

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 nutrízes 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
Deteção 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
Detecção 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.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aleitamento materno

O leite é uma fonte rica em nutrientes que está presente nos primeiros minutos de vida da criança, fundamental para a nutrição, proteção e adequado desenvolvimento do recém-nascido. 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 do lactente e sua continuidade até os dois anos, tendo como complemento uma alimentação variada, completando os 1000 dias imprescindíveis para a formação nutricional e desenvolvimento infantil (Araújo *et al.*, 2019; Brasil, 2022b).

Evidências mostram que 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 diminuir o risco de a mulher desenvolver diabetes tipo II e síndromes metabólicas (Zielińska *et al.*, 2017). De acordo com a Unicef (2019), em níveis recomendáveis, a amamentação poderia salvar 820.000 crianças menores de cinco anos, no mundo, além de evitar 20.000 casos de câncer de mama.

A OMS recomenda que, até o ano de 2025, pelo menos metade das mães do mundo alimentem seus filhos exclusivamente com leite materno, do nascimento aos seis meses de idade (Beggs; Koshy; Neiterman, 2021). No entanto, os dados mundiais mais recentes mostram que somente 44% das crianças se beneficiam do aleitamento materno exclusivo até os seis meses de vida (Brasil, 2022b), enquanto no Brasil, esse número é de 46%, com 60% delas sendo amamentadas até os dois anos de idade (Brasil, 2022a).

Estudo com metanálise de dados de 153 países nos períodos de 1995 a 2013, mostrou que o aleitamento de crianças até os 23 meses, tende a ser maior nos países de baixa e média renda da população geral se comparado com países com população de renda familiar maior. No entanto, nesses países, a

amamentação não é exclusiva, mesmo para lactentes menores de seis meses de idade, e a tendência é a diminuição da oferta de leite após um ano de idade (Victora *et al.*, 2016).

Os custos da restrição na amamentação das crianças, vão além da saúde das mesmas, mas também repercutem na saúde da mulher e nos custos financeiros para o Estado. Walters *et al.* (2019) utilizaram uma base de dados e mostraram que os custos de não amamentar as crianças, como recomendado pela OMS, geram cerca de 595.379 mortes de crianças por diarreias e pneumonias, enquanto 974.956 casos de obesidade infantil seriam evitáveis com amamentação exclusiva.

Para as mulheres, o aleitamento teria o potencial de prevenir 27.069 mortes futuras por câncer de mama, 13.644 por câncer de ovário e 58.230 mortes por diabetes tipo II a cada ano, enquanto os custos de tratamento de diarreias e pneumonias em crianças e diabetes tipo II em mulheres diminuiria em cerca de um bilhão de dólares por ano (Walters *et al.*, 2019).

Ainda que os benefícios da amamentação exclusiva sejam conhecidos, menos da metade das crianças são amamentadas no mundo, decorrente de fatores intrínsecos e extrínsecos à saúde. São diferentes barreiras enfrentadas pelas mulheres para que ocorra a continuidade do aleitamento, incluindo problemas fisiológicos e psicológicos, dificuldades de ter uma rede de apoio, curta licença maternidade, falta de espaços físicos adequados para amamentação, bem como barreiras interpessoais e institucionais (Beggs; Koshy; Neiterman, 2021).

Quando ocorre a interrupção ou impossibilidade do aleitamento, é necessário recorrer às fórmulas infantis, que são produzidas a base de leite de vaca, mas acrescidas de proteínas, gorduras, minerais e vitaminas, tendo indicações diferentes de acordo com a idade da criança (Manarini, 2017).

Por intercorrências no momento do nascimento, levando a uma internação do recém-nascido, se faz necessário a extração do leite para alimentação da criança. O fornecimento pode ser via Banco de Leite Humano que recebem a doação de mulheres em fase de lactação, que produzem leite excedente. O Brasil possui a maior e mais complexa rede de Bancos de Leite do mundo,

regidos e regulamentados pela resolução RDC nº 171 de 4 de setembro de 2006, com mais de 200 Bancos que recebem mais de 200.000 litros de leite ao ano (FIOCRUZ, 2022).

A RDC nº 171 estabelece os padrões de qualidade do leite doado antes do fornecimento, como avaliações de cor, odor e presença de sujidades, além do controle físico-químico do leite ordenhado e microbiológico do leite pasteurizado (Brasil, 2006).

2.2. Composição do leite materno

O leite materno é um biofluido complexo e variável, que preenche as necessidades do recém-nascido. Seus componentes antimicrobianos e imunomoduladores compensam as deficiências do sistema imunológico do lactente, impedindo a translocação de patógenos pelo trato gastrointestinal (Andreas; Kampmann; Le-Doare, 2015).

Os principais componentes do leite materno foram revisados por Andreas *et al.* (2015). Lipídeos compõem 45% a 55% da energia do leite, sendo o principal componente os triacilglicerídeos, tendo também diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, fosfolipídios e colesterol. Ácidos graxos de cadeia curta são importantes fontes de energia e participam na maturação do trato gastrointestinal do lactente. Esfingomielinas, presentes na membrana do glóbulo de gordura do leite, são especialmente importantes para mielinização do sistema nervoso e desenvolvimento neurocomportamental de recém-nascidos de baixo peso (Tanaka *et al.*, 2012; Andreas; Kampmann; Le-Doare, 2015).

São mais de 400 proteínas compondo o leite e com uma variedade de funções, desde prover nutrição até o estímulo da absorção de nutrientes e atividades antimicrobianas e imunomoduladoras. Os carboidratos, como lactose e oligossacarídeos, são fundamentais para proporcionar energia para o desenvolvimento cerebral da criança. Atuam como prebióticos, na multiplicação de bactérias benéficas, que protegem o trato gastrointestinal da criança na colonização de bactérias patogênicas, prevenindo diarreias neonatais e também infecções do trato respiratório (Andreas; Kampmann; Mehrling Le-Doare, 2015).

Além de componentes que promovem a nutrição do recém-nascido, o leite materno possui compostos que protegem o lactente no primeiro ano de vida, pois seu sistema imune adaptativo ainda não está completamente desenvolvido e ativo. Essa proteção ocorre pela transferência passiva de imunoglobulinas da mãe para a criança, primeiro por via uterina e, posteriormente, pelo aleitamento (de Jesus; Mosca; Forte, 2022).

A imunoglobulina (Ig) predominante é a imunoglobulina A em sua forma secretória (slgA), que atua ligando-se ao micro-organismo inibindo a aderência na mucosa intestinal e respiratória (de Jesus; Mosca; Forte, 2022). O fato é possível, pois a slgA é estável contra enzimas proteolíticas no intestino infantil. Outras imunoglobulinas como IgM e IgG estão presentes, mas em concentrações baixas, não sendo estáveis à digestão do trato gastrintestinal do lactente (Lönnnerdal, 2013).

Além de auxiliar no estabelecimento de microbiota intestinal saudável, os anticorpos do leite materno desempenham papel relevante na prevenção do desenvolvimento de resposta imune à bactérias comensais no intestino. Crianças alimentadas com formulações lácteas e indivíduos com deficiência de IgA apresentam aumento da inflamação intestinal (Atyeo; Alter, 2021).

2.3. Microbiota e influência da composição do leite

A presença de anticorpos no leite materno e substâncias como a lactoferrina (glicoproteína com ação moduladora, anti-inflamatória e antibiótica) promovem o desenvolvimento da microbiota intestinal do lactente. Tendo, predominantemente, a presença de bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que são transferidos pelo aleitamento e se desenvolve no intestino da criança em simbiose com estafilococos e estreptococos, promovendo proteção ao trato gastrintestinal (Oliveira *et al.*, 2021).

O leite possui microbiota diversa, incluindo bactérias ácido lácticas, estafilococos, estreptococos, enterococos e inúmeros filotipos bacterianos que são fontes para a colonização do trato gastrintestinal do lactente. Vários estudos mostraram que há transferência de mãe para filho de bactérias pertencentes, pelo menos, aos gêneros *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* e

Bifidobacterium por meio da amamentação. Essa exposição pode exercer efeitos benéficos contra doenças diarreicas e respiratórias e pode reduzir o risco de desenvolver outras doenças, como diabetes ou obesidade (Fernández *et al.*, 2013). Crianças alimentadas com fórmulas, apresentam maior proporção de *Enterobacter* spp., *Bacteroides* spp. e *Clostridium* spp. (Zhu *et al.*, 2021)

Com a introdução alimentar da criança, ocorre aumento de bactérias dos gêneros *Clostridium*, *Faecalibacterium*, *Blautia* e *Ruminococcus* que se assemelham a microbiota intestinal de adulto, sendo estabelecido equilíbrio simbiótico após os três anos de idade (Sousa *et al.*, 2021).

Quando ocorre o desequilíbrio da colonização dessas bactérias, conhecido como disbiose, a criança tende a desenvolver problemas que refletem na fase adulta, como as alergias alimentares. É observado que o aumento de anticorpos IgE, que atuam nas reações alérgicas, está associado à diminuição de *Bacteroides* e *Clostridium* (Sousa *et al.*, 2021).

Além da restrição ao leite materno e introdução de outros alimentos, um fator que interfere nesse desequilíbrio é o uso de antibióticos. A administração de antibióticos leva a uma alteração da microbiota, diminuindo a quantidade de bactérias, proporcionando aumento de vírus e fungos (Tamburini *et al.*, 2016).

