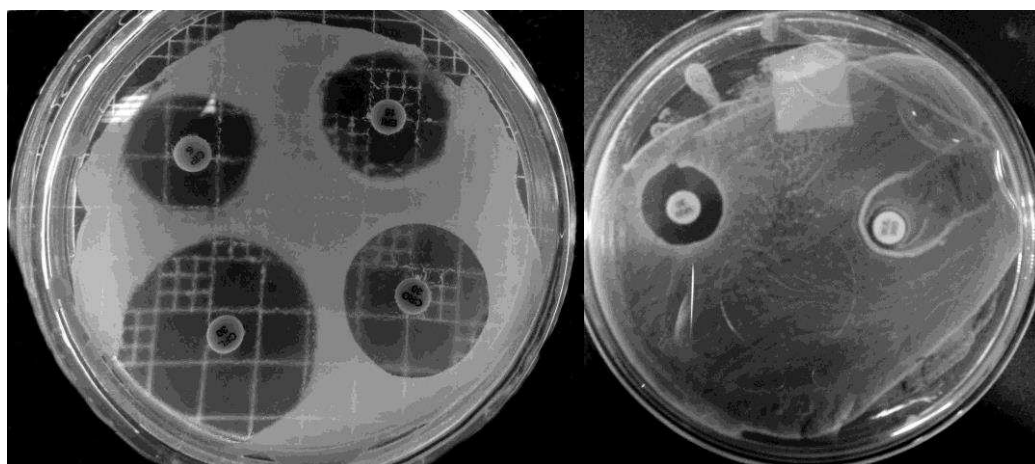
(c) *S. lugdunensis*

Anexo F: Classificação da susceptibilidade a antibióticos para *Enterococcus* spp.

Relação dos diâmetros do halo de inibição para classificação da susceptibilidade a antibióticos para *Enterococcus* spp. de acordo com NCCLS 2003 e tabela padrão (SENSIFAR®)

Antibiótico	Diâmetro do halo de inibição em mm		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Amicacina (AMI)	≤ 14	15 – 16	≥ 17
Ampicilina (AMP)	≤ 16	-	≥ 17
Cefalexina (CFE)	≤ 14	15 – 17	≥ 18
Vancomicina (VAN)	≤ 14	15 – 16	≥ 17
Meropenem (MER)	≤ 13	14- 15	≥ 16
Gentamicina (GEN)	≤ 6	7 – 9	≥ 10
Oxacilina (OXA)	≤ 10	11 – 12	≥ 13
Cefalotina (CFL)	≤ 14	15 – 17	≥ 18
Eritromicina (ERI)	≤ 13	14 – 22	≥ 23
Sulfonaminas (SUL)	≤ 12	13 – 16	≥ 17
Penicilina (PEN)	≤ 14	-	≥ 15
Ceftriaxona (CRO)	≤ 13	14 – 20	≥ 21
Ciprofloxacina (CIP)	≤ 15	16 – 20	≥ 21
Amoxicilina (AMO)	≤ 19	-	≥ 20

Ilustração do halo de inibição desenvolvido por diferentes antibióticos frente ao controle *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (a) e presença e ausência do halo de inibição de *Enterococcus* spp (b).



(a)

(b)

Anexo G: Origem, identificação e nomeação dos isolados

1. Rastreamento dos isolados selecionados pelas características fenotípicas de acordo com a mãe e tempo de maturação.

Mãe	Tempo						Identificação
	11	15	21	30	60	90	UFVCC
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	1	-	-	-	-	1180
3	-	-	-	-	-	2	1188, 1189
4	-	-	-	-	1	-	1187
5	-	2	-	3	-	-	1181,1182, 1183,1185 e 1186
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	1	-	-	1184
12	4	-	-	-	-	-	1179, 1194, 1195, 1198
13	-	5	-	-	-	-	1190, 1192, 1193, 1196, 1200
14	-	-	4	-	-	-	1191, 1197,1199, 1201

2. Relação da origem dos isolados, bem como a nomenclatura utilizada nesta dissertação e nomeação na Coleção de Culturas da Universidade Federal de Viçosa (UFVCC) do laboratório de Culturas Láticas.

