



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

LUANA ANDRADE MENDES SANTANA

**IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DE RESISTÊNCIA E
PATOGENICIDADE DE *Enterococcus* spp. EM AMOSTRAS DE
DOADORAS DO BANCO DE LEITE HUMANO DO
HOSPITAL ESAÚ MATOS EM VITÓRIA DA CONQUISTA
(BA).**

Vitória da Conquista, BA

2019

LUANA ANDRADE MENDES SANTANA

**IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DE RESISTÊNCIA E
PATOGENICIDADE DE *Enterococcus* spp. EM AMOSTRAS DE
DOADORAS DO BANCO DE LEITE HUMANO DO
HOSPITAL ESAÚ MATOS EM VITÓRIA DA CONQUISTA
(BA).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Vasconcelos Oliveira
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista, BA

2019

LUANA ANDRADE MENDES SANTANA

**IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DE RESISTÊNCIA E
PATOGENICIDADE DE *Enterococcus* spp. EM AMOSTRAS DE
DOADORAS DO BANCO DE LEITE HUMANO DO
HOSPITAL ESAÚ MATOS EM VITÓRIA DA CONQUISTA
(BA).**

Esta dissertação trata-se de volume apreciado por banca examinadora para obtenção do grau de Mestre em Biociências pelo Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista – BA, 27 de maio de 2019.

Prof. Dr. Márcio Vasconcelos Oliveira (Orientador)

Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Lucas Miranda Marques (Examinador)

Universidade Federal da Bahia

Prof^a Dr^a Milena Soares dos Santos (Examinadora)

Universidade Federal da Bahia

Aos meus pais Luis Carlos e Aida, alicerces da minha vida, meu esposo Danilo e meu irmão Lucas que sempre estiveram ao meu lado, acreditando e torcendo, dedico esta realização!

AGRADECIMENTOS

Foram muitos os degraus durante toda a trajetória para a realização desse momento. A cada um, um aprendizado que levarei por todo o percurso restante e as lembranças dos amigos que conquistei.

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Luis Carlos e Aida (*in memoriam*), por todo amor e dedicação. Vocês são meu porto seguro! Me ensinaram a arte da vida e sempre estiveram ao meu lado, acreditando e apontando o caminho certo. Agradeço a Deus por me abençoar em nascer deles e por sempre me proteger e amparar nos momentos difíceis.

Ao meu esposo Danilo, presente da vida, por tanto cuidado e amor. Sem você, nenhuma conquista valeria a pena!

Ao meu irmão Lucas, por estar sempre comigo pela “grande caminhada”. Pelo amor, apoio e acreditar tanto em mim. À minha irmã Laís por toda a torcida e companheirismo ao “visitar minhas bactérias”.

À minha família (em especial Tia Viu, Camila, Danielle e Carol) e amigos, pela compreensão, apoio e carinho! À família que ganhei através de meu esposo: Severino, Fátima, Camila, Diêgo, Lhais, André e Jéssica, muito obrigada.

Ao meu orientador Márcio Vasconcelos que, desde o primeiro momento, sempre acreditou e apoiou a causa. Obrigada pela atenção, ensinamentos e delicadeza, quando mais precisei.

Aos professores Lucas Miranda, Milena Soares e Cláudio Lima por todo o apoio e ajuda. Aos funcionários do IMS/CAT-UFBA. Aos amigos que o Mestrado em Biociências me proporcionou! Obrigada pelos momentos, pelas aulas, conversas, cafés e cumplicidade.

Às minhas parceiras de pesquisa, Fabrícia e Nívea (e família). Vocês foram essenciais nessa conquista. Aos amigos Gladis, Kelle, Ana Cláudia e Jéssica Bomfim. Ao amigo Lucas Santana e todo o Laboratório de Microbiologia do IMS/CAT-UFBA, obrigada pelo apoio.

Ao Banco de Leite do Hospital Esaú Matos, especialmente a Tamyla, Shyrlei e Audrey. Como também, muito obrigada a todas as doadoras pelo lindo fato de doarem leite materno e participarem do estudo.

Obrigada, muito obrigada!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

SANTANA, L. A. M. **Identificação, caracterização de resistência e patogenicidade de *Enterococcus* spp. em amostras de doadoras do Banco de Leite Humano do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista (BA).** Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2019.

