

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 25/09/2024.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

MICROBIOTA E ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS DO LEITE
MATERNO, PERFIL DE SENSIBILIDADE MICROBIANA *in vitro* E
DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS CLÁSSICAS DE
Staphylococcus sp.

DAYANE DA SILVA ZANINI

Botucatu – SP

Março de 2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

MICROBIOTA E ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS DO LEITE
MATERNO, PERFIL DE SENSIBILIDADE MICROBIANA *in vitro* E
DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS CLÁSSICAS DE
Staphylococcus sp.

DAYANE DA SILVA ZANINI

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Profº.: Dr. Helio Langoni

Coorientador: Profº. Dr. Juliano
Gonçalves Pereira

Botucatu – SP

Março de 2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Zanini, Dayane da Silva.

Microbiota e aspectos físico-químicos do leite materno, perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* e detecção de genes de enterotoxinas clássicas de *Staphylococcus sp.* / Dayane da Silva Zanini. - Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

Orientador: Hélio Langoni

Coorientador: Juliano Gonçalves Pereira

Capes: 50502000

1. Bancos de leite humano. 2. Leite humano. 3. Ecologia microbiana. 4. Resistência a Múltiplos Medicamentos.

Palavras-chave: Banco de leite humano; Leite materno; Microbiota; Multirresistência.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Título da dissertação – Microbiota e aspectos físico-químicos do leite materno, perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* e detecção de genes de enterotoxinas clássicas de *Staphylococcus* sp.

Impacto científico e social esperado: O presente estudo é relevante na medida em que se procurou avaliar os aspectos da qualidade do leite de nutrizes que doam o seu leite excedente para o Bando de Leite humano. Dessa forma os resultados obtidos podem oferecer a possibilidade, na dependência do resultado obtido com relação a sua qualidade, de realizar atividades de educação em saúde no sentido de possibilitar a obtenção de um produto a ser utilizado por lactentes livres de patógenos que podem causar gastroenterites devido ao seu consumo.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Dissertation title - Microbiota and physicochemical aspects of breast milk, in vitro microbial sensitivity profile and detection of classical enterotoxin genes from *Staphylococcus* sp.

Expected scientific and social impact: The present study is relevant in that it sought to evaluate aspects of the quality of milk from mothers who donate their milk to the Human Milk Bank. In this way, the results obtained may offer the possibility, depending on the result obtained in relation to its quality, of carrying out health education activities in order to enable the obtaining of a product to be used by infants free of pathogens that can cause gastroenteritis due to your consumption.

Autor: Dayane da Silva Zanini

Título: Microbiota e aspectos físico-químicos do leite materno, perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* e detecção de genes de enterotoxinas clássicas de *Staphylococcus* sp.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Helio Langoni

Presidente e orientador

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Botucatu, SP, Brasil

Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia Mores Rall

Membro

Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Botucatu, SP, Brasil

Prof. Dr. Igor Mansur Muniz

Membro

Departamento de Medicina Veterinária

Universidade Federal de Rondônia

Rolim de Moura, RO, Brasil

Data da Defesa: 25 de março de 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Maria e Walter, por sempre me apoiarem nas minhas escolhas e pelos caminhos trilhados, mesmo tão longe.

Agradeço aos meus orientadores:

Obrigada professor Helio Langoni por me receber no laboratório ainda em 2019, para o período de estágio, e me dar a oportunidade de conhecer o que foi minha casa por quatro anos, o Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses, onde tive meu crescimento pessoal e profissional durante esses anos.

Obrigada professor Juliano Gonçalves Pereira por também me receber no Serviço de Orientação a Alimentação Pública (SOAP) em 2019 e permitir conhecer mais do fantástico mundo da microbiologia de alimentos, e em 2022 aceitar me coorientar durante a jornada do mestrado.

Aos dois, agradeço muito pela paciência, orientações, todos os ensinamentos e a oportunidade de fazer parte de suas equipes.

Agradeço aos amigos e companheiros de laboratório que me acompanharam nesse período, Caroline, Gustavo, Gabrielle, Gismelli, Raquel, Danilo, Victória, Bruna e professor Felipe Fornazari. O apoio de vocês foi fundamental.

Agradeço ao amigo Dr. Benedito Donizete Menozzi pelo apoio, pelos conhecimentos compartilhados, pelos conselhos. Você é um grande profissional.