Identidade	Nomenclatura	UFVCC
EnT11.1 M12	EnT1	1179
EnT15 M2	EnT2	1180
EnT15.1 M5	EnT3	1181
EnT15.2 M5	EnT4	1182
EnM30.1 M5	EnM31	1183
EnM30 M11	EnM32	1184
EnM30.2 M5	EnM33	1185
EnM30.3 M5	EnM34	1186
EnM60 M4	EnM61	1187
EnM90.1 M3	EnM91	1188
EnM90.2 M3	EnM92	1189
StaT.1 M13	Sta1	1190
StaM21.1 M14	Sta2	1191
StaT.2 M13	Sta3	1192
StaT.3 M13	Sta4	1193
StaT11.1 M12	Sta5	1194
StaT11.2 M12	Sta6	1195
StaT.4 M13	Sta7	1196
StaM21.2 M14	Sta8	1197
StaT11.3 M12	Sta9	1198
StaM21.3 M14	Sta10	1199
StaT.5 M13	Sta11	1200
StaM21.4 M14	Sta12	1201

APÊNDICE

Quadro 1. Dados de absorvância (600 nm) obtidos na curva de crescimento dos isolados de *Enterococcus faecalis* em caldo MRS (controle) e caldo MRS adicionado de 0,3% de oxgall (Oxgall), a 37 °C.

Amostra		Controle					Oxgall			
		0	2	4	6		0	2	4	6
EnT1	1	0,052	0,165	0,45	0,672	1	0,114	0,146	0,43	0,575
	2	0,042	0,176	0,364	0,586	2	0,038	0,136	0,207	0,299
	Média	0,047	0,171	0,407	0,629	Média	0,076	0,141	0,318	0,437
EnT2	1	0,066	0,316	0,698	1,017	1	0,042	0,159	0,395	0,677
	2	0,038	0,315	0,84	1,002	2	0,050	0,174	0,497	0,66
	Média	0,052	0,315	0,769	1,01	Média	0,046	0,167	0,446	0,668
EnT3	1	0,077	0,291	0,734	1,037	1	0,059	0,151	0,39	0,663
	2	0,059	0,351	0,89	1,015	2	0,061	0,178	0,516	0,667
	Média	0,068	0,321	0,812	1,026	Média	0,060	0,165	0,453	0,665
EnT4	1	0,058	0,196	0,684	1,015	1	0,063	0,145	0,448	0,651
	2	0,045	0,154	0,519	0,865	2	0,068	0,101	0,288	0,529
	Média	0,052	0,175	0,601	0,94	Média	0,065	0,123	0,368	0,59
EnM31	1	0,045	0,291	0,714	1,015	1	0,052	0,168	0,387	0,673
	2	0,053	0,316	0,845	1,01	2	0,04	0,178	0,512	0,654
	Média	0,049	0,303	0,779	1,012	Média	0,046	0,173	0,449	0,663
EnM32	1	0,055	0,225	0,734	1,012	1	0,062	0,142	0,426	0,665
	2	0,06	0,178	0,708	1,005	2	0,075	0,105	0,418	0,691
	Média	0,058	0,202	0,721	1,009	Média	0,068	0,124	0,422	0,678
EnM33	1	0,057	0,198	0,707	1,012	1	0,041	0,122	0,386	0,653
	2	0,034	0,142	0,553	0,897	2	0,056	0,094	0,284	0,532
	Média	0,046	0,170	0,63	0,955	Média	0,048	0,108	0,335	0,592
EnM34	1	0,055	0,219	0,774	1,075	1	0,035	0,111	0,446	0,63
	2	0,045	0,176	0,603	0,97	2	0,053	0,094	0,306	0,624
	Média	0,05	0,197	0,688	0,994	Média	0,442	0,103	0,376	0,627
EnM61	1	0,042	0,178	0,743	1,01	1	0,038	0,088	0,422	0,636
	2	0,066	0,238	0,703	0,927	2	0,049	0,131	0,380	0,553
	Média	0,054	0,208	0,723	0,969	Média	0,044	0,11	0,401	0,594
EnM91	1	0,055	0,176	0,73	0,99	1	0,028	0,104	0,417	0,669
	2	0,045	0,156	0,602	0,932	2	0,054	0,121	0,318	0,573
	Média	0,05	0,166	0,666	0,961	Média	0,041	0,112	0,367	0,621
EnM92	1	0,050	0,163	0,711	0,98	1	0,039	0,078	0,415	0,67
	2	0,042	0,180	0,642	0,917	2	0,069	0,11	0,342	0,576
	Média	0,046	0,172	0,676	0,949	Média	0,054	0,094	0,378	0,623