O leite humano é a fonte alimentar primordial para os recém-nascidos e lactentes. Frequentemente, recém-nascidos internados necessitam de suporte nutricional de um Banco de Leite Humano (BLH). Considerando a rica composição de nutrientes do leite humano, esse pode se tornar um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de diversos microrganismos. No BLH, o leite humano doado precisa passar por rigoroso controle de qualidade microbiológico para ser disponibilizado. As possíveis causas de elevação da quantidade de microrganismos no leite humano podem estar relacionadas com as técnicas inadequadas de coleta, com condições de higiene da doadora e dos utensílios utilizados e com a forma de conservação do alimento. Entre os microrganismos associados a importantes infecções em recém-nascidos, e que podem ser contaminantes de amostras de leite humano ordenhado, estão as espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus*. *Enterococcus* spp. podem advir da microbiota do trato gastrointestinal e pele de doadoras saudáveis, podendo ser patogênicas para os recém-nascidos com vulnerabilidade imunológica e precisam, portanto, serem efetivamente inativadas pelo processo de pasteurização realizado no BLH. Diante da importância de *Enterococcus* spp. em patologias humanas, sobretudo em neonatos, o objetivo do estudo foi identificar e caracterizar resistência e virulência destes microrganismos no leite humano do BLH do Hospital Municipal Esaú Matos de Vitória da Conquista, Bahia. Ademais, verificou-se as condições higiênico-sanitárias das 30 doadoras participantes do estudo, a fim de esclarecer possíveis meios de contaminação do leite ordenhado. Foram coletadas amostras da região mamilo-areolar e mãos das doadoras, com a utilização de *swab* estéril único, e alíquotas de leite cru e leite pasteurizado. O isolamento e identificação dos *Enterococcus* spp. foram realizados de modo convencional. Para o antibiograma foi utilizado o método de disco difusão. Técnicas de biologia molecular, foram utilizadas para pesquisa de genes de resistência e virulência. Entre as 30 doadoras analisadas, foram identificados espécimes de *Enterococcus* spp. em 30% (n=9), sendo isolados 11 espécimes. Não houve detecção em amostras de leite humano pasteurizado. A resistência à tetraciclina foi a mais encontrada, em 63% dos isolados (n=7), seguida de sensibilidade intermediária à ciprofloxacino, 27% dos isolados (n=3). Em 63% (n=7) dos isolados, foi encontrado o gene *efaA*, associado a formação de biofilmes, endocardites e bacteremias, e em 27% (n=3) o gene *ace*, também associado a endocardites. O presente estudo apresentou a responsabilidade do controle microbiológico pelo Banco de Leite Humano e a necessidade de traçar alternativas para impedir a chegada de espécies de *Enterococcus* spp. em ambiente hospitalar (dispersão de patógenos comunitários em ambiente hospitalar, e vice-versa), possivelmente como causadores de infecções neonatais importantes que aumentam o tempo de internamento e, conseqüentemente, os custos do serviço de saúde.

Palavras-Chave: Leite humano. *Enterococcus* spp. Virulência.

ABSTRACT

SANTANA, L. A. M. **Identification, characterization of resistance and pathogenicity of *Enterococcus* spp. in donor samples from the Breastmilk Bank of the Municipal Hospital Esau Matos in Vitória da Conquista (BA)**. Dissertation (Master in Biosciences) - Multidisciplinary Institute of Health, Federal University of Bahia, Vitoria da Conquista, 2019.

Human milk is the primary food source for newborns and infants. Often, hospitalized infants need nutritional support from a Breastmilk Bank (BB). Considering the rich nutrient composition of human milk, milked human milk can become an excellent culture medium for the development of various microorganisms. At BB, donated human milk must undergo strict microbiological quality control to be made available. The possible causes of increase of the amount of microorganisms in the human milk can be related to the inadequate techniques of collection, with donor hygiene conditions, the used utensils and with the form of food conservation. Among the microorganisms associated with important infections in newborns, which may be contaminants of samples of milked human milk, are the species belonging to the genus *Enterococcus*. *Enterococcus* spp. may arise from the microbiota of the gastrointestinal tract and the skin of healthy donors and may be pathogenic newborns with immunological vulnerability and therefore need to be effectively inactivated by the process of pasteurization performed at the BB. Given the importance of *Enterococcus* spp. the aim of this study was to identify and characterize the resistance and virulence of these microorganisms in the Breastmilk Bank of the Municipal Hospital Esau Matos in Vitória da Conquista, Bahia. In addition, the hygienic-sanitary conditions of the 30 donors were verified, in order to clarify possible means of contamination of the milked milk. Isolation and identification of *Enterococcus* spp. were performed in conventional manner. Samples were collected from the nipple-areolar region and donor hands, using single sterile swab, and aliquots of raw milk and pasteurized milk. Isolation and identification of *Enterococcus* spp. were performed in conventional manner. For the antibiogram the diffusion disc method was performed. Molecular biology techniques were used for resistance and virulence genes. Among the 30 donors analyzed, specimens of *Enterococcus* spp. in 30% (n = 9), and 11 specimens were isolated. There was no detection in pasteurized human milk samples. Tetracycline resistance was the most found in 63% of the isolates (n = 7), followed by intermediate sensitivity to ciprofloxacin, 27% of the isolates (n = 3). In 63% of the isolates (n = 7), the *efaA* gene was associated with the formation of biofilms, endocarditis and bacteremia, and in 27% (n = 3) the *ace* gene, also associated with endocarditis. The present study presented the responsibility of the microbiological control by Breastmilk Bank and the need to outline alternatives to prevent the arrival of species of *Enterococcus* spp. in the hospital environment (dispersion of community pathogens, which may present high pathogenicity and drug resistance, in a hospital environment and vice versa), possibly as causes of important neonatal infections that increase the hospitalization time and, consequently, the costs of the health Service.