Os componentes do leite são estabelecidos pela alimentação e também por influência genética. Pode haver, também, substâncias nocivas para o lactente. As glândulas mamárias são altamente irrigadas por capilares sanguíneos, o que possibilita a transferência de moléculas para o leite. Alguns fatores como, baixa ligação às proteínas plasmáticas, baixo peso molecular, alta lipofilicidade, pH levemente ácido do leite e seu alto teor lipídico, favorecem a concentração de substâncias básicas e excreção no leite, tornando este alimento importante fonte de substâncias residuais, que podem levar à contaminação do lactente à longo prazo (Santos Junior, 2022).

Muitos medicamentos têm seu uso contraindicado ou usado de forma criteriosa durante o período de amamentação, no entanto muitas classes de antimicrobianos são considerados seguros (Brasil, 2010), como alguns antimicrobianos das classes Beta-lactâmicos (Cefalosporinas), Macrolídeos

(Azitromicina), Aminoglicosídeos (Gentamicina), Sulfonamidas (Sulfisoxazol) e Glicopeptídeos (Vancomicina) (Chaves *et al.*, 2007).

2.4. Resíduos de antimicrobianos e a seleção de bactérias resistentes

O desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos é um fenômeno natural exercido pela administração desses medicamentos, mas que tem sido acelerado pelo uso indiscriminado desses fármacos, o que levou o problema de a resistência bacteriana aos antibióticos ser um dos mais relevantes de saúde pública atualmente. A limitação de antibióticos eficazes no combate às infecções, geram o aumento de hospitalizações e uso de medicamentos restritos a casos de multirresistência, e como consequência, ocorre nova pressão de seleção (Loureiro *et al.*, 2016).

Diferentes mecanismos de resistência são desenvolvidos pelas bactérias e que são expressos por genes de resistência, muitas vezes transferíveis, como a KPC, uma enzima descrita em *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases, resistentes a várias classes de antibióticos, e que tem sido descrita em outras enterobactérias, o que gera uma grande preocupação, visto que muitas infecções, principalmente as IRAS (Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde), são promovidas por esse grupo (Murai *et al.*, 2022).

Os antimicrobianos devem atingir seu local de ação em quantidade e disponibilidade adequada e, quando utilizado subdoses, pode ocorrer a seleção de micro-organismos resistentes a esses medicamentos. Ergen e Yalçın (2019) encontraram resíduos de várias classes de antimicrobianos no leite materno, incluindo medicamentos de uso veterinário, o que sugere a exposição das mães a alimentos de origem animal com resíduos desses fármacos, aspecto negativo e relevante para a saúde pública, por favorecer a seleção de patógenos resistentes aos antimicrobianos.

O intestino infantil possui variedade de genes de resistência, denominado resistoma. A presença desses genes está relacionada a composição da microbiota intestinal e o uso de antimicrobianos, que podem alterar essa composição (Lebeaux *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2023).

Já foi observado que a presença de Gammaproteobacteria e Enterobacteriaceae aumentam a presença de genes de resistência, o que é explicado pela transferência de genes entre essas bactérias e as comensais. Também ocorre a transferência pelo leite, pois foram encontrados genes que se assemelham em 70% aos encontrados na microbiota intestinal infantil (Pärnänen *et al.*, 2018).

Considerando a importância do leite materno para a nutrição das crianças, bem como sua qualidade no que se refere aos aspectos microbiológicos, realizou-se o presente estudo em amostras de leite doadas a Banco de Leite humano de Hospital Universitário.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Identificar a microbiota do leite materno em amostras encaminhadas para análise físico-química e microbiológica no Serviço de Orientação à Alimentação Pública (SOAP) da FMVZ – UNESP – Botucatu/SP, avaliar a resistência aos antimicrobianos dos micro-organismos isolados e detectar genes de enterotoxinas.

3.2. Objetivos específicos

Identificar a microbiota do leite materno utilizando a espectrometria de massas;

Realizar o teste de difusão com discos para avaliar a sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos;

Realizar análise físico-química determinando a acidez do leite;

Detectar por técnica molecular, a presença de genes das enterotoxinas clássicas (A, B, C, D e E) em isolados identificados como *Staphylococcus* spp.

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; BENGTSOON-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.; BAHLL, 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 2
TRABALHO CIENTÍFICO

1. Artigo

Trabalho a ser enviado à revista BMC Microbiology, ISSN 1471-2180, Fator de impacto 4.2, Qualis A2. As normas da revista estão disponíveis em: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/submission-guidelines/preparing-your-manuscript/research-article>

Multirresistência bacteriana e diversidade microbiana do leite doado a Banco de Leite de Hospital Universitário

Dayane da Silva Zanini¹, Gismelli Cristiane Angeluci¹, Raquel Cuba Gaspar¹, Benedito Donizete Menozzi¹, Wanderson Sirley Reis Teixeira¹, Lucas Franco Miranda Ribeiro¹, Carlos Eduardo Fidelis², Marcos Veiga dos Santos², Vera Lúcia Mores Rall³, Juliano Gonçalves Pereira¹, Helio Langoni^{1*}

* Autor correspondente: helio.langoni@unesp.br

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva, rua Prof. Doutor Walter Maurício Correa, s/n, Botucatu, SP, 18.618-681, Brasil.

²Universidade de São Paulo (USP), Departamento de Nutrição e Produção Animal, Laboratório Qualileite, Avenida Duque de Caxias Norte, 225, Pirassununga, SP, 13.635-900, Brasil.

³Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Departamento de Microbiologia e Imunologia, rua Prof. Doutor Walter Maurício Correa, s/n, Botucatu, SP, 18.618-681, Brasil.

Resumo

O aleitamento materno é fundamental para o desenvolvimento e proteção do recém-nascido. A presença de micro-organismos no leite tem sido associada ao desenvolvimento da microbiota intestinal do lactente. Ocorrendo o impedimento da amamentação do recém-nascidos, se faz necessário o fornecimento do leite doado aos Bancos de Leite para a criança. Ainda que ocorra uma restrição quanto aos medicamentos prescritos para gestantes e lactantes, alguns

31 antimicrobianos são liberados, e se usados de forma incorreta podem aumentar
32 a pressão de seleção de bactérias resistentes. Aqui, identificamos os micro-
33 organismos presentes no leite doado ao Banco de Leite de um Hospital
34 Universitário, e caracterizamos fenotipicamente a resistência dos isolados a
35 antimicrobianos, assim como detectamos, por técnica molecular, gene de
36 enterotoxinas clássicas em estafilococos.

37 **Resultados:** Obteve-se 184 isolados que foram identificados por espectrometria
38 de massas, identificando 12 gêneros de bactérias e uma de levedura. Houve alta
39 prevalência de bactérias do gênero *Staphylococcus* (39%), principalmente *S.*
40 *epidermidis* (33%). A acidez titulável resultou em 14% das amostras inadequadas
41 aos padrões recomendados. A resistência aos antimicrobianos variou entre as
42 espécies, com maior percentual para penicilinas (36%) e macrolídeos (45%). A
43 multirresistência foi identificada em 12,6% dentre 143 isolados. A pesquisa para
44 genes das enterotoxinas A, B, C D e E identificou apenas seis amostras positivas
45 em *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa.

46 **Conclusões:** O leite materno possui uma grande variedade de micro-
47 organismos, com predominância de *Staphylococcus* spp. e um baixo percentual
48 apresentando genes de enterotoxinas. Houve alto percentual de resistência com
49 multirresistência dos isolados *Klebsiella oxytoca* e *Staphylococcus* spp., o que
50 aumenta a preocupação à saúde pública.

51 **Palavras-chave:** Leite materno, Banco de Leite humano, Microbiota,
52 Multirresistência.

53

54 **Introdução**

55 Agências de saúde pública ao redor do mundo, como a Organização Mundial da
56 Saúde (OMS) e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF)
57 recomendam o aleitamento materno como única fonte de alimento desde os
58 primeiros minutos de vida até os seis meses de idade da criança e sua
59 continuidade, com a complementação de uma dieta variável, até os dois anos,
60 pelo papel fundamental que o leite materno tem no desenvolvimento do recém-
61 nascido (1).

62 Evidências mostraram que o aleitamento materno exclusivo foi fundamental
63 para o desenvolvimento cognitivo e diminuição do risco de doenças infecciosas
64 e não-infecciosas para as crianças, além da formação nutricional, e benefícios
65 para a mãe (2). No entanto menos da metade das crianças no mundo são
66 amamentadas exclusivamente com o leite materno, decorrente de fatores
67 fisiológicos ou psíquicos das mães, ou condições de saúde do lactente (1).

68 A alternativa para alimentação de recém-nascidos prematuros e que as
69 mães não podem amamentar, são os Bancos de Leite Humano que recebem a
70 doação de mulheres em fase de lactação e que produzem leite excedente. O
71 alimento passa por avaliação da qualidade e posteriormente são pasteurizados
72 antes da distribuição (3,4).

73 O leite possui uma microbiota diversa que é importante para o
74 desenvolvimento da microbiota intestinal infantil e a proteção da criança contra
75 patógenos e outras intercorrências de saúde. Entre os micro-organismos
76 encontrados no leite estão bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Staphylococcus*,
77 *Enterococcus* e *Bifidobacterium* (5).