Quadro 2. Sobrevivência dos isolados de *Enterococcus faecalis* em suco gástrico artificial (pH2,0) após 0, 15, 30, 60 e 90 minutos.

		T0	T15	T30	T60	T90
EnT1	1	7,88	> 6	> 4	> 4	> 2
	2	7,9	7,51	6,98	5,94	4,49
	Média	7,91	7,51	6,98	5,94	4,49
EnT2	1	7,79	> 6	> 4	> 4	> 2
	2	7,68	7,34	7,51	7,25	7,27
	Média	7,74	7,34	7,51	7,25	7,27
EnT3	1	7,92	> 6	> 4	> 4	> 2
	2	7,5	7,54	7,47	7,51	6,97
	Média	7,76	7,54	7,47	7,51	6,97
EnT4	1	7,46	7,35	> 4	> 4	> 2
	2	7,43	7,17	7,41	7,23	6,9
	Média	7,45	7,27	7,41	7,23	6,9
EnM 31	1	7,83	> 6	> 4	> 4	> 2
	2	7,26	7,39	7,4	6,36	3,41
	Média	7,63	7,39	7,4	6,36	3,41
EnM 32	1	8,04	> 6	> 4	> 4	> 2
	2	7,68	7,49	7,49	7,41	6,15
	Média	8,2	7,49	7,57	7,41	6,15
EnM 33	1	7,61	7,53	> 4	> 4	> 2
	2	7,5	7,43	7,36	7,04	6,82
	Média	7,56	7,48	7,36	7,04	6,82
EnM 34	1	8,47	7,5	> 4	1,96	0
	2	7,39	7,45	7,25	2,14	0
	Média	8,2	7,47	7,25	2,06	0
EnM 61	1	7,8	7,5	> 4	> 4	> 2
	2	7,54	7,51	7,6	6,76	4,4
	média	7,7	7,51	7,6	6,76	4,4
EnM 91	1	7,64	7,58	> 4	> 4	> 2
	2	7,49	7,54	7,76	7,67	7,59
	Média	7,72	7,56	7,76	7,67	7,59
EnM 92	1	7,67	7,46	> 4	> 4	> 2
	2	7,57	7,34	7,56	7,3	2,42
	Média	7,62	7,4	7,56	7,3	2,42

Quadro 3- Dados referentes ao tamanho do halo de inibição (em cm) da suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de *Enterococcus faecalis* a 14 antibióticos utilizados na UTI neonatal de Viçosa, MG.