Agradeço a equipe do SOAP, em especial ao residente Lucas e ao Dr. Wanderson Teixeira, por toda ajuda que foi fundamental para a realização do trabalho.

Aos professores colaboradores da pesquisa, professora Vera Lúcia Mores Rall, Marcos Veiga dos Santos e ao pós-graduando Carlos Fidelis.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva, e à FMVZ/Unesp, Botucatu.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa.

“Quando sentimos medo, é sinal de que a vida está começando a nos tratar com mais intimidade.”

Alessandro D’Avenia (Livro - Coisas que ninguém sabe)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 <i>Primers</i> usados na PCR para amplificação de genes de enterotoxinas em <i>Staphylococcus</i> spp.....	24
Tabela 2 Espécies e frequência de micro-organismos identificados por espectrometria de massas (MALDI-TOF MS) em amostras de leite humano de Banco de Leite de Hospital Universitário.....	26
Tabela 3 Perfil de sensibilidade microbiana <i>in vitro</i> de isolados bacterianos encontrados no leite materno de Banco de Leite humano de Hospital Universitário.....	32
Tabela 4 Perfil de resistência <i>in vitro</i> aos antimicrobianos de oito gêneros bacterianos isolados de leite materno de Banco de Leite humano de Hospital Universitário.....	33
Tabela 4 Perfil de resistência <i>in vitro</i> aos antimicrobianos de oito gêneros bacterianos isolados de leite materno de Banco de Leite humano de Hospital Universitário (continuação).....	34

LISTA DE FIGURAS

Fig.1 Frequência de gêneros microbianos identificados em 112 amostras de leite humano de Banco de Leite de Hospital Universitário.....	27
Fig. 2 Frequência dos micro-organismos isolados em associação.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS

°C = Graus Celsius

ml = mililitro

µl = microlitro

UFC = unidades formadoras de colônias

µg = micrograma

rpm = rotações por minuto

DNA = ácido desoxirribonucléico

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

pH = potencial hidrogeniônico

pb = pares de base

min = minutos

s = segundos

PCR = reação em cadeia da polimerase

SEA = Staphylococcal Enterotoxin A

SEB = Staphylococcal Enterotoxin B

SEC = Staphylococcal Enterotoxin C

SED = Staphylococcal Enterotoxin D

SEE = Staphylococcal Enterotoxin E

RDC = Resolução de Diretoria Colegiada

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Aleitamento materno	4
2.2. Composição do leite materno	6
2.3. Microbiota e influência da composição do leite	7
2.4. Resíduos de antimicrobianos e a seleção de bactérias resistentes.....	9
3. OBJETIVOS	11
3.1. Objetivo geral	11
3.2. Objetivos específicos	11
4. REFERÊNCIAS	12
CAPÍTULO 2	13
TRABALHO CIENTÍFICO	13
1. Artigo.....	17
Resumo.....	17
Introdução	18
Métodos	20
Declaração de ética	20
Amostras	20
Isolamento microbiano	21
Perfil de sensibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos	21
Identificação das espécies de micro-organismos por espectrometria de massas	22
Titulação da acidez por Método Dornic	23
Extração de DNA de <i>Staphylococcus</i> spp.....	23
Detecção molecular de enterotoxinas clássicas	24
Resultados	25
Identificação dos micro-organismos	25
Bactérias Gram-positivas	29
Enterobacterales	29

Demais micro-organismos de origem bacteriana e fúngica	29
Deteção de genes de enterotoxinas clássicas.....	30
Acidez titulável do leite pelo Método Dornic.....	30
Perfil de sensibilidade microbiana <i>in vitro</i> dos isolados	30
Discussão	35
Conclusão	39
Conflito de interesse	40
Financiamento	40
Contribuição de cada autor	40
Referências	40
Capítulo 3.....	47
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
1. Considerações finais	47

RESUMO

ZANINI, D. S. **Microbiota e aspectos físico-químicos do leite materno, perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* e detecção de genes de enterotoxinas clássicas de *Staphylococcus* sp.** 2024. 61f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho” UNESP, Botucatu, 2024.