Keywords: Human milk. *Enterococcus* spp. Virulence.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - *Enterococcus* spp., não hemolítico, em meio Ágar Sangue 5%. 34
- Figura 2** - Cepa de *Enterococcus* spp. – colônias azuis – em meio Chromagar Orientation (BD™ CHROMagar™ Orientation). 34
- Figura 3** - Bacterioscopia por coloração de Gram: *Enterococcus* spp. 35
- Figura 4** - Resultado positivo (à esquerda) para testes de bile esculina e caldo hipercloretado: *Enterococcus* spp. 37
- Figura 5** - Antibiograma Método de Kirby e Bauer para um espécime de *Enterococcus* spp. isolado no estudo. 39
- Figura 1** – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação genotípica da presença dos genes constitutivos *ddl - ddl E. faecalis* (941pb) e *ddl E. faecium* (550pb) – para diferenciação de espécies de *Enterococcus* spp. em amostras de doadoras do Banco de Leite Materno do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista (BA), 2019. Colunas 1 a 5: amostras de Swab (S) e Leite humano cru (L). Coluna 6: Controle negativo. Coluna 7: Padrão de peso molecular – 100pb. 72
- Figura 2** – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação genotípica da presença dos genes constitutivos *ddl - ddl E. faecalis* (941pb) e *ddl E. faecium* (550pb) – para diferenciação de espécies de *Enterococcus* spp. em amostras de doadoras do Banco de Leite Materno do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista (BA), 2019. Colunas 1 a 6: amostras de Swab (S) e Leite humano cru (L). Coluna7: Controle negativo. Coluna 8: Padrão de peso molecular – 100pb. 72
- Figura 3** – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação genotípica da presença dos genes os genes de virulência *ace* (320pb), *efaA* (499pb) e *gelE* (402pb) nos isolados de *Enterococcus* spp. em amostras de doadoras do Banco de Leite Materno do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista (BA), 2019. Colunas 1 a 5: amostras de Swab (S) e Leite humano cru (L). Coluna 6: Controle negativo. Coluna 7: Padrão de peso molecular – 100pb. 73
- Figura 4** – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação genotípica da presença dos genes os genes de virulência *ace* (320pb), *efaA* (499pb) e *gelE* (402pb) nos isolados de *Enterococcus* spp. em amostras de doadoras do Banco de Leite Materno do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista (BA), 2019. Colunas 1 a 6: amostras de Swab (S) e Leite humano cru (L). Coluna 7: Controle negativo. Coluna 8: Padrão de peso molecular – 100pb. 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Benefícios da amamentação e considerações (adaptado de BRASIL, 2015).	18
Tabela 2 – Genes para fatores de virulência em <i>Enterococcus faecalis</i> (adaptado de EATON & GASSON, 2001).	25
Tabela 3 – Relação dos antimicrobianos utilizados no antibiograma para espécimes de <i>Enterococcus</i> spp.	38
Tabela 4 – Genes constitutivos <i>ddl</i> em <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i> , sequências dos <i>primers</i> e tamanhos (pb).	40
Tabela 5 – Detecção do gene de resistência à quinolonas <i>gyrA</i> em amostras de <i>Enterococcus</i> spp.	41
Tabela 6 – Detecção do gene de resistência à quinolonas <i>parC</i> em amostras de <i>Enterococcus</i> spp.	42
Tabela 7 – Detecção de genes de virulência <i>ace</i> , <i>efaA</i> , <i>gelE</i> e <i>as</i> em amostras de <i>Enterococcus</i> spp.	43
Tabela 8 – Detecção de genes de virulência <i>cylA</i> e <i>hyl</i> em amostras de <i>Enterococcus</i> spp.	43
Tabela 9 – Detecção do gene de virulência <i>esp</i> em amostras de <i>Enterococcus</i> spp.	44
Tabela 10 – Detecção de genes de enterocinas Enterocina A, Enterocina B, Enterocina P e Enterocina 31 em amostras de <i>Enterococcus</i> spp.	45
Tabela 1 – Análise Descritiva dos aspectos socioeconômicos e condições higiênico-sanitárias de coleta das doadoras de LH (n = 30) cadastradas no BLH do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista (BA) – 2018.	63
Tabela 2 – Perfil de sensibilidade dos isolados (n=11) de <i>Enterococcus</i> spp. encontrado frente ao rol de antimicrobianos utilizados seguindo as recomendações do <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> [(CLSI), 2017].	65

Tabela 3 – Distribuição dos genes de virulência de *E. faecium*, *E. faecalis* e **67**
Enterococcus spp.