Isolado	Repetição	AMP	AMI	AMO	CFE	CFL	CRO	CIP	ERI	GEN	MER	OXA	PEN	SUL	VAN
EnT1	1	3,15	0	3	1,6	1,9	2,35	1,5	2,3	0	2,5	0,95	2,2	0	1,4
	2	2,95	0	2,75	1,55	1,85	1,95	1,55	2,15	0	2	1	2,4	0	1,4
	Média	3,05	0	2,875	1,575	1,88	2,15	1,53	2,23	0	2,25	0,98	2,3	0	1,4
EnT2	1	3,25	0	3,3	1,7	2	2,15	1,8	2,3	0	2,25	1,05	2,25	0	1,3
	2	2,85	0	3,05	1,95	1,85	2,05	1,75	2,35	0	2,05	0,9	2,2	0	1,45
	Média	3,05	0	3,175	1,825	1,93	2,1	1,78	2,33	0	2,15	0,98	2,23	0	1,38
EnT3	1	3,05	0	3	2	1,85	2,2	1,8	2,45	0	2,3	1,2	2,5	0	1,35
	2	3	0	3	1,55	1,95	1,75	1,75	2,05	0	2,1	1	2,3	0	1,55
	Média	3,025	0	3	1,775	1,9	1,98	1,78	2,25	0	2,2	1,1	2,4	0	1,45
EnT4	1	3,2	0	3,3	1,6	1,9	1,9	1,7	2,55	0	2,35	1	2,4	0	1,35
	2	3,05	0	2,9	1,65	1,8	1,7	1,8	2,25	0	2,05	1,05	2,45	0	1,5
	Média	3,125	0	3,1	1,625	1,85	1,8	1,75	2,4	0	2,2	1,03	2,43	0	1,43
EnM31	1	3,25	0	2,9	1,9	2,2	1,9	1,8	2,45	0	2,35	1,05	2,2	0	1,45
	2	2,95	0	3,1	1,6	2,05	1,7	1,75	2,05	0	2	0,95	2,35	0	1,3
	Média	3,1	0	3	1,75	2,13	1,8	1,78	2,25	0	2,18	1	2,28	0	1,38
EnM32	1	3,05	0	3	1,65	2,15	2,45	1,6	2,6	0	2,05	1,1	2,1	0	1,55
	2	2,75	0	2,8	1,95	2,1	2,5	1,5	2,65	0	2,05	1,05	2	0	1,5
	Média	2,9	0	2,9	1,8	2,13	2,48	1,55	2,63	0	2,05	1,08	2,05	0	1,53
EnM33	1	2,9	0	3	1,95	2	2,25	1,75	2,35	0	2	1	2,1	0	1,5
	2	3	0	2,95	1,65	1,95	1,85	1,6	2,1	0	2,1	0,95	2,15	0	1,45
	Média	2,95	0	2,975	1,8	1,98	2,05	1,68	2,23	0	2,05	0,98	2,13	0	1,48
EnM34	1	3,4	0	3,1	1,95	2,1	2,5	1,9	2,55	0	2,4	1	2,65	0	1,6
	2	2,9	0	3,15	1,8	2	2	1,7	2,65	0	2,3	1,05	2,4	0	1,55
	Média	3,15	0	3,125	1,875	2,05	2,25	1,8	2,6	0	2,35	1,03	2,53	0	1,58
EnM61	1	3	0	3	1,8	2,2	2,3	1,5	2,55	0	2,5	2,1	2,15	0	1,45
	2	2,9	0	3	2	2,1	2,45	1,45	2,35	0	2,35	1,75	2,25	0	1,65
	Média	2,95	0	3	1,9	2,15	2,38	1,48	2,45	0	2,43	1,93	2,2	0	1,55

Quadro 3 (Continuação). Dados referentes ao tamanho do halo de inibição (em cm) da suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de *Enterococcus faecalis* a 14 antibióticos utilizados na UTI neonatal de Viçosa, MG.

Isolado	Repetição	AMP	AMI	AMO	CFE	CFL	CRO	CIP	ERI	GEN	MER	OXA	PEN	SUL	VAN
EnM91	1	3	0	2,65	2	1,95	2,2	1,65	2,3	0	2,05	1,3	2,05	0	1,4
	2	3,1	0	3	1,65	1,95	2,25	1,75	2,5	0	2,4	1,05	2,4	0	1,4
	Média	3,05	0	2,825	1,825	1,95	2,23	1,7	2,4	0	2,23	1,18	2,23	0	1,4
EnM92	1	3,05	0	2,75	1,75	2,05	2	1,4	2,55	0	1,85	1,2	2	0	1,2
	2	3,1	0	2,9	1,6	1,9	2,1	1,55	2,35	0	2,1	1,15	2,25	0	1,45
	Média	3,075	0	2,825	1,675	1,98	2,05	1,48	2,45	0	1,98	1,18	2,13	0	1,33
<i>S. aureus</i>	1	3,7	2,1	3,3	3,3	3	2,6	2,1	2,3	2,1	3,5	2,6	3,9	0	1,4
	2	3,7	2,2	3,2	3,1	3,4	2,7	2,1	2,3	2	3,4	2,7	3,6	0	1,5
	Média	3,7	2,15	3,25	3,2	3,2	2,65	2,1	2,3	2,05	3,45	2,65	3,75	0	1,45

Quadro 4.1.A. Porcentagem de células mortas dos isolados de *Enterococcus faecalis* frente a exposição em soro ativo (At), soro inativado termicamente (DT) e MRS (controle), pela técnica de citometria de fluxo.