Agências de saúde ao redor do mundo recomendam o aleitamento materno exclusivo até os seis meses de idade da criança e sua continuidade até os dois anos, devido ao papel fundamental no desenvolvimento do recém-nascido, pela sua composição rica em nutrientes. Estudos têm mostrado o papel da microbiota do alimento para o desenvolvimento intestinal do lactente. Contudo ainda não está claro o papel de alguns grupos como as enterobactérias, um grupo considerado contaminante, que pode comprometer o leite oferecido para doação. O presente estudo avaliou a presença de micro-organismos no leite materno de Banco de Leite, encaminhado para análises de rotina, e identificou os micro-organismos isolados por espectrometria de massas (MALDI-TOF MS), avaliou o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e detectou genes de enterotoxinas clássicas nos isolados identificados como *Staphylococcus* spp. Os resultados mostraram a identificação de 13 gêneros e 30 espécies diferentes, sendo mais recorrente *Staphylococcus* spp. O teste de sensibilidade *in vitro* ante nove antimicrobianos, revelou uma taxa de resistência dos isolados às penicilinas e derivados betalactâmicos (36%) e aos macrolídeos (45,35%). Por outro lado, houve maior eficácia da gentamicina e sulfametoxazol trimetoprim. Cinco espécies bacterianas foram multirresistentes (MDR), com maior percentual para *K. oxytoca* (66%). A pesquisa de genes de enterotoxinas clássicas (A, B, C, D e E) foi realizada por PCR convencional, resultando em seis dos 72 isolados de estafilococos, positivos para *sea*. O estudo mostrou alta variedade de micro-organismos que podem ser encontrados no leite materno, e a identificação de isolados multirresistentes alertando para o uso racional de antimicrobianos, além da presença de genes de enterotoxinas, importante fator de virulência estafilocócica.

Palavras-chaves: Leite materno, Banco de Leite humano, Microbiota, Multirresistência.

ABSTRACT

ZANINI, D. S. **Microbiota and physicochemical aspects of breast milk, *in vitro* microbial sensitivity profile and detection of classical enterotoxin genes from *Staphylococcus* sp.** 2024. 61f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho” UNESP, Botucatu, 2024.

Health agencies around the world recommend exclusive breastfeeding until the child is six months old and continued until two years of age, due to its fundamental role in the development of the newborn, due to its nutrient-rich composition. Studies have shown the role of food microbiota in infant intestinal development. However, the role of some groups such as enterobacteria, a group considered contaminating, which can compromise the milk offered for donation, is still unclear. The present study evaluated the presence of microorganisms in breast milk from Milk Banks, sent for routine analysis, and identified the microorganisms isolated by mass spectrometry (MALDI-TOF MS), evaluated the sensitivity profile to antimicrobials and detected classical enterotoxin genes in isolates identified as *Staphylococcus* spp. The results showed the identification of 13 genera and 30 different species, the most common being *Staphylococcus* spp. The *in vitro* sensitivity test against nine antimicrobials revealed a resistance rate of the isolates to penicillins and beta-lactam derivatives (36%) and macrolides (45,35%). However, there was greater efficacy of gentamicin and trimethoprim sulfamethoxazole. Five bacterial species were multidrug resistant (MDR), with the highest percentage for *K. oxytoca* (66%). The search for classical enterotoxin genes (A, B, C, D and E) was carried out using conventional PCR, resulting in six of the 72 staphylococcal isolates being positive for sea. The study showed a high variety of microorganisms that can be found in breast milk, and the identification of multi-resistant isolates, warning of the rational use of antimicrobials, in addition to the presence of enterotoxin genes, an important staphylococcal virulence factor.

Keywords: Breast milk, Human Milk Bank, Microbiota, Multidrug resistance.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

Agências governamentais de saúde pública, como a Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) recomendam o aleitamento materno exclusivo desde os primeiros minutos de vida até os seis meses de idade da criança, e sua continuidade até os dois anos, pelo papel fundamental que o leite materno representa no desenvolvimento do recém-nascido (Brasil, 2022b).

O aleitamento materno exclusivo promove benefícios para as crianças, além da formação nutricional, como o desenvolvimento cognitivo e diminuição do risco de doenças infecciosas e não-infecciosas, além de benefícios para a mãe (Zielinska; Sobczak; Hamulka, 2017). No entanto, menos da metade das crianças no mundo são amamentadas exclusivamente com o leite materno, decorrente de fatores fisiológicos ou psíquicos das mães ou condições de saúde do lactente (Brasil, 2022b).