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

RN	Recem-Nascido
BLH	Banco de Leite Humano
LH	Leite Humano
LHO	Leite Humano Ordenado
LHOC	Leite Humano Ordenado Cru
LHOP	Leite Humano Ordenado Pasteurizado
AME	Aleitamento Materno Exclusivo
IRAS	Infecção Relacionada  Assistência  Saúde
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
OMS	Organização Mundial da Saúde
BAL	Bactérias cido-Lticas
VRE	Enterococcus Resistente  Vancomicina
AS	Substância de Agregaco
C	Graus celsius
BHI	Brain Heart Infusion
v/v	Volume/Volume
DNA	cido Desoxirribonucleico
PCR	Reaco em Cadeia da Polimerase
dNTP	Deoxinucleotdeo trifosfato
<i>Primer</i>	Oligonucleotídeo iniciador
PBS	Phosphate Buffer Saline
RPM	Rotações por minuto
UFC	Unidade formadora de colnia
pb	Pares de base

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Leite Materno	16
2.2 Banco de Leite	19
2.3 <i>Enterococcus</i> spp.	21
2.4 Perfil de resistência antimicrobiana de <i>Enterococcus</i> spp.	23
2.5 Fatores de patogenicidade e virulência de <i>Enterococcus</i> spp.	24
2.6 Estudos sobre a qualidade microbiológica do leite humano ordenhado em Vitória da Conquista – BA	26
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4. METODOLOGIA	29
4.1 Delineamento do estudo	29
4.2 Descrição do local de coleta	29
4.3. Aspectos éticos	29
4.4 Descrição das amostras	30
4.5 Descrição da coleta de amostras e dados	31
4.6. Isolamento e identificação de <i>Enterococcus</i> spp.	32
4.6. 1 Identificação de <i>Enterococcus</i> spp.	33
4.6.1.1. Características morfotintoriais	35
4.6.1.2. Produção da enzima catalase	36
4.6.1.3 Hidrolise da esculina em presença de bile e caldo hipercloretado (NaCl 6,5%)	36
4.6.1.4 Armazenamento / criopreservação dos isolados	37
4.7 Antibiograma	37
4.8 Extração do DNA	39

4.9 Detecção dos genes constitutivos de <i>Enterococcus</i> spp.	40
4.10 Detecção dos genes de resistência	41
4.11 Detecção dos genes de virulência	42
4.11.1 Genes de virulência <i>ace</i> , <i>efaA</i> e <i>gelE</i> e <i>as</i>	42
4.11.2 Genes de virulência <i>cylA</i> e <i>hyl</i>	43
4.11.3 Genes de virulência <i>esp</i>	44
4.12 Amplificação dos genes de enterocinas	44
4.13 Análise estatística de dados	46
6. CAPÍTULO 1	47
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
APÊNDICES	77
ANEXOS	78

1. INTRODUÇÃO

O leite humano (LH) é a primeira opção alimentar para recém-nascidos (RNs) e lactentes nos primeiros meses de vida. Sua composição apresenta vários nutrientes em concentrações adequadas à adaptação da criança na fase extrauterina (JELLIFE & JELLIFE, 1979). Biologicamente é um fluido complexo contendo proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais, componentes imunológicos tais como IgA, enzimas, interferon, além de fatores tróficos ou moduladores de crescimento (EUCLIDES, 2000).

Estudos comprovaram que o leite humano também é uma fonte de microrganismos para a colonização inicial do intestino ou para composição inicial da microbiota intestinal do recém-nascido (ALMEIDA, J. A. G., 1999; BRASIL, 2008; COSTA, 2004). A colonização e o desenvolvimento desta microbiota são favorecidos em lactentes em aleitamento materno exclusivo (AME) pela ação dos promotores de crescimento presentes do leite humano, como oligossacarídeos que favorecem a multiplicação de bactérias desejáveis (DA COSTA, 2012).