Tratamento	Rep	EnT1	EnT2	EnT3	EnT4	EnM31	EnM32	EnM33	EnM34	EnM61	EnM91	EnM92
Soro At	1	17,9	2,13	0,82	38	1,42	2,97	7,38	8,09	0,65	2,23	2,04
	2	21,1	2,14	0,69	28,4	0,96	5,04	3,97	17,5	1,11	4,91	1,54
	3	18,6	3,92	0,92	16,9	1,22	7,05	14,5	12,7	0,16	6,99	1,05
	Média	19,2	2,73	0,81	27,77	1,2	5,02	8,62	12,76	0,64	4,71	1,54
Soro DT	1	24,8	12,3	9,65	10,1	16,1	8,03	23,1	31,7	3,75	11,3	1,17
	2	20,4	10,1	8,56	8,71	12	9,35	30,4	42,9	3,48	12,2	2,66
	3	12,7	11,8	9,18	9,75	12,2	15,5	37	45,6	3,7	13,1	3,97
	Média	19,3	11,4	9,13	9,52	13,43	10,96	30,17	40,07	3,64	12,2	2,6
MRS	1	2,22	0,33	0,38	0,37	0,46	0,47	0,33	0,53	0,27	0,45	2,68
	2	1,43	0,28	0,43	0,83	1,99	0,34	0,26	0,47	0,33	0,49	1,52
	3	1,5	0,52	0,2	0,86	0,67	0,47	0,57	0,37	0,37	0,86	1,52
	Média	1,72	0,38	0,34	0,69	1,04	0,43	0,39	0,46	0,32	0,6	1,91

Quadro 4.1.B. Porcentagem de células mortas de *Lactobacillus gasser* (AJ02 e AJ36), *Cronobacter sakazakii* (ATCC 7006 e 7008) e *S. aureus* (ATCC 25923) frente a exposição em soro ativo (At), soro inativado termicamente (DT) e MRS (controle), pela técnica de citometria de fluxo.

Tratamento	Repetição	AJ02	AJ36	7006	7008	<i>S. aureus</i>
Soro At	1	2,12	14,4	3,69	6,39	6,68
	2	4,05	21,7	3,84	5	9,97
	3	5,19	17,2	3,88	6,03	0,45
	Média	3,79	17,76	3,8	5,81	5,7
Soro DT	1	4,57	1,91	3,6	11,2	17,8
	2	2,04	1,85	3,29	8,15	15,6
	3	1,36	4,44	5,52	9,46	16,57
	Média	2,66	2,73	4,14	9,6	16,67
MRS/ BHI*	1	0,7	2,29	7,98	3,67	6,14
	2	0,72	0,96	3,02	3,44	7,18
	3	0,72	1,46	4,01	3,07	4,43
	Média	0,71	1,57	5	3,39	5,91

* MRS para AJ02 e AJ36; BHI para 7006, 7008 e *S. aureus*.

Quadro 4.2.A. Porcentagem de inibição dos isolados de *Enterococcus faecalis* frente a exposição em soro ativo (At), soro inativado terminicamente (DT) e MRS (controle), pela técnica de plaqueamento.