78 A resistência aos antimicrobianos tem sido preocupação crescente na
79 saúde pública. O número de cepas multirresistentes tem aumentado decorrente
80 da pressão de seleção pelo uso indiscriminado de antimicrobianos. Essa
81 resistência é expressa por genes, e já foi observado que o intestino de lactentes
82 possui bactérias com genes de resistência. Também se observou a presença
83 desses genes no leite e evidências de transferência para os lactentes, pela
84 semelhança em 70% aos encontrados na microbiota intestinal infantil. A alta
85 abundância de genes móveis de resistência pode causar riscos à saúde, pois é
86 provável que sejam mais propensos a serem transferidos de bactérias comuns
87 para patógenos (6).

88 Bactérias do gênero *Staphylococcus* são consideradas parte da microbiota
89 da pele e mucosa de humanos e animais e a principal espécie de importância na
90 saúde pública é *S. aureus*, decorrente da capacidade de produzir enterotoxinas
91 (SE) termo resistentes e responsáveis por intoxicações alimentares (7)

92 A produção de enterotoxinas é comumente associada a espécie *S. aureus*,
93 no entanto *Staphylococcus* coagulase-negativos são capazes de formar
94 enterotoxinas e podem contribuir para as intoxicações de origem alimentar (8).

95 As enterotoxinas denominadas clássicas (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) são
96 atribuídas em até 95% das intoxicações, principalmente a SEA (9)

97 Considerando-se a importância do leite materno para a nutrição das
98 crianças bem como de suas qualidades no que se refere aos aspectos
99 microbiológicos, foi investigada a microbiota, o perfil de resistência bacteriana
100 aos antimicrobianos e detecção molecular de genes de enterotoxinas clássicas
101 em amostras de leite doado a Banco de Leite de Hospital Universitário.

102

103 **Métodos**

104 **Declaração de ética**

105 O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da
106 Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, São Paulo, com o parecer
107 consubstanciado número 5.718.872.

108

109 **Amostras**

110 As 200 amostras de leite humano eram provenientes do Banco de Leite de
111 Hospital Universitário localizado no centro do estado de São Paulo. As amostras
112 foram selecionadas conforme eram enviadas para o laboratório do Serviço de
113 Orientação à Alimentação Pública (SOAP), da Faculdade de Medicina
114 Veterinária e Zootecnia, Unesp, Botucatu, para análises físico-químicas e
115 microbiológicas de rotina, durante o período de janeiro a agosto de 2023.

116 Os cultivos foram realizados em amostras de leite, não pasteurizado,
117 estocados a temperatura $\leq -4^{\circ}\text{C}$ em período inferior a 15 dias, destinados à
118 análise de acidez titulável pelo Método Dornic, conforme as Normas Técnicas da
119 Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano (3).

120 Alíquotas de 2 ml a 3 ml foram armazenadas em microtubos à temperatura
121 de -20°C até o processamento das amostras.

Durante a pesquisa, não houve contatos com as doadoras e nenhum dado foi requerido.

Isolamento microbiano

Com o auxílio de alça bacteriológica, 10 µl de leite foi estriado em placas de Petri com meio não seletivo de ágar sangue (HiMedia®) acrescido de sangue bovino (6%) e com meio seletivo de ágar MacConkey (Oxoid®, Thermo Fisher Scientific™), e posteriormente incubadas em estufa, sob condição de aerobiose, a 37°C por até 72 horas, com observação do isolamento microbiano a cada 24 horas (10).

As placas que exibiram crescimento moderado a exuberante de colônias puras e diferentes padrões de colônias, em ambos os meios de cultivo, foram selecionadas, e de três a quatro colônias de mesmo padrão transferidas para tubos com caldo infusão cérebro-coração (*Brain Heart Infusion - BHI*. Oxoid®, Thermo Fisher Scientific™), sendo identificadas, de acordo com o protocolo de trabalho, com diferentes numerações.

Os tubos com caldo BHI foram incubados em estufa a 37°C por 24 horas, para isolamento de cada colônia selecionada. Após o período de incubação, os isolados em multiplicação foram transferidos para tubos criogênicos de 2 ml estéreis e livres de DNase, RNase e Pirogênios (Corning®, Merk), com glicerol (10%) e armazenados a -80°C. A partir dos mesmos tubos foram realizados os testes de sensibilidade *in vitro* a antimicrobianos.

Perfil de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos

Cada amostra foi diluída em solução salina (0,85%) estéril até se obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão de McFarland a 0,5, resultando numa suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2 x 10⁸ UFC/ml. Com o auxílio de um swab estéril, cada suspensão foi distribuída na superfície de placas com ágar Müller-Hinton (BD Difco™) de acordo com método de difusão em ágar (11).

Em seguida foram colocados discos de nove antimicrobianos de cinco classes diferentes, que foram selecionados dentre os medicamentos considerados seguros para serem prescritos para gestantes e lactantes (12), com distância mínima de 14 mm entre os discos para que fosse possível realizar a leitura dos halos de inibição.

As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e a medição dos halos de inibição se deu em milímetros com a utilização de régua milimetrada, seguindo as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI* (13).

Os antimicrobianos utilizados foram do grupo das penicilinas e derivados betalactâmicos (amoxicilina 10 µg, ampicilina 10 µg, cefalexina 30 µg, ceftriaxona 30 µg), macrolídeos (azitromicina 15 µg e eritromicina 15 µg), lincosamida (clindamicina 2 µg), aminoglicosídeo (gentamicina 10 µg), e sulfonamida (sulfametoxazol+trimetoprima 25 µg).

Identificação das espécies de micro-organismos por espectrometria de massas

Os isolados microbianos, armazenados a -80°C, foram transferidos para ágar sangue bovino (6%) e cultivados por 24 horas a 37°C. Após o período de incubação, as placas foram encaminhadas para o Laboratório de Pesquisa em Qualidade do Leite (Qualileite) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, campus de Pirassununga, para identificação das espécies pela técnica de *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS).

De cada isolado, foram selecionadas colônias puras e que foram transferidas para uma placa de aço com 96 pontos (Bruker Daltonics™, Bremen, Alemanha). Após a secagem, cada isolado foi tratado com uma solução com ácido fórmico 70% e acetonitrila 100% na proporção de 1:1, para lisar as células e liberar as proteínas intracelulares, particularmente as proteínas ribossômicas.

Após a secagem da solução, foi adicionado 1 µl de uma solução de matriz compreendendo ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico diluído em uma solução de 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoroacético em cada ponto da placa, que

183 após a secagem foi colocada em espectrômetro de massa Autoflex III (Bruker
184 Daltonics™, Bremen, Alemanha), operado com laser de nitrogênio de 337-nm
185 (14,15).

186 Os dados de espectro de massa foram coletados na faixa de 2.000 a
187 20.000 m/z, usando o pacote de software FlexControl 3.3 e os resultados foram
188 analisados pelo pacote de software Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics™, Bremen,
189 Alemanha), que utiliza pontuações logarítmicas entre 0 e 3,0 para comparação
190 dos espectros com o banco de dados, considerando pontuações $\geq 1,7$
191 identificações confiáveis de gênero e $\geq 2,0$ identificações confiáveis de gênero e
192 espécie (14,15).

193

194 **Titulação da acidez por Método Dornic**

195 Para a determinação da acidez do leite, utilizou-se o método Dornic, como
196 preconizado pela Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano (3).

197 Uma alíquota do leite é acrescida de solução indicadora de fenolftaleína
198 e a titulação ocorre com a adição de hidróxido de sódio N/9 (NaOH N/9) até a
199 virada de cor.

200

201 **Extração de DNA de *Staphylococcus* spp.**

202 A extração do material genético dos isolados identificados como *Staphylococcus*
203 spp., foi feita por lise térmica seguindo a metodologia de Nunes *et al.* (16).

204 Foram alicotados 1000 μ l, dos isolados cultivados em BHI, para
205 microtubos de 1,5 ml. O conteúdo foi centrifugado a 7000 rpm por 5 minutos. O
206 sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 500 μ l de solução Tris-
207 EDTA 1X (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.8), homogeneizado e centrifugado a
208 7000 rpm por 5 minutos. Esse processo se repetiu três vezes. Na última etapa,
209 o *pellet* foi ressuspenso em 100 μ l de Tris-EDTA 1X e aquecido em termobloco
210 (Kasvi) por 10 minutos a temperatura de 98°C.

211 Após o tubo ser centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm, o sobrenadante
212 foi transferido para outro microtubo de 1,5 ml e armazenado a -20°C.

Detecção molecular de enterotoxinas clássicas

O material genético extraído foi submetido à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando cinco pares de *primers*, descritos na Tabela 1, e seguindo a metodologia de Omwenga *et al.* (17).

Tabela 1 *Primers* usados na PCR para amplificação de genes de enterotoxinas em *Staphylococcus* spp.