Na impossibilidade de oferta do leite para o recém-nascido, a alternativa são os Bancos de Leite Humano que recebem a doação de mulheres em fase de lactação, que produzem leite excedente. Esse alimento passa por avaliação de sua qualidade e, posteriormente, é pasteurizado antes de sua distribuição para utilização (FIOCRUZ, 2022).

O leite materno possui microbiota diversa que é importante para o desenvolvimento da microbiota intestinal infantil e a proteção da criança contra patógenos e outras intercorrências de saúde. Entre os micro-organismos encontrados no leite estão bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium* (Fernández *et al.*, 2013).

A resistência aos antimicrobianos tem sido preocupação crescente e mundial na saúde pública. O número de bactérias multirresistentes tem aumentado decorrente da pressão de seleção pelo uso indiscriminado de antimicrobianos (FDA, 2024).

O intestino infantil possui variedade de genes de resistência com provável origem do leite materno, pois já foram observados a presença desses genes no

leite e evidências de transferência para os lactentes. A alta abundância de genes móveis de resistência pode causar riscos à saúde, pois é provável que sejam mais propensos a serem transferidos de bactérias comuns para patógenos (Pärnänen *et al.*, 2018).

Nesse contexto, o presente estudo identificou os micro-organismos presentes no leite humano, amostras provenientes de Banco de leite, identificou a frequência de bactérias com resistência microbiana *in vitro*, e o percentual de multirresistência, além da detecção molecular de enterotoxinas clássicas em estafilococos, importante fator de virulência desse grupo.

4. REFERÊNCIAS

ANDREAS, Nicholas J.; KAMPMANN, Beate; MEHRING LE-DOARE, Kirsty. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. **Early Human Development**, v. 91, n. 11, p. 629–635, 2015.

ARAÚJO, Huan Ruric Viana; de CARVALHO, Milena Tavares; IMPARATO, José Carlos Pettorossi, PINCHEMEL, Edite Novais Borges. A importância do aleitamento materno no controle do desenvolvimento de hábitos deletérios: Revisão de Literatura / The importance of breastfeeding in controlling the development of harmful habits: A Literature Review. **ID on line REVISTA DE PSICOLOGIA**, v. 13, n. 47, p. 1135–1144, 28 out. 2019.

ATYEO, Caroline; ALTER, Galit. The multifaceted roles of breast milk antibodies. **Cell**, v. 184, n. 6, p. 1486–1499, 2021.

BEGGS, Bridget; KOSHY, Liza; NEITERMAN, Elena. Women's Perceptions and Experiences of Breastfeeding: a scoping review of the literature. **BMC Public Health**, v. 21, n. 1, p. 2169, 26 dez. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde – Conselho Nacional de Saúde. **Campanha nacional busca estimular aleitamento materno**. 2022a. Disponível em: <<https://conselho.saude.gov.br/ultimas-noticias-cns/2584-campanha-nacional-busca-estimular-aleitamento-materno>>. Acesso em: 30 agosto 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. Amamentação e uso de medicamentos e outras substâncias. Ministério da Saúde, Secretaria da Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. – 2. ed. – Brasília: **Editora do Ministério da Saúde**, 2010.

BRASIL. Nações Unidas Brasil. **Semana do Aleitamento Materno 2022 debate educação e apoio**. 2022b. disponível em: <<https://brasil.un.org/pt-br/193006-semana-do-aleitamento-materno-2022-debate-educa%C3%A7%C3%A3o-e-apoio>>. Acesso em: 20 set. 2023.

BRASIL. Resolução RDC nº 171, de 4 de Setembro de 2006. Aprova o “**Regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Leite Humano**”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <https://rblh.fiocruz.br/sites/rblh.fiocruz.br/files/usuario/116/ministrio_da_sade.pdf>. Acesso em: 15 Set. 2023.

CHAVES, Roberto Gomes; LAMOUNIER, Joel Alves; CÉSAR, Cibele Comini. Medicamentos e amamentação: atualização e revisão aplicadas à clínica materno-infantil. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 25, n. 3, p. 276-288, 2007.

ERGEN, Ayşe Meltem; YALÇIN, Sıddıka Songül. Unexpected drug residuals in human milk in Ankara, capital of Turkey. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 19, n. 1, p. 348, 2019.