Tratamento	Rep	EnT1	EnT2	EnT3	EnT4	EnM31	EnM32	EnM33	EnM34	EnM61	EnM91	EnM92
Soro At	1	6,08	7,88	7,81	8	8,01	8	8,11	8,01	7,85	8,08	7,87
	2	8,52	7,96	7,74	7,61	7,8	7,34	7,87	7,68	7,37	7,52	7,43
	3	7,1	8,08	8,06	8,59	8	7,84	8	7,89	7,81	7,79	7,74
	Média	7,23	7,97	7,87	8,07	7,94	7,73	7,99	7,86	7,68	7,8	7,68
Soro DT	1	6,41	7,76	7,69	8,32	7,87	7,67	7,82	8,11	8,11	7,72	7,73
	2	6,98	7,83	7,56	7,51	7,54	7,34	7,61	7,46	7,15	7,25	7,33
	3	6,88	7,72	7,82	7,73	7,74	7,57	7,99	7,79	7,56	7,66	7,63
	Média	6,76	7,77	7,69	7,85	7,72	7,53	7,81	7,71	7,61	7,54	7,56
MRS	1	7,7	8,46	8,49	9,28	8,46	8,64	8,71	8,65	8,44	8,48	8,76
	2	7,91	9,38	8,28	8,32	8,39	8,26	8,36	9,43	8,22	8,23	8,29
	3	7,58	8,17	8,6	8,63	8,26	7,84	8,32	8,18	8,15	8,14	8,12
	Média	7,73	8,67	8,46	8,74	8,37	8,25	8,46	8,75	8,27	8,28	8,39

Quadro 4.2.B. Porcentagem de inibição de *Lactobacillus gasseri* (AJ02 e AJ36), *Cronobacter sakazakii* (ATCC 7006 e 7008) e *S. aureus* (ATCC 25923) frente a exposição em soro ativo (At), soro inativado terminicamente (DT) e MRS (controle), pela técnica de plaqueamento.

Tratamento	Repetição	AJ02	AJ36	7006	7008	<i>S. aureus</i>
Soro At	1	7,04	< 5	< 5	< 5	7,67
	2	7,25	7,12	3,26	3,4	6,87
	3	7,18	7	2,89	5,13	7,46
	Média	7,16	7,06	3,07	4,26	7,33
Soro DT	1	6,87	6,85	6	< 5	7,6
	2	6,95	6,88	5,9	5,97	7,51
	3	7,63	6,92	> 2	> 2	7,25
	Média	7,15	6,88	5,95	5,97	7,45
MRS/ BHI*	1	6,6	6,08	< 5	6,94	5,9
	2	7,36	7,21	9,01	8,81	7,72
	3	7,28	7,73	8,3	8,52	7,62
	Média	7,08	7	8,65	8,09	6,98

* MRS para AJ02 e AJ36; BHI para 7006, 7008 e *S. aureus*.

Quadro 5 - Dados referentes ao tamanho do halo de inibição (em cm) do antagonismo dos isolados de *Enterococcus faecalis* frente a diferentes patógenos.

Patógeno		EnT1	EnT2	EnT3	EnT4	EnM31	EnM32	EnM33	EnM34	EnM61	EnM91	EnM92
<i>S. aureus</i>	1	0,77	1,42	1,57	1,27	1,15	1,25	1,7	1,52	1,6	1,6	0,95
	2	1	1,35	1,15	1,12	1,47	1,07	1,12	1,12	1,5	1,27	0,75
	Média	0,88	1,39	1,36	1,2	1,31	1,16	1,2	1,32	1,55	1,44	0,85
<i>Salmonella</i>	1	0,85	2,1	1,4	1,8	1,7	1,5	1,8	1,75	1,57	1,6	1,77
	2	1,02	1,77	1,85	1,77	0,97	1,57	1,77	1,57	1,52	1,47	1,47
	Média	0,94	1,94	1,62	1,79	1,34	1,54	1,79	1,66	1,55	1,54	1,62
<i>Listeria</i>	1	0	0,97	1,075	1,37	0	1,25	1,07	1,07	0,95	0	0
	2	0	1,37	1,175	0,97	0	1,05	1,22	1,07	1,17	0	0
	Média	0	1,17	1,12	1,17	0	1,15	1,15	1,07	1,06	0	0
<i>E. coli</i>	1	1,47	1,52	1,47	1,6	1,42	1,37	1,62	1,65	1,45	1,52	1
	2	0,95	1,62	0,95	1,45	1,52	1,4	1,65	1,42	1,37	1,1	0,8
	Média	1,21	1,57	1,21	1,52	1,47	1,39	1,64	1,54	1,41	1,31	0,9