Gene	Primer	Sequência (5' – 3')	Tamanho do produto amplificado (pb)
<i>sea</i>	GSEAR-1	GGTTATCAATGTGCGGGTGG	102
	GSEAR-2	CGGCACTTTTTTCTCTTCGG	
<i>seb</i>	GSEBR-1	GTATGGTGGTGTAAGTACGAGC	164
	GSEBR-2	CCAAATAGTGACGAGTTAGG	
<i>sec</i>	GSECR-1	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG	451
	GSECR-2	CACACTTTTAGAATCAACCG	
<i>sed</i>	GSEDR-1	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAG	278
	GSEDR-2	ATTGGTATTTTTTTTCGTTC	
<i>see</i>	GSEER-1	AGGTTTTTTTCACAGGTCATCC	209
	GSEER-2	CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC	

Para a amplificação do DNA foi utilizado solução contendo 12,5 µl de 1X dreamTaq mastermix (Thermo Fisher Scientific™), 0,2 µl dos *primers* GSEAR, GSEBR, GSECR, GSEER e 1,6 µl do *primer* GSEDR a 10 pMol; 1 µl do material genético e o volume total de 25 µl ajustado com água livre de nucleases. As condições foram 3 min a 94°C, 35 ciclos a 95°C por 30 s; 57°C por 60s; e 72°C por 1 min com uma extensão final a 72°C por 10 min.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X (0,1 M de Tris, 0,09 M de ácido bórico e 0,001M de EDTA), adicionado de 6 µl de SafeDye Nucleic Acid Stain (Cellco©) e visualizados em um transiluminador de LED (Kasvi).

Como controles positivos, foram utilizados o DNA das cepas ATCC[®] 25923[™] (gene *sea*), ATCC[®] 14458[™] (gene *seb*), N315 (gene *sec*), FRI 361 (gene *sed*), ATCC[®] 27661[™] (gene *see*) da espécie *Staphylococcus aureus*. Água livre de nucleases foi usada como controle negativo em todas as análises.

Resultados

Identificação dos micro-organismos

Foram isolados micro-organismos em 112 (56%) amostras, dentro das quais se obteve 187 isolados microbianos.

A técnica de MALDI-TOF MS identificou 13 gêneros e 30 espécies de micro-organismos (Tabela 2 e Figura 1), 28 de bactérias e duas leveduras (*Candida intermedia* e *Candida parapsilosis*). Dos 187 isolados, *Staphylococcus epidermidis* foi a espécie predominante (62/187= 33,16%), seguida de *Enterobacter xiangfangensis* (14/187=7,49%), *Stenotrophomonas maltophilia* (13/187 = 6,95%), *Enterobacter asburiae* (9/187 = 4,81%), *Acinetobacter ursingii* (8/187 = 4,28%) e *Serratia marcescens* (8/187 = 4,28%). Três isolados não foram identificados e em oito não foi possível identificar as espécies, tendo apenas os resultados em nível de gênero: *Acinetobacter* sp. (5/187 = 2,67%), *Pantoea* sp. (2/187 = 1,07%) e *Pseudomonas* sp. (1/187= 0,53%).

261 **Tabela 2** Espécies e frequência de micro-organismos identificados por
 262 espectrometria de massas (MALDI-TOF MS) em amostras de leite humano de
 263 Banco de Leite de Hospital Universitário

Espécies	Número de isolados/total de isolados (%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	62/187 (33,16%)
<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	14/187 (7,49%)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	13/187 (6,95%)
<i>Enterobacter asburiae</i>	9/187 (4,81%)
<i>Acinetobacter ursingii</i>	8/187 (4,28%)
<i>Serratia marcescens</i>	8/187 (4,28%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	7/187 (3,74%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6/187 (3,21%)
<i>Acinetobacter</i> sp.	5/187 (2,67%)
<i>Candida parapsilosis</i>	5/187 (2,67%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	5/187 (2,67%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5/187 (2,67%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5/187 (2,67%)
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	4/187 (2,14%)
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	3/187 (1,60%)
<i>Acinetobacter junii</i>	2/187 (1,07%)
<i>Acinetobacter pittii</i>	2/187 (1,07%)
<i>Klebsiella variicola</i>	2/187 (1,07%)
<i>Pantoea</i> sp.	2/187 (1,07%)
<i>Pseudomonas monteilii</i>	2/187 (1,07%)
<i>Pseudomonas putida</i>	2/187 (1,07%)
<i>Serratia liquefaciens</i>	2/187 (1,07%)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1/187 (0,53%)
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	1/187 (0,53%)
<i>Candida intermedia</i>	1/187 (0,53%)
<i>Chryseobacterium gambrini</i>	1/187 (0,53%)
<i>Enterobacter kobei</i>	1/187 (0,53%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	1/187 (0,53%)
<i>Kocuria kristinae</i>	1/187 (0,53%)
<i>Pseudomonas koreensis</i>	1/187 (0,53%)
<i>Pseudomonas</i> sp.	1/187 (0,53%)
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1/187 (0,53%)
<i>Serratia nematodiphila</i>	1/187 (0,53%)
Não identificada	3/187 (1,60%)
Total	187/187 (100%)

264

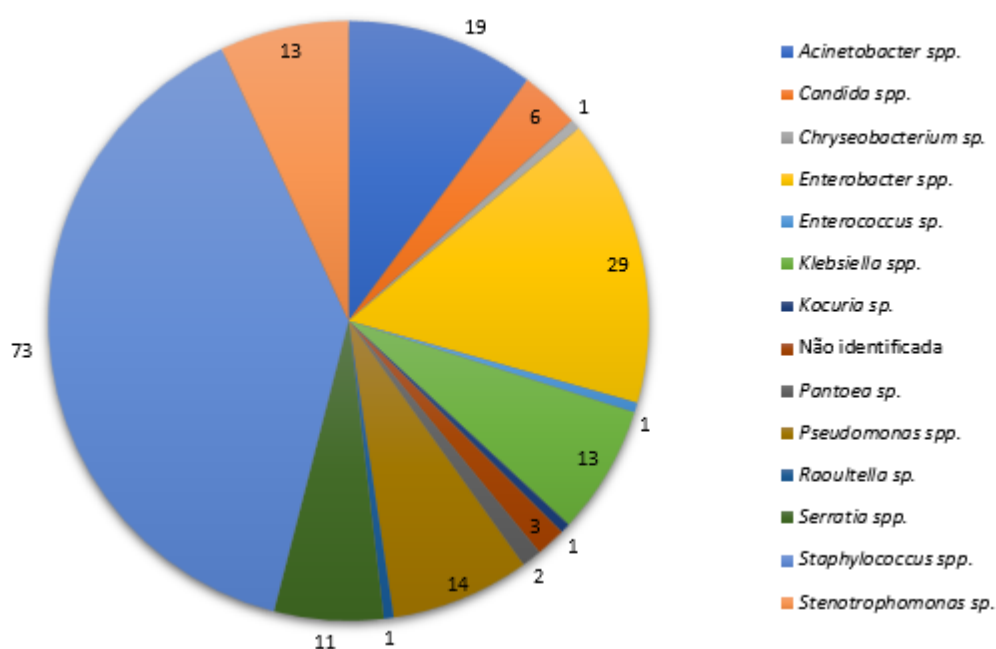


Fig.1 Frequência de gêneros microbianos identificados em 112 amostras de leite humano de Banco de Leite de Hospital Universitário

Em 50 das 112 amostras com crescimento microbiano, foram isolados de duas a quatro espécies por amostra, como ilustrado na Figura 2.

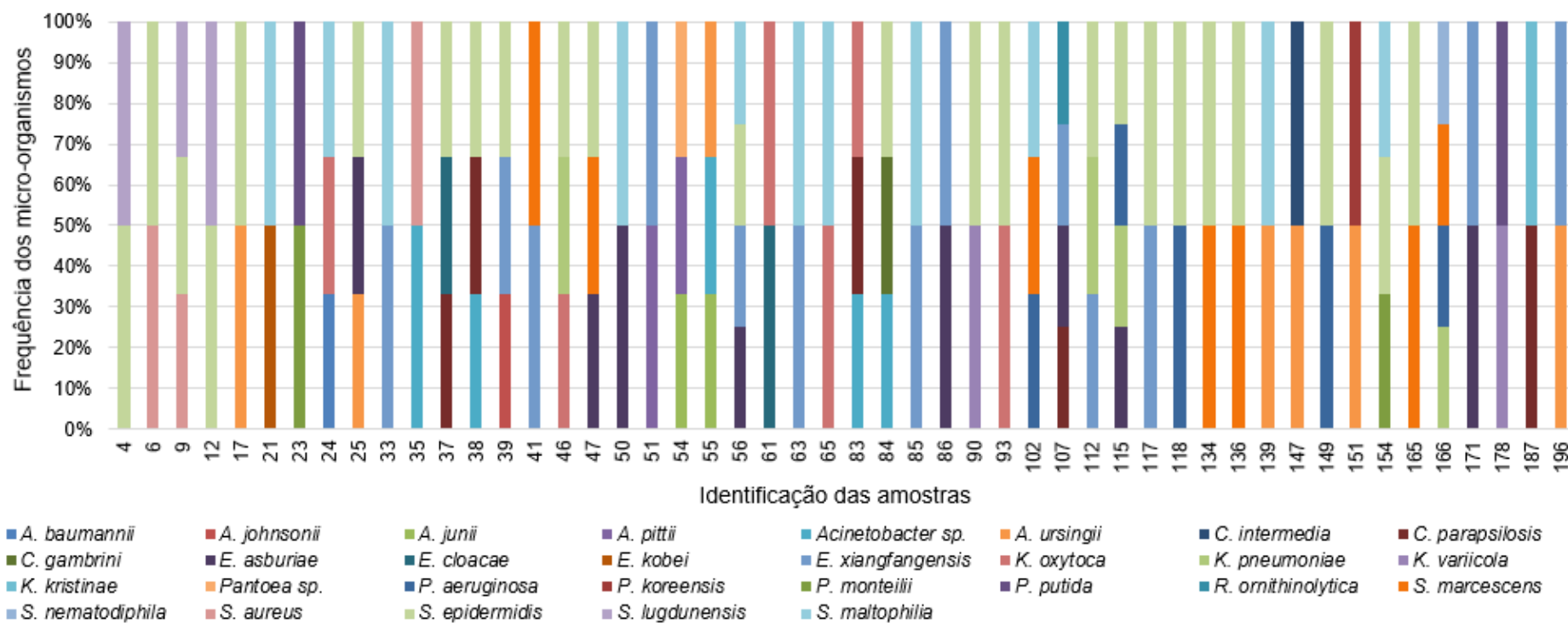


Fig. 2 Frequência dos micro-organismos isolados em associação

277 **Bactérias Gram-positivas**

278 Dentre os 187 isolados obtidos no estudo, três gêneros de bactérias gram-
 279 positivas foram identificados: *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *Kocuria*
 280 spp. A predominância foi da espécie *S. epidermidis*, estando presente em
 281 33,16% das amostras, enquanto as outras duas espécies *S. aureus* e *S.*
 282 *lugdunensis* foram identificadas em 3,74% e 2,14% do total, respectivamente. As
 283 espécies *Enterococcus faecalis* e *Kocuria kristinae* foram isolados em apenas
 284 uma amostra cada (0,53%).