Uma microbiota bem formada, constituída de microrganismos pouco virulentos, protege o recém-nascido daqueles potencialmente patogênicos (MUSSI-PINHATA & DO NASCIMENTO, 2001). A coleção microbiana encontrada no leite humano em condições desejadas é comumente constituída por espécies comensais de Estafilococos, Estreptococos, Corynebacteria e Bifidobacteria, que são frequentemente encontradas no mamilo, auréola e tecidos adjacentes, bem como ductos lactíferos colonizados (MACKIE, SCHIR, GASKINS, 1999).

O aleitamento materno é um método natural e seguro de alimentação para os bebês, proporcionando vantagens nutricionais, imunológicas e psicológicas, além de vantagens econômicas reconhecidas e inquestionáveis (UNICEF, 1984). Quando os recém-nascidos prematuros não dispõem de forças para sugar o leite materno, quando algumas mães, por algum problema fisiológico ou emocional, não conseguem o produzir ou mesmo em casos de morte materna (principalmente em decorrência de complicações obstétricas), os RNs podem ser alimentados com leite obtido em Bancos de Leite Humano – BLH (SERAFINI et al., 2003).

O Banco de Leite Humano é um centro especializado responsável pela promoção e incentivo ao aleitamento materno, execução das atividades de coleta, processamento e controle de qualidade de colostro, leite de transição e leite maduro para posterior distribuição a bebês que dele necessitam como fator de sobrevivência, sob prescrição de médico ou de nutricionista (ALMEIDA, J. A. G., 1999). Um dos pontos de alerta mais importantes com os BLHs é o controle microbiológico do leite doado, pois este pode ser um excelente meio de cultura para

vários tipos de microrganismos, introduzidos durante a coleta e transporte até o processamento, uma vez que não dispõe de nenhuma barreira física que impeça a penetração de patógenos contaminantes (IKONEM, MIETTINEM, GROONOS, 1982).

As possíveis causas de elevação da quantidade de microrganismos no leite humano podem estar relacionadas com as técnicas inadequadas de coleta, com condições de higiene da doadora e dos utensílios utilizados e com a forma de conservação do alimento (BRASIL, 2008). Nesse sentido, o controle de qualidade do leite humano ordenhado cru (LHOC) e do leite humano ordenhado pasteurizado (LHOP) devem ser rígidos para que não se colecionem malefícios aos usuários do produto do BLH, uma vez que os bebês possuem vulnerabilidade nutricional e imunológica.

A vulnerabilidade dos bebês pode ser responsável por importantes infecções, sendo classificada neste caso como infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS). Considerando a alta suscetibilidade a contaminações do leite materno, o risco de causar danos à saúde dos que fazem uso de leite humano ordenhado (LHO) é elevado (COSTA, 2004) quando não adotadas medidas preventivas eficazes. As infecções nosocomiais em neonatos apresentam um alto custo para o serviço público (MUSSI-PINHATA & DO NASCIMENTO, 2001), sendo as altas taxas de infecções hospitalares entre recém-nascidos uma grande preocupação na área da saúde pública.

Entre os microrganismos associados a importantes infecções de RNs, e que podem ser contaminantes de amostras de LHO, estão as espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus*. *Enterococcus* spp. são integrantes da microbiota do trato gastrointestinal de humanos saudáveis (MURRAY et al., 2004), podendo estar presente em número significativo nas mãos e utensílios de doadoras de leite, a depender de suas condições higiênicas. A presença dessas bactérias no LH indica que o mesmo entrou em contato, de forma direta ou indireta, com material de origem fecal, comprometendo a qualidade do LHO (NOVAK, F. R. et al., 2001).

A maior parte das infecções por *Enterococcus* spp. originam-se da microbiota normal do paciente, como podem ser transferidos de paciente para paciente ou adquiridos através do consumo de água ou alimentos contaminados (MURRAY et al., 2004), como exemplo o leite humano. Espécies de *Enterococcus* spp., sobretudo *E. faecalis* e *E. faecium*, podem ser patogênicas para os recém-nascidos e precisam, portanto, ser efetivamente inativados pelo processo de pasteurização realizado no BLH (MENEZES, G., 2011).

Martin e colaboradores realizaram estudos em 2003 e 2007 onde isolaram, em LH, cepas de *Enterococcus faecium*, entre outros patógenos, por meio do isolamento de DNA bacteriano, em amostras realizadas quatro dias após os partos. Em amostras coletadas sete dias após os

partos, identificaram a presença de bactérias gram-positivas, entre elas, cepas de *E. faecalis* e *E. faecium*., utilizando o mesmo método; o que reforça a facilidade de contaminação do leite humano por *Enterococcus* spp.