FERNÁNDEZ, Leónides; LANGA, Susana; MARTÍN, Virginia; MALDONADO, Antonio; JIMÉNEZ, Esther; MARTÍN, Rocío; RODRÍGUEZ, Martín M. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. **Pharmacological Research**, v. 69, n. 1, p. 1–10, mar. 2013.

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz. **Normas Técnicas e Manuais, 2021**. Disponível em: < <https://rblh.fiocruz.br/normas-tecnicas-e-manuais>>. Acesso em: 15 set. 2023.

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz. **rBLH – Brasil – Comitê de Monitoramento da Agenda 2030**. 2022. Disponível em:< <https://rblh.fiocruz.br/pagina-inicial-rede-blh>>. Acesso em: 22 set. 2023.

FDA – Food and Drug Administration. **Antimicrobial Resistance Information from FDA**. Maryland, EUA: FDA, c2024. Disponível em:< <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/mcm-issues/antimicrobial-resistance-information-fda>>. Acesso em: 05 março 2024.

de JESUS, Eduarda Barbosa; MOSCA, Tainá; FORTE, Wilma Carvalho Neves. Conhecimento materno sobre o papel imunológico protetor do leite materno para o recém-nascido/ Maternal knowledge about the protective immunological role of breast milk for the newborn. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, 2022. Disponível em: <<https://arquivosmedicos.fcmsantacasasp.edu.br/index.php/AMSCSP/article/view/760>>. Acesso em: 20 jun. 2022.

LEBEAUX, Rebecca M.; MADAN, Juliette C.; NGUYEN, Quang P.; COKER, Modupe O.; DADE, Erika F.; MOROISHI, Yuka; PALYS, Thomas J.; ROSS, Benjamin D.; PETTIGREW, Melinda M.; MORRISON, Hilary G.; KARAGAS, Margaret R.; HOEN, Anne G. Impact of antibiotics on off-target infant gut microbiota and resistance genes in cohort studies. **Pediatric Research**, v. 92, n. 6, p. 1757-1766, 2022.

LI, Xuanji; BREJNROD, Asker; THORSEN, Jonathan; ZACHARIASEN, Trine; TRIVEDI, Urwish; RUSSEL, Jakob; VESTERGAARD, Gisle Alberg; STOKHOLM, Jakob; RASMUSSEN, Morten Arendt; SØRENSEN, Søren Johannes. Differential responses of the gut microbiome and resistome to antibiotic exposures in infants and adults. **Nature Communications**, v 14, n. 8526, 16 p., 2023.

LÖNNERDAL, Bo. Bioactive proteins in breast milk. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 49, p. 1–7, 2013.

LOUREIRO, Rui João; ROQUE, Fátima; RODRIGUES, António Teixeira; HERDEIRO, Maria Teresa; RAMALHEIRA, Elmano. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Saúde única**, v. 34, n.1, p. 77-84, jan-abril 2016.

MANARINI, Thaís; PIGNATA, Eduardo; MARÇAL, Bruno. Fórmulas infantis. Modo de usar. **Saúde é Vital**, p. 47-49, fev. 2017.

MURAI, Amanda Yuki; OYAMA, Karina Tiemy; CABRERA, Giulia Davanço; ALMEIDA, Rafael Ribeiro. Tratamento de infecções hospitalares causadas pela *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) com antibióticos da classe das cefalosporinas. **Revista Brasileira de Ciências Biomédicas**, v. 3, n. 1, p. E0652022-12, 13 nov. 2022.

OLIVEIRA, Larissa Vasconcelos de; FONSECA, Rafaela Andrade; dos SANTOS NETO, Agenor Gomes; PINHEIRO, Malone Santos. Aleitamento Materno e Microbiota Intestinal Como Fatores de Proteção Contra o Desenvolvimento de Alergias em Crianças. **Caderno de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde - UNIT - SERGIPE**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 149, 2021.

PÄRNÄNEN, Katariina; KARKMAN, Antti; HULTMAN, Jenni; LYRA, Christina; BENGTTSSON-PALME, Johan; LARSSON, D. G. Joakim; RAUTAVA, Samuli; ISOLAURI, Erika; SALMINEN, Seppo; KUMAR, Himanshu; SATOKARI, Reetta; VIRTÄ, Marko. Maternal gut and breast milk microbiota affect infant gut antibiotic resistance and mobile genetic elements. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 3891, 24 set. 2018.