285

286 **Enterobacterales**

287 As espécies gram-negativas isoladas foram de cinco gêneros, com maior
 288 prevalência de *Enterobacter* spp. (*E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. kobei*, *E.*
 289 *xiangfangensis*) em 15,5% dos isolados, seguida de *Klebsiella* spp. (*K. oxytoca*,
 290 *K. pneumoniae*, *K. variicola*) em 6,95%, e *Serratia* spp. (*S. liquefaciens*, *S.*
 291 *marcescens*, *S. nematodiphila*) em 5,88%. Foi identificada, também, a espécie
 292 *Raoultella ornithinolytica* em apenas uma amostra (0,53%), e dois isolados de
 293 *Pantoea* sp. (1,07%).

294

295 **Demais micro-organismos de origem bacteriana e fúngica**

296 As demais bactérias gram-negativas encontradas no estudo foram identificadas
 297 como *Acinetobacter* spp., com cinco espécies (*A. baumannii*, *A. johnsonii*, *A.*
 298 *junii*, *A. pittii*, *A. ursingii*) e prevalência de 10,15% dos isolados. Cinco espécies
 299 de *Pseudomonas* spp. (*P. aeruginosa*, *P. koreensis*, *P. monteilii*, *P.*
 300 *oryzihabitans*, *P. putida*) estando presentes em 7,47% do total, enquanto outras
 301 duas espécies de gram-negativos foram identificadas em 6,95% e 0,53%,
 302 *Stenotrophomonas maltophilia* e *Chryseobacterium gambrini*, respectivamente.

303 Entre os cultivos com características macro e microscópicas de leveduras,
 304 foram identificadas duas espécies de *Candida* spp. (*C. intermedia* e *C.*
 305 *parapsilosis*) em 3,2% das amostras de leite avaliadas.

306

Detecção de genes de enterotoxinas clássicas

Das 70 amostras de *Staphylococcus* spp., apenas seis (8,57%) foram positivas para enterotoxina A. Com relação aos demais genes, todas as amostras foram negativas.

O gene *sea* amplificou em três amostras identificadas como *Staphylococcus aureus*, duas *Staphylococcus epidermidis* e uma *Staphylococcus lugdunensis*. Dos seis isolados, três (*S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. lugdunensis*) eram provenientes de mesma amostra de leite.

Acidez titulável do leite pelo Método Dornic

Das 200 amostras, em 88 sem isolamento microbiano, 21 (n=200/ 10,5%) tiveram o valor de 2,5°D, 39 (n=200/ 19,5%) valor de 5,0°D, 7 (n=200/ 3,5%) com 7,5°D, 7 (n=200/ 3,5%) com 10°D, 11 (n=200/ 5,5%) com 12,5°D, 2 (n=200/ 1%) com 15°D e 1 amostra (n=200/ 0,5%) com 17,5°D de acidez.

Nas 112 amostras com desenvolvimento microbiano, 38 (n=200/ 19%) tiveram o valor de 2,5°D, 52 (n=200/ 26%) com 5°D, 14 (n=200/ 7%) com 7,5°D, 6 (n=200/ 3%) com 10°D, 1 (n=200/ 0,5%) com 12,5°D e 1 amostra (n=200/ 0,5%) com 15°D.

Das 200 amostras 29 (14,5%) estavam fora dos padrões exigidos, segundo a RDC nº 171 de 2006 (18).

Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* dos isolados

O teste de disco difusão permitiu avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos selecionados, de oito gêneros das 171 bactérias identificadas, como sumarizado nas Tabelas 3 e 4.

O perfil geral (Tabela 3), sintetiza a porcentagem de isolados sensíveis e resistentes aos antimicrobianos selecionados. Foi observada maior sensibilidade a gentamicina (77,9%), sulfametoxazol+trimetoprima (62,8%) e ceftriaxona (57,56%), enquanto o maior percentual de resistência foi para a azitromicina (45,35%).

Quando avaliado o perfil de resistência para cada gênero de micro-organismos (Tabela 4), os resultados mostraram alto percentual de resistência dos isolados às penicilinas e derivados betalactâmicos (33,8% - 24/71), assim como para os macrolídeos (76% - 54/71) em *Staphylococcus* spp.

Entre as bactérias da ordem Enterobacterales, houve maior porcentagem de resistência ao grupo das penicilinas e derivados betalactâmicos, variando entre 50% de resistência de *Klebsiella variicola* para amoxicilina, até 100% de *Serratia* spp. resistentes a cefalexina. A resistência para sulfametoxazol+trimetoprima foi observada em torno de 50% das bactérias desse grupo. A gentamicina demonstrou ser o antimicrobiano mais eficaz, tendo apenas dois isolados com resistência ao aminoglicosídeo.

O gênero *Acinetobacter* demonstrou alta sensibilidade aos antimicrobianos, com a maior taxa de resistência para sulfametoxazol+trimetoprima com 21,1%.

Os testes para *Pseudomonas* spp. evidenciaram 100% de sensibilidade a gentamicina.

Quase metade (46,15%) dos isolados de *Stenotrophomonas maltophilia* foram resistentes a sulfametoxazol+trimetoprima, um dos poucos antimicrobianos de eleição para combater essa espécie.

Ao analisar todos as classes de antimicrobianos, a multirresistência foi de 12,6% (18/143) dos isolados, sendo *Klebsiella oxytoca* a espécie que apresentou maior multirresistência. Ainda que tenha sido pouco isolada, 66% do total da espécie encontrada nos cultivos do leite materno, se mostraram resistentes à três classes de antimicrobianos (Tabela 4).

365 **Tabela 3** Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de isolados bacterianos
 366 encontrados no leite materno de Banco de Leite humano de Hospital
 367 Universitário

		Perfil de sensibilidade/número de isolados (%)		
Classe	Antimicrobianos	S	PS	R
Penicilinas e derivados betalactâmicos	Amoxicilina	9/172 (5,23%)	-	45/172 (26,16%)
		1/172		3/172
	Ampicilina	(0,58%)	-	(1,74%)
		62/172		62/172
	Cefalexina	(36,04%)	-	(36%)
		99/172		26/172
Macrolídeos	Ceftriaxona	(57,56%)	(10,5%)	(15,1%)
	Azitromicina	45/172 (24,42%)	1/172 (0,58%)	78/172 (45,35%)
		15/172 (8,7%)	2/172 (1,16%)	55/172 (32%)
Lincosaminas	Clindamicina	63/172 (36,63%)	5/172 (2,9%)	3/172 (1,74%)
Aminoglicosídeos	Gentamicina	134/172 (77,91%)	8/172 (4,65%)	15/172 (8,7%)
Sulfonamidas	Sulfametoxazol+trimetoprima	108/172 (62,8%)	11/172 (6,4%)	37/172 (21,5%)

368 S: Sensível, PS: Parcialmente sensível, R: resistente

369 **Tabela 4** Perfil de resistência *in vitro* aos antimicrobianos de oito gêneros bacterianos isolados de leite materno de Banco de Leite
 370 humano de Hospital Universitário

Perfil de resistência (frequência de resistência/n e %)										
Classe/ Antimicrobianos										
Espécies	Penicilinas e derivados betalactâmicos				Macrolídeos		Lincosaminas	Aminoglicosídeos	Sulfonamidas	MDR
	AMO	AMP	CFE	CRO	AZI	ERI	CLI	GEN	SUT	
<i>Acinetobacter</i> spp.	0	0	0	2/19 (10,5%)	0	0	0	0/19 (0%)	4/19 (21,1%)	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	8/9 (88,9%)	0	8/9 (88,9%)	2/9 (22,2%)	4/9 (44,4%)	0	0	1/9 (11,1%)	3/9 (33,3%)	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	4/5 (80%)	0	4/5 (80%)	0/5 (0%)	1/5 (20%)	0	0	0/5 (0%)	0/5 (0%)	-
<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	14/14 (100%)	0	13/14 (92,86%)	3/14 (21,43%)	8/14 (57,14%)	0	0	0/14 (0%)	6/14 (42,86%)	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0	0	0	0/1 (0%)	0	0	0	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5/6 (83,3%)	0	2/6 (33,3%)	2/6 (33,3%)	4/6 (66,6%)	0	0	0/6 (0%)	4/6 (66,6%)	4/6 (66,6%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5/5 (100%)	0	1/5 (20%)	1/5 (20%)	5/5 (100%)	0	0	0/5 (0%)	2/5 (40%)	2/5 (40%)
<i>Klebsiella variicola</i>	1/2 (50%)	0	0/2 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	0	0/2 (0%)	1/2 (50%)	-
<i>Pseudomonas</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	0/14 (0%)	0	-

371 MDR: multidroga resistente. AMO: Amoxicilina; AMP: Ampicilina; CFE: Cefalexina; CRO: Ceftriaxona; AZI: Azitromicina; ERI: Eritromicina; CLI:
 372 Clindamicina; GEN: Gentamicina; SUT: Sulfametoxazol+trimetoprima. *Acinetobacter* spp.: *Acinetobacter* spp. (n=5), *A. baumannii* (n=1), *A.*
 373 *johnsonii* (n=1), *A. junii* (n=2), *A. pittii* (n=2), *A. ursingii* (n=8); *Pseudomonas* spp.: *Pseudomonas* spp. (n=1), *P. putida* (n=2), *P. oryzae* (n=3),
 374 *P. monteilii* (n=2), *P. koreensis* (n=1), *P. aeruginosa* (n=5).