O gênero *Enterococcus* constitui o grupo das bactérias ácido-láticas (BAL) mais controverso pois, mesmo tendo grande potencial biotecnológico, tem associação com doenças graves envolvendo seres humanos. Ademais, têm-se revelado cada vez mais como microrganismos que apresentam cepas com perfil de multirresistência à fármacos de uso terapêutico (FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006). A resistência aos antimicrobianos aminoglicosídeos, ampicilina, penicilina e vancomicina, para tratamento de infecções por *Enterococcus* spp. tem constituído um importante problema para os pacientes infectados por estes microrganismos, contribuindo para a redução das opções de tratamento (HONER et al., 2005; GOMES, 2013). Os fatores que determinam a patogenicidade e os níveis de regulação genética em *Enterococcus* spp. ainda não estão bem esclarecidos. A presença de fatores de virulência e a capacidade de produzir aminas biogênicas estão sendo associados a casos de multirresistência (GOMES, 2013).

Considerando a necessidade de suprir a demanda nutricional em neonatos com indicação, é necessário o cumprimento rigoroso de todos os passos para garantir o controle microbiológico do leite humano ofertado pelos BLHs. Tendo passado pelas etapas, da coleta até a disponibilização aos RNs, conforme condições higiênico sanitárias adequadas é possível ofertar um leite de qualidade e livre de contaminação por microrganismos patogênicos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leite Materno

Mesmo com os consideráveis avanços tecnológicos atuais nos campos de produção, processamento, conservação e preparo de alimentos para crianças nos primeiros meses e anos de vida, o consenso é que não existe um substituto ideal para o leite humano (SILVA, V. A. A. L. et al., 2018). Na primeira fase da vida, o LH é o alimento que reúne as características nutricionais adequadas, com balanceamento adequado de nutrientes (ARAÚJO et al., 2010).

O LH possui características essenciais para suprir as demandas dos recém-nascidos, pois contém todos os nutrientes que atendem apropriadamente as necessidades fisiológicas e metabólicas (BORGES, M.S., 2016). A composição do leite humano inclui todos os nutrientes

essenciais para o crescimento e desenvolvimento dos lactentes, contando com cerca de 250 (ou mais) de bioativos. Dentre eles, destacam-se fatores antimicrobianos, anti-inflamatórios, enzimas digestivas, hormônios, fatores de crescimento e imunomoduladores (BONFIM, 2018).

No leite humano as proteínas possuem atividade antimicrobiana, o que favorece indiretamente o desenvolvimento da microbiota bífida. Estudos comprovam que o LH serve como fonte de microrganismos para a colonização inicial da microbiota de bebês RNs. O desenvolvimento dessa microbiota, considerando a colonização, é favorecido em lactentes com aleitamento materno exclusivo (DA COSTA, 2012).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o Aleitamento Materno Exclusivo até os seis meses de vida. O aleitamento materno exclusivo é quando o bebê recebe somente leite humano, direto da mama ou de forma ordenhada, como também leite humano de outra fonte, sem outros líquidos ou sólidos, com exceção de gotas ou xaropes contendo vitaminas, sais de reidratação oral, suplementos minerais ou medicamentos (WHO, 2007).

A amamentação permite o desenvolvimento de vantagens imunológicas, como também psicológicas, que são importantes para a diminuição da morbidade e da mortalidade infantil (ARAÚJO et al., 2010). Durante a infância, é de fundamental importância a oferta de uma nutrição apropriada, garantindo assim que os bebês atinjam crescimento adequado, saúde e desenvolvimento potenciais (WHO, 2007). O aleitamento materno é a mais sábia estratégia natural de vínculo, afeto, proteção e nutrição para a criança e constitui a mais sensível, econômica e eficaz intervenção para redução da morbimortalidade infantil (BRASIL, 2009).

A Tabela 1 a seguir, adaptada do Caderno de Saúde da Criança: aleitamento materno e alimentação complementar (BRASIL, 2015), demonstra os benefícios imediatos e a longo prazo do aleitamento materno, considerando mãe e bebê.

Tabela 1: Benefícios da amamentação e considerações (adaptado de BRASIL, 2015).

Benefícios da Amamentação	Considerações
Evita mortes infantis.	Devido aos fatores existentes no leite humano que protegem contra infecções, ocorrem menos mortes entre as crianças amamentadas. Estima-se que o aleitamento materno pode evitar 13% das mortes em crianças menores de 5 anos em todo o mundo, por causas preveníveis.
Evita diarreias.	Há evidências de que o leite humano protege contra diarreia, principalmente em crianças mais pobres. É importante destacar que essa proteção pode diminuir quando o aleitamento materno deixa de ser exclusivo.
Evita infecções respiratórias e otites.	A proteção é maior quando a amamentação é exclusiva nos primeiros seis meses. Além disso, a amamentação diminui a gravidade dos episódios de infecção respiratória.
Diminui o risco de alergias.	A amamentação exclusiva nos primeiros meses de vida diminui o risco de alergia à proteína do leite de vaca, de dermatite atópica e de outros tipos de alergias, incluindo asma e sibilos recorrentes.
Diminui o risco de hipertensão, colesterol alto e diabetes.	O aleitamento materno apresenta benefícios a longo prazo. Os indivíduos amamentados apresentaram pressões sistólica e diastólica mais baixas (-1,2mmHg e -0,5mmHg, respectivamente), níveis menores de colesterol total (-0,18mmol/L) e risco 37% menor de apresentar diabetes tipo 2. Os benefícios são para o bebê e a mãe. A criança que é amamentada adquire proteção contra diabetes, como também a mulher que amamenta.
Melhor desenvolvimento da cavidade bucal.	O exercício que a criança faz para retirar o leite da mama é muito importante para o desenvolvimento adequado de sua cavidade oral, propiciando uma melhor conformação do palato duro, o que é fundamental para o alinhamento correto dos dentes e uma boa oclusão dentária.