SANTOS JUNIOR, Wilson José Ramos. Investigação de Substâncias Psicoativas em Amostras de Leite Materno. **Dissertação** (Mestrado em Ciências - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto). São Paulo, 148 p., 2022.

SOUSA, Stephanie Maria dos Santos; BANDEIRA, Daniel Rodrigues; QUINTANILHA, Lucas Fernandes da Cunha; BALDAÇARA, Raquel Prudente de Carvalho; CAVALCANTE, Clarice Parrião Azevedo; SILVA, José Bruno Nunes Ferreira. A influência da microbiota intestinal no desenvolvimento de alergia alimentar em crianças. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, p. e293101422156, 2021.

TAMBURINI, Sabrina; SHEN, Nan; WU, Han Chih; CLEMENTE, Jose C. The microbiome in early life: implications for health outcomes. **Nature Medicine**, v. 22, n. 7, p. 713–722, 2016.

TANAKA, K.; HOSUZAWA, M.; KUDO, N.; YOSHIKAWA, N.; HISATA, K.; SHOJI, H.; SHINOHARA, K.; SHIMIZU, T. The pilot study: sphingomyelin-fortified milk has a positive association with the neurobehavioural development of very low birth weight infants during infancy, randomized control trial. **Brain and Development**, v. 35, n. 1, p. 45–52, 2012.

UNICEF – Fundo das Nações Unidas para a Infância. **De políticas favoráveis à família e a amamentação. Um sumário de evidências**. 2019. Disponível em: < <https://www.unicef.org/media/95131/file/Breastfeeding-Family-Friendly-Policies-PT.pdf> >. Acesso em: 15 set. 2023.

VICTORA, Cesar G.; BAHL, Rajiv; BARROS, Aluísio J. D.; FRANÇA, Giovanny V. A.; HORTON, Susan; KRASEVEC, Julia; MURCH, Simon; SANKAR, Mari Jeeva; WALKER, Neff; ROLLINS, Nigel C.; Lancet Breastfeeding Series Group. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. **The Lancet**, v. 387, n. 10017, p. 475–490, jan. 2016.

WALTERS, Dylan D.; PHAN, Linh T. H.; MATHISEN, Roger. The cost of not breastfeeding: global results from a new tool. **Health Policy and Planning**, v. 34, n. 6, p. 407–417, 01 jul. 2019.

ZHU, Bingquan; ZHENG, Shuangshuang; LIN, Kexin; XU, Xin; LV, Lina; ZHAO, Zhengyan; SHAO, Jie. Effects of Infant Formula Supplemented With Prebiotics and OPO on Infancy Fecal Microbiota: A Pilot Randomized Clinical Trial. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 29 mar. 2021.

ZIELIŃSKA, Monika A.; SOBCZAK, Aneta; HAMUŁKA, Jadwiga. Breastfeeding knowledge and exclusive breastfeeding of infants in first six months of life **Rocz Panstw Zakl Hig**, v. 68, n. 1, p. 51-59, 2017.

Capítulo 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Considerações finais

O uso de poucos meios de cultura associado com uma técnica moderna, de rápida execução e custos menores do que o sequenciamento do DNA, a *Matrix-assisted laser desorption/ionization- time of flight* (MALDI-TOF), permitiu a identificação de grande variedade de micro-organismos, tanto em gênero quanto em espécie, o que torna a técnica alternativa mais rápida, eficaz e com menor custos para a identificação de micro-organismos.

A presença de genes de enterotoxinas em *Staphylococcus* sp. deve ser considerada para que ocorra uma atenção quanto a manipulação e armazenamento em baixas temperaturas do leite, garantindo a utilização de um produto seguro para os lactentes.

A presença de enterobactérias no leite doado e 14% das amostras com acidez titulável maior do que a recomendada, demonstra que há falhas de higiene no momento da coleta, devendo ser reforçada a importância de uma correta extração e armazenamento do leite.

A frequência de bactérias resistentes aos antimicrobianos testados, geram preocupação quanto as opções de escolha para o tratamento de infecções em mulheres gestantes e lactantes, visto que esses grupos não podem fazer uso de alguns medicamentos, por serem contra indicados nessas ocasiões. Além disso, a colonização de bactérias com genes de resistência na microbiota intestinal de crianças, pode levar a trocas desses genes entre bactérias comensais e patogênicas.