375

376 **Tabela 4** Perfil de resistência *in vitro* aos antimicrobianos de oito gêneros bacterianos isolados de leite materno de Banco de Leite
 377 humano de Hospital Universitário (continuação)

Perfil de resistência (frequência de resistência/n e %)										
Classe/ Antimicrobianos										
Espécies	Penicilinas e derivados betalactâmicos				Macrolídeos		Lincosaminas	Aminoglicosídeos	Sulfonamidas	MDR
	AMO	AMP	CFE	CRO	AZI	ERI	CLI	GEN	SUT	
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1/1 (100%)	0	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0	0	0/1 (0%)	1/1 (100%)	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	0/2 (0%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0	0	0/2 (0%)	0/2 (0%)	-
<i>Serratia marcescens</i>	6/8 (75%)	0	7/8 (87,5%)	3/8 (37,5%)	7/8 (87,5%)	0	0	1/8 (12,5%)	2/8 (25%)	2/8 (25%)
<i>Serratia nematodiphila</i>	1/1 (100%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)	0	0	0/1 (0%)	0/1 (0%)	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	4/7 (57,14%)	2/7 (28,57%)	3/7 (42,85%)	6/7 (85,71%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	1/7 (14,3%)	1/7 (14,3%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	19/60 (31,7%)	11/60 (18,3%)	42/60 (70%)	45/60 (75%)	3/60 (5%)	13/60 (21,7%)	7/60 (11,7%)	9/60 (15%)
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0	0	1/4 (25%)	0/4 (0%)	2/4 (50%)	3/4 (75%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	6/13 (46,15%)	-

378 MDR: multidroga resistente. AMO: Amoxicilina; AMP: Ampicilina; CFE: Cefalexina; CRO: Ceftriaxona; AZI: Azitromicina; ERI: Eritromicina; CLI:
 379 Clindamicina; GEN: Gentamicina; SUT: Sulfametoxazol+trimetoprima. *Acinetobacter* spp.: *Acinetobacter* spp. (n=5), *A. baumannii* (n=1), *A.*
 380 *johnsonii* (n=1), *A. junii* (n=2), *A. pittii* (n=2), *A. ursingii* (n=8); *Pseudomonas* spp.: *Pseudomonas* spp. (n=1), *P. putida* (n=2), *P. oryzae* (n=3),
 381 *P. monteilii* (n=2), *P. koreensis* (n=1), *P. aeruginosa* (n=5).

Discussão

A diversidade de espécies microbianas encontradas, no leite materno avaliado no presente estudo, corrobora com resultados de outros pesquisadores, que também evidenciaram a presença de ampla variedade de espécies (19,20)

Os principais gêneros descritos na literatura, como parte da microbiota do leite humano, são *Staphylococcus* e *Streptococcus*, em mais de 90% das pesquisas, seguidas das bactérias ácido-láticas e de micro-organismos gram-negativos pertencentes a diversos gêneros, de acordo com Togo *et al.* (19) e Zimmermann e Curtis (20). Ainda que esses autores utilizaram diferentes metodologias, como cultivos, MALDI-TOF MS e sequenciamento genético, o presente estudo corroborou com as descrições apresentadas, isolando micro-organismos dos gêneros *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Rothia*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Pantoea*.

Com uso de sequenciamento genético já foram identificados 360 gêneros procariotos, com predominância de *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* (21), como também *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, entre outros gêneros bacterianos; bem como a presença de fungos e leveduras, como *Candida* e *Malassezia*, protozoários e vírus (22).

A técnica de MALDI-TOF MS utilizada no presente estudo possibilitou a identificação de ampla variedade de micro-organismos, evidenciando a prevalência do gênero *Staphylococcus* e a espécie *S. epidermidis* em 39% e 33% dos isolados, respectivamente. Em demais estudos que utilizaram a espectrometria de massas, os resultados também mostram a prevalência de *Staphylococcus*, e da espécie *S. epidermidis*. Demais micro-organismos como *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* já foram isolados no leite humano e na microbiota intestinal de indivíduos saudáveis, destacando a frequência desses gêneros no leite (6,23–26).

Outros estudos, na Espanha (22) e Taiwan (27) que utilizaram meios de cultura para o isolamento dos micro-organismos, isolaram os gêneros *Staphylococcus*, com predominância das espécies *S. epidermidis* e *S. aureus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (bactérias láticas)

414 *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter* e em menor frequência,
415 *Pseudomonas* e *Micrococcus*. Foram usados meios de cultura enriquecidos e
416 seletivos e incubação sob condições aeróbicas e anaeróbicas, com posterior
417 identificação por sequenciamento do gene 16S rRNA.

418 Em contraste, o presente estudo utilizou apenas dois meios de cultura
419 (água sangue bovino e água MacConkey), com incubação em condição aeróbica
420 e usou o MALDI-TOF MS para identificação dos isolados, obtendo-se resultados
421 semelhantes aos outros trabalhos, como a identificação das bactérias gram-
422 positivas *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* e *Enterococcus* spp., e das
423 gram-negativas *Klebsiella* spp., *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp.

424 Nos estudos que avaliaram a qualidade microbiológica do leite cru e
425 pasteurizado, provenientes de Bancos de leite, observaram elevadas contagens
426 de bactérias mesófilas e coliformes (acima de 40% das amostras de leite cru e
427 pasteurizado), importante indicador de higiene considerando que muitos
428 coliformes pertencem a família Enterobacteriaceae, além da presença de fungos
429 filamentosos e leveduriformes e em algumas amostras o isolamento de
430 *Staphylococcus* spp. (28,29).

431 Um estudo no Estado de São Paulo apontou a presença de nove gêneros
432 bacterianos e leveduras não identificadas entre 186 amostras de leite doado. A
433 prevalência foi do gênero *Staphylococcus*, seguido de *Enterobacter* e *Bacillus*,
434 mas também de *Streptococcus* spp., *Acinetobacter* spp. *Klebsiella* spp.
435 *Pseudomonas aeruginosa*, *Hafnia alvei* e *Micrococcus* spp. (30). O presente
436 estudo corrobora com esses resultados, quanto ao número de isolados, dentre
437 as 200 amostras de leite cultivados. Ambos os estudos obtiveram pouco mais de
438 180 bactérias e leveduras. Além da prevalência de estafilococos, em destaque a
439 espécie *S. epidermidis*, a presença de *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae*
440 e *K. oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.

441 O atual estudo não identificou estreptococos, como encontrados em
442 outros trabalhos, e obteve uma variedade maior de espécies bacterianas. Em
443 destaque, a identificação de *Stenotrophomonas* spp., *Chryseobacterium* spp. e
444 *Kocuria* spp., relatada em poucos artigos que utilizaram sequenciamento da

445 porção 16S do RNA ribossômico e com baixa prevalência nas amostras
446 (25,31,32).

447 Quanto à acidez titulável, o presente estudo identificou que 85,5% das
448 amostras estavam dentro do padrão exigido pela RDC nº 171 de 2006, abaixo
449 de 8,0ºD. Estudos anteriores evidenciam uma variação quanto a porcentagem
450 de leite doado, com titulação de acidez dentro dos parâmetros permitidos, como
451 em um Banco de Leite no Paraná onde mais de 60% das amostras estavam
452 dentro dos padrões (33), enquanto em São Paulo já foi descrito que esse valor
453 era de 95% (30). No entanto, já houve estudo, em Banco de leite de São Paulo,
454 que identificou mais de 76% de amostras com valor de acidez >8ºD,
455 consideradas inadequadas para o consumo (29).

456 Bactérias resistentes a uma variedade de antimicrobianos têm sido uma
457 preocupação constante pela ameaça crescente à saúde pública. A resistência a
458 esses medicamentos decorre da presença de genes no cromossomo ou
459 estruturas móveis, como plasmídeos e transposons, carregado pelas células
460 bacterianas. Pärnänen *et al.* (34) e Zhang *et al.* (35) descreveram a presença de
461 genes de resistência a antimicrobianos e elementos genéticos móveis na
462 microbiota intestinal de crianças e que esses elementos eram transferidos pelo
463 leite materno, pela semelhança em mais de 70% entre os genes presentes no
464 leite e na microbiota intestinal infantil.