Fonte: BRASIL, 2015.

Indiscutivelmente, o leite humano é o alimento mais completo e indicado para nutrição na primeira fase de vida. Situações como nascimentos prematuros, internações em unidade neonatal, doenças maternas, e/ou baixa produção de leite pelas mães podem levar a dificuldades no estabelecimento e manutenção do aleitamento materno, sendo necessário, portanto, da utilização de outras metodologias para complementar a nutrição dos RNs. Nesse contexto, o

uso do leite humano doado tornou-se uma alternativa eficiente para a amamentação (BORGES, M. S. et al., 2018).

2.2 Banco de Leite

O Banco de Leite Humano é o serviço especializado, responsável por ações de promoção, proteção e apoio ao aleitamento materno, bem como a execução de atividades de coleta da produção láctea da nutriz, seu processamento, controle de qualidade e distribuição (BRASIL, 2006). Os BLHs têm se configurado como um dos mais importantes elementos estratégicos da política pública em favor da amamentação (BRASIL, 2008).

Considerando a rica composição de nutrientes do LH, o leite humano ordenhado pode se tornar um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de diversos microrganismos. O LHO apresenta grande capacidade de absorção e adsorção de substâncias voláteis. Por isso, é recomendado que, nos ambientes onde ocorra coleta e manipulação de LH, não devam existir odores pronunciados, que poderão ser incorporados ao leite, alterando sua composição original (NOVAK, F. R. et al., 2008).

O BLH deve seguir as Boas Práticas de Manipulação do LHO; procedimentos necessários para garantir a qualidade do leite humano ordenhado desde sua coleta até a distribuição. A conservação do LHO visa à preservação das características químicas, físico-químicas, imunológicas e microbiológicas do leite doado (BRASIL, 2006). A adoção de medidas preventivas reduz os riscos operacionais e a contaminação secundária. Para isso, o BLH deve tomar providências para que todas as pessoas que manipulam o LHO recebam instrução adequada e contínua sobre as condições higiênico-sanitárias envolvidas em todas as operações, a fim de que atuem com o devido rigor, desde a coleta até a administração (BRASIL, 2008).

As pessoas que transitam pelo BLH, assim como outros fatores (a exemplo de roupas e utensílios), podem ser carreadores de microrganismos de um local para o outro, podendo funcionar como fontes de contaminação para o leite humano ordenhado (BRASIL, 2008). Com isso, deve-se haver orientação oral e escrita aos profissionais e doadoras em relação às práticas de higienização e antissepsia das mãos e antebraços antes de entrarem na sala de ordenha do leite humano, na recepção de coleta externa e na sala de processamento, garantindo assim a qualidade do leite doado (BRASIL, 2006).

A detecção de *off-flavor*, característica anormal que surge no LHO, no momento da seleção e classificação do LHO nos BLH é um eficiente instrumento capaz de detectar de forma rápida e segura a ocorrência de modificações físico-químicas no leite (NOVAK, F.R. et al. 2008). O LHO acidificado, geralmente, não supre as necessidades nutricionais específicas dos recém-nascidos prematuros, de baixo peso ou imunologicamente vulneráveis, devido a desestabilização de proteínas solúveis e micelas de caseína, favorecimento da coagulação, aumento da osmolaridade, alteração do flavor (sabor e odor), além da redução do valor imunológico do mesmo (NOVAK & CORDEIRO, 2007).

Todo leite humano recebido pelo BLH deve ser submetido aos procedimentos de seleção e classificação (BRASIL, 2008). Com isso, o BLH necessita do cumprimento de medidas para o rigoroso controle microbiológico do LHO. A ordenha e a coleta devem ser realizadas de forma a manter as características químicas, físico-químicas, imunológicas e microbiológicas do leite humano. O material usado na manipulação do LH deve ser previamente esterilizado, exceto a paramentação (BRASIL, 2006).