465 Um dos genes estudados foi o *mecA* que teve alta taxa de detecção nas
466 fezes dos recém-nascidos, além da presença de *S. epidermidis* resistente a
467 antibióticos no colostro e no intestino infantil, indicando a transferência de cepas
468 e genes de resistência do leite materno para a criança (35)

469 Sabendo que a microbiota do leite é importante para o desenvolvimento
470 da microbiota intestinal infantil e a ocorrência da transferência de genes de
471 resistência entre a mãe e o lactente, avaliar o perfil de sensibilidade a
472 antimicrobianos das bactérias isoladas no leite materno é importante para
473 elucidar a taxa de resistência desses micro-organismos e alertar para possíveis
474 ocorrências de infecções oportunistas por espécies resistentes.

475 No presente estudo foi observada alta taxa de resistência aos derivados
476 betalactâmicos, principalmente entre as espécies gram-negativas, em torno de

477 90%. Para a classe dos macrolídeos também ocorreu alta taxa de resistência
478 (acima de 60%) entre as bactérias gram-negativas e as espécies de
479 estafilococos. A gentamicina foi o antibiótico que apresentou melhor
480 desempenho para os micro-organismos testados, com o maior percentual de
481 resistência nas cepas de *S. epidermidis* (21%). A multirresistência foi observada
482 em três gêneros bacterianos (*Klebsiella* spp., *Serratia* sp., *Staphylococcus* spp.)
483 e o percentual total foi de 12,6%.

484 Chen *et al.* (27) e Salerno *et al.* (30) encontraram 60% a 90% de isolados
485 identificados como estafilococos resistentes à penicilina e eritromicina. Espécies
486 de *Enterococcus* foram resistentes a gentamicina, eritromicina, clindamicina e
487 oxacilina em mais de 80% dos isolados, diferindo do presente estudo, em que *E.*
488 *faecalis*, foi sensível a todos os antibióticos testados.

489 Nos isolados provenientes do leite humano no Brasil (30), observou
490 melhor desempenho e menores taxas de resistência para os antimicrobianos:
491 gentamicina, vancomicina, cefalexina e sulfametoxazol+trimetoprima,
492 corroborando com o presente estudo em que as menores taxas de resistência
493 foram aos aminoglicosídeos e a sulfonamida.

494 Um ponto importante a ser destacado é a presença de quase 50% de
495 *Stenotrophomonas maltophilia* resistentes à sulfametoxazol+trimetoprima. Esse
496 medicamento é a primeira escolha para infecções causadas pela bactéria, em
497 decorrência de sua resistência intrínseca às penicilinas e betalactâmicos (36).

498 Em estudo de revisão e meta-análise, resultados de testes realizados
499 entre 2000 a 2021, mostraram que mais de 40% dos isolados clínicos de *S.*
500 *maltophilia* em países da Europa, Ásia e América, foram resistentes à colistina,
501 segundo antibiótico de escolha quando há resistência à
502 sulfametoxazol+trimetoprima; evidenciando uma crescente preocupação, a
503 menor disponibilidade de medicamentos para o tratamento de infecções no
504 ambiente hospitalar, visto que a bactéria está associada a casos de infecção em
505 pacientes em unidade de terapia intensiva, e há poucos antimicrobianos eficazes
506 para combater essa espécie (37).

507 Dada a importância das bactérias do gênero *Staphylococcus* para saúde
508 pública devido a sua capacidade de produção de enterotoxinas termoestáveis,

509 testamos todos os isolados para os genes das enterotoxinas A, B, C, D e E. Seis
510 amostras foram positivas para o gene de enterotoxina A, resultados menores dos
511 que descreveram Salerno *et al.* (30), que observaram a presença dos genes *seb*,
512 *sec*, *sed* em *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa, com prevalência de
513 genes *sea*, mas que ainda mostram a importância de um cuidado no manejo e
514 armazenamento correto do leite doado para minimizar o crescimento bacteriano
515 e evitar a produção das enterotoxinas.

516 São Paulo é o estado que mais possui Bancos de Leite humano no Brasil,
517 tendo 58 unidades no total e em 2022, (38) receberam mais de 57 mil litros de
518 leite. A garantia de qualidade do produto, em sua coleta e armazenamento,
519 garantem uma menor taxa de micro-organismos potencialmente patogênicos
520 que, por vezes, podem não ser eliminados durante a pasteurização, além,
521 também, de esse processo e o manuseio do leite posteriormente, serem pontos
522 críticos para que o produto, dentro dos padrões exigidos, seja ofertado para
523 lactentes que, em sua maioria, estão em situações de maior fragilidade.

524

525 **Conclusão**

526 O leite materno apresentou grande variedade de micro-organismos. No entanto,
527 o predomínio de bactérias indicadores de higiene, parece indicar falha na
528 obtenção e manipulação do leite.

529 É fundamental que as doadoras mantenham os cuidados de higiene no
530 momento da coleta, para evitar o aumento da carga microbiana de potencial
531 patogênico, no leite.

532 A identificação de bactérias multirresistentes mostra a importância de
533 uma maior atenção sobre a prescrição dos antimicrobianos para as lactantes e
534 educação em saúde para o uso correto desses medicamentos.

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

539 Os resultados sugerem a necessidade de atividades educativas quanto
540 ao processo de obtenção do leite para as mães doadoras, assegurando-se assim
541 um leite de melhor qualidade para utilização na amamentação dos bebês.

542

543 **Conflito de interesse**

544 Os autores declaram não haver conflito de interesses.

545

546 **Financiamento**

547 Recursos próprios, de taxa de bancada, de bolsa do CNPq, produtividade em
548 pesquisa do orientador.

549

550 **Contribuição de cada autor**

551 DSZ, GCA, RCG, LFMR, BDM, WSRT: participaram na coleta e processamento
552 das amostras. CEF, MVS: participaram da identificação das espécies por
553 espectrometria de massas. VLMR: participou das análises moleculares das
554 amostras. JGP, HL: participaram na elaboração da proposta escrita,
555 acompanhamento nas atividades laboratoriais, e processamento dos dados.

556

557 **Referências**

558

- 559 1. Nações Unidas Brasil. Semana do Aleitamento Materno 2022 debate
560 educação e apoio [Internet]. Brasília, DF: ONU Brasil; 2022 [cited 2024
561 April 17]. Available from: [https://brasil.un.org/pt-br/193006-semana-do-](https://brasil.un.org/pt-br/193006-semana-do-aleitamento-materno-2022-debate-educa%C3%A7%C3%A3o-e-apoio)
562 [aleitamento-materno-2022-debate-educa%C3%A7%C3%A3o-e-apoio](https://brasil.un.org/pt-br/193006-semana-do-aleitamento-materno-2022-debate-educa%C3%A7%C3%A3o-e-apoio)
- 563 2. Zielińska MA, Sobczak A, Hamułka J. Breastfeeding knowledge and
564 exclusive breastfeeding of infants in first six months of life [Internet]. Vol.
565 68, Hig. 2017. Disponível em: http://wydawnictwa.pzh.gov.pl/roczniki_pzh/

- 566 3. Fundação Oswaldo Cruz. Rede Brasileira de Leite Humano. Normas
567 Técnicas e Manuais [Internet]. Rio de Janeiro: Brasil; 2021 [cited 2024 April
568 17]. Available from: <https://rblh.fiocruz.br/normas-tecnicas-e-manuais>
- 569 4. Ministério da Saúde. Banco de Leite Humano. Secretaria de Atenção
570 Primária à Saúde – SAPS [Internet]. Brasília: MS; 2022 [cited 2024 April
571 17]. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/acao-a-informacao/acoes-e-programas/banco-de-leite-humano>
572
- 573 5. Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, et al.
574 The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and
575 disease. *Pharmacol Res.* 2013;69(1):1–10. doi:
576 10.1016/j.phrs.2012.09.001
- 577 6. Pärnänen K, Karkman A, Hultman J, Lyra C, Bengtsson-Palme J, Larsson
578 DGJ, et al. Maternal gut and breast milk microbiota affect infant gut
579 antibiotic resistome and mobile genetic elements. *Nat Commun.*
580 2018;9(1):3891. doi: 10.1038/s41467-018-06393-w
- 581 7. Guimarães Fde F, Nóbrega DB, Richini-Pereira VB, Marson PM, de
582 Figueiredo Pantoja JC, Langoni H. Enterotoxin genes in coagulase-
583 negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *J*
584 *Dairy Sci.* maio de 2013;96(5):2866–72. doi: 10.3168/jds.2012-5864
- 585 8. Fetsch A, Johler S. *Staphylococcus aureus* as a foodborne pathogen. *Curr*
586 *Clin Microbiol Rep.* 2018;5(2):88–96. doi: 10.1007/s40588-018-0094-x
- 587 9. Bencardino D, Amagliani G, Brandi G. Carriage of *Staphylococcus aureus*
588 among food handlers: An ongoing challenge in public health. *Food Control.*
589 2021;130:108362. doi: 10.1016/j.foodcont.2021.108362
- 590 10. Vázquez-Román S, Garcia-Lara NR, Escuder-Vieco D, Chaves-Sánchez
591 F, De la Cruz-Bertolo J, Pallas-Alonso CR. Determination of Dornic Acidity
592 as a method to select donor milk in a milk bank. *Breastfeeding Medicine.*
593 2013;8(1):99–104. doi: 10.1089/bfm.2011.0091
- 594 11. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing
595 by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* abril de
596 1966;45(4):493–6.