O BLH deve controlar a temperatura e registrar em planilha específica todas as etapas do fluxograma que exigem cadeia de frio: transporte, estocagem e distribuição (BRASIL, 2006). Considerando cadeia de frio como condição de conservação sob frio, na qual os produtos refrigerados ou congelados devem ser mantidos, da coleta ao consumo, sob controle e registro. O LHOC e o LHOP devem ser transportados de forma que a temperatura máxima não ultrapasse 5°C (cinco graus Celsius) para os produtos refrigerados e -1°C (um grau Celsius negativo) para os produtos congelados, considerando o período máximo para transporte de 6 horas. Após recebimento do LHO, o mesmo deve ser submetido a procedimentos de degelo, seleção e classificação (BRASIL, 2006).

O BLH segue rigorosamente etapas, fluxo do processamento, para manter a integridade físico-química e microbiológica do leite doado, obedecendo as condições de higiene adequadas. Resumidamente, são elas: coleta e recebimento, estocagem do leite humano ordenhado cru, etapa de degelo e reenvase em campo de chama, rotulagem dos frascos, pasteurização (banho-maria - temperatura de 62,5°C por 30 minutos), controle de qualidade microbiológico do leite humano ordenhado após a pasteurização, estocagem, distribuição e porcionamento. Quando necessário, ocorre também a etapa de além da liofilização (BRASIL, 2006).

O LHO proveniente de doadoras saudáveis, submetidas a rigoroso controle de higiene, é considerado livre de microrganismos patogênicos. Sendo assim, quando é caracterizado a

presença microrganismos patogênicos, deve-se considerar a possibilidade de contaminação externa. No caso de LHO em Bancos de Leite, deve-se descartar contaminação externa e realizar a pesquisa e o descarte de prováveis contaminações internas - dentro da cadeia de acesso, pasteurização e distribuição desse leite (SILVEIRA, 2012). Entre as causas que podem estar relacionadas com a elevação da quantidade de microrganismos no LHO, tem-se as técnicas inadequadas de coleta, a higiene precária da doadora e dos utensílios e a manutenção do leite fora da cadeia de frio (NOVAK & CORDEIRO, 2007).

Com a crescente utilização de LHO em unidades de terapia neonatais, é necessário que o leite ofertado passe, anteriormente, por rigoroso controle de qualidade microbiológico, visto que serão consumidos por bebês em situações de saúde vulneráveis (BONFIM, 2018). A realização do controle bacteriológico do leite doado pelo BLH é de suma importância para a manutenção da saúde dos RNs, pois o consumo de leite humano contaminado pode ser a causa de doenças neonatais (SERAFINI et al., 2003).

A unidade de terapia neonatal é um local de importante atenção em relação ao risco de infecções hospitalares. A proeminência de contaminação cruzada, ou pelo banco de leite, implica na veiculação de microrganismos patogênicos ou potencialmente patogênicos possa ser considerada fator de risco microbiológico em potencial (SERAFINI et al., 2003). De maneira geral, RNs localizam insuficientemente algumas infecções bacterianas, havendo tendência à sua disseminação sistêmica. A imaturidade imunológica, aliada ao frequente uso de antibioticoterapia em neonatos, tornam os recém-nascidos um importante grupo de risco para a aquisição de infecção hospitalar (MUSSI-PINHATA & REGO, 2005).

2.3 *Enterococcus* spp.

O gênero *Enterococcus* foi evidenciado na década de 70, devido sua identificação em elevado número infecções nosocomiais, sendo associado a casos de infecções neonatais, bacteremias, endocardites e infeções do trato urinário. Paralelamente, evidenciou-se o aparecimento de cepas de *Enterococcus* spp. multirresistentes, principalmente devido sua característica de troca de determinantes de resistências com outros microorganismos (GAMA, 2008).

Enterococcus spp. são classificados como cocos gram positivos, isolados, aos pares ou em cadeias curtas. São microrganismos anaeróbios facultativos, com o crescimento a

temperatura ótima de 35°C, podendo crescer também entre a faixa de 10 a 45°C. Sobrevivem em média de 60 minutos a 60°C. Suportam amplas mudanças de pH e possuem crescimento em meios com elevado teor de sais biliares (40%) e concentrações de NaCl. São, na grande maioria, catalase negativos, podendo ser catalase positiva, ou pseudocatalase; 35% das cepas *E. faecalis* são catalase positiva (MURRAY et al., 2004).

Antigamente eram classificados como bactérias pertencentes ao gênero *Streptococcus* subgrupo D, devido a presença do antígeno D; sendo descritos como enterococos de origem fecal (MURRAY et al., 2004). Após estudos de hibridização de DNA-DNA e sequenciamento da subunidade