- 597 12. Chaves RG, Lamounier JA, César CC. Medicines and breastfeeding:
598 update and revision applied to mother and baby care. *Revista Paulista de*
599 *Pediatrics*. 2007;25(3):276–88. doi: 10.1590/S0103-05822007000300014
- 600 13. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th
601 ed. CLSI standards M100. Clinical and Laboratory Standards Institute;
602 2020. 332p.
- 603 14. Barreiro JR, Gonçalves JL, Braga PAC, Dibbern AG, Eberlin MN, Veiga dos
604 Santos M. Non-culture-based identification of mastitis-causing bacteria by
605 MALDI-TOF mass spectrometry. *J Dairy Sci*. 2017;100(4):2928–34. doi:
606 10.3168/jds.2016-11741.
- 607 15. Gonçalves JL, Tomazi T, Barreiro JR, Braga PA de C, Ferreira CR, Araújo
608 Junior JP, et al. Identification of *Corynebacterium* spp. isolated from bovine
609 intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-
610 time of flight mass spectrometry. *Vet Microbiol*. 2014;173(1–2):147–51. doi:
611 10.1016/j.vetmic.2014.06.028.
- 612 16. Nunes ELdeC, dos Santos KRN, Mondino PJJ, de Freire Bastos M do C,
613 Giambiagi-deMarval M. Detection of ileS-2 gene encoding mupirocin
614 resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR.
615 *Diagn Microbiol Infect Dis*. junho de 1999;34(2):77–81. doi: 10.1016/s0732-
616 8893(99)00021-8
- 617 17. Omwenga I, Aboge GO, Mitema ES, Obiero G, Ngaywa C, Ngwili N, et al.
618 *Staphylococcus aureus* enterotoxin genes detected in milk from various
619 livestock species in northern pastoral region of Kenya. *Food Control*.
620 setembro de 2019;103:126–32. doi: 10.1016/j.foodcont.2019.04.005
- 621 18. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC-Resolução nº 171, de 04
622 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o
623 funcionamento de Bancos de Leite Humano. Ministério da Saúde; 2006
624 [cited 2024 April 17]. Available from: [https://www.gov.br/saude/pt-](https://www.gov.br/saude/pt-br/aceso-a-informacao/acoes-e-programas/banco-de-leite-humano/legislacao/resolucao-rdc-no-171.pdf/view)
625 [br/aceso-a-informacao/acoes-e-programas/banco-de-leite-](https://www.gov.br/saude/pt-br/aceso-a-informacao/acoes-e-programas/banco-de-leite-humano/legislacao/resolucao-rdc-no-171.pdf/view)
626 [humano/legislacao/resolucao-rdc-no-171.pdf/view](https://www.gov.br/saude/pt-br/aceso-a-informacao/acoes-e-programas/banco-de-leite-humano/legislacao/resolucao-rdc-no-171.pdf/view)

- 627 19. Togo A, Dufour JC, Lagier JC, Dubourg G, Raoult D, Million M. Repertoire
628 of human breast and milk microbiota: a systematic review. *Future Microbiol.*
629 2019;14(7):623–41. doi: 10.2217/fmb-2018-0317
- 630 20. Zimmermann P, Curtis N. Breast milk microbiota: A review of the factors
631 that influence composition. *Journal of Infection.* 2020;81(1):17–47. doi:
632 10.1016/j.jinf.2020.01.023
- 633 21. Ward TL, Hosid S, Ioshikhes I, Altosaar I. Human milk metagenome: a
634 functional capacity analysis. *BMC Microbiol.* 2013;13(1):116. doi:
635 10.1186/1471-2180-13-116
- 636 22. Jiménez E, de Andrés J, Manrique M, Pareja-Tobes P, Tobes R, Martínez-
637 Blanch JF, et al. Metagenomic analysis of milk of healthy and mastitis-
638 suffering women. *Journal of Human Lactation.* 2015;31(3):406–15. doi:
639 10.1177/0890334415585078
- 640 23. Jost T, Lacroix C, Braegger CP, Chassard C. New insights in gut microbiota
641 establishment in healthy breast fed neonates. *PLoS One.*
642 2012;7(8):e44595. doi: 10.1371/journal.pone.0044595
- 643 24. Li SW, Watanabe K, Hsu CC, Chao SH, Yang ZH, Lin YJ, et al. Bacterial
644 composition and diversity in breast milk samples from mothers living in
645 Taiwan and Mainland China. *Front Microbiol.* 2017;8. doi:
646 10.3389/fmicb.2017.00965
- 647 25. Murphy K, Curley D, O’Callaghan TF, O’Shea CA, Dempsey EM, O’Toole
648 PW, et al. The composition of human milk and infant faecal microbiota over
649 the first three months of life: A pilot study. *Sci Rep.* 17 de janeiro de
650 2017;7(1):40597. doi: 10.1038/srep40597
- 651 26. Williams JE, Carrothers JM, Lackey KA, Beatty NF, York MA, Brooker SL,
652 et al. Human milk microbial community structure is relatively stable and
653 related to variations in macronutrient and micronutrient intakes in healthy
654 lactating women. *J Nutr.* 2017;147(9):1739–48. doi: 10.3945/jn.117.248864
- 655 27. Chen PW, Tseng SY, Huang MS. Antibiotic Susceptibility of Commensal
656 Bacteria from Human Milk. *Curr Microbiol.* 22 de fevereiro de
657 2016;72(2):113–9.

- 658 28. Chaves JO, Fernandes AM de F, Parreiras PM, Passos MC, Cunha LR da,
659 Menezes CC. Compliance in handling of donated raw breast milk to human
660 milk banks regarding microbiological quality. *Revista Brasileira de Saúde*
661 *Materno Infantil*. 2022;22(4):863–70. doi: 10.1590/1806-
662 9304202200040008
- 663 29. Oliveira C de, Lopes-Júnior LC, Sousa CP de. Qualidade microbiológica
664 do leite humano pasteurizado de um Banco de Leite Paulista. *Acta Paulista*
665 *de Enfermagem*. 2022;35. doi: 10.37689/acta-ape/2022AO00771
- 666 30. Salerno T, Siqueira AK, Pinto JP de AN, Cunha M de LR de S da, Silvestre
667 PK, Condas LAZ, et al. Safety issues of raw milk: evaluation of
668 bacteriological and physicochemical characteristics of human milk from a
669 bank in a teaching hospital, focusing on *Staphylococcus* species. *Rev Inst*
670 *Med Trop Sao Paulo*. 2021;63. doi: 10.1590/S1678-9946202163054
- 671 31. Boix-Amorós A, Collado MC, Mira A. Relationship between milk microbiota,
672 bacterial load, macronutrients, and human cells during lactation. *Front*
673 *Microbiol*. 2016;7. doi: 10.3389/fmicb.2016.00492
- 674 32. Cacho NT, Harrison NA, Parker LA, Padgett KA, Lemas DJ, Marcial GE, et
675 al. Personalization of the microbiota of donor human milk with mother's own
676 milk. *Front Microbiol*. 2017;8. doi: 10.3389/fmicb.2017.01470
- 677 33. Moraes PS de, Oliveira MMB de, Dalmas JC. Perfil calórico do leite
678 pasteurizado no banco de leite humano de um hospital escola. *Revista*
679 *Paulista de Pediatria*. 2013;31(1):46–50. doi: 10.1590/S0103-
680 05822013000100008
- 681 34. Pärnänen K, Karkman A, Hultman J, Lyra C, Bengtsson-Palme J, Larsson
682 DGJ, et al. Maternal gut and breast milk microbiota affect infant gut
683 antibiotic resistome and mobile genetic elements. *Nat Commun*.
684 2018;9(1):3891. doi: 10.1038/s41467-018-06393-w
- 685 35. Zhang K, Jin M, Yang D, Shen Z, Liu W, Yin J, et al. Antibiotic resistance
686 genes in gut of breast-fed neonates born by caesarean section originate
687 from breast milk and hospital ward air. *BMC Microbiol*. 29 de dezembro de
688 2022;22(1):36. doi: 10.1186/s12866-022-02447-8

- 689 36. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia clínica para o
690 controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Módulo 10-
691 Detecção dos Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana aos
692 Antimicrobianos pelo Laboratório de Microbiologia Clínica [Internet].
693 Brasília: Anvisa; 2020 [cited 2024 April 20]. 162 p. Available from:
694 [https://www.gov.br/anvisa/pt-](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/modulo-10_manual-de-microbiologia.pdf)
695 [br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/modulo-](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/modulo-10_manual-de-microbiologia.pdf)
696 [10_manual-de-microbiologia.pdf](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/modulo-10_manual-de-microbiologia.pdf)
- 697 37. Delgarm Shams-Abadi A, Mohammadian-Hafshejani A, Paterson DL,
698 Arash R, Asadi Farsani E, Taji A, et al. The prevalence of colistin resistance
699 in clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates worldwide: a systematic
700 review and meta-analysis. *BMC Microbiol.* 2023;23(1):200. doi:
701 10.1186/s12866-023-02950-6
- 702 38. Fundação Oswaldo Cruz. rBLH-Brasil-Comitê de Monitoramento da
703 Agenda 2030 [Internet]. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2022 [cited 2024 Feb 05].
704 Available from: www.rblh.fiocruz.br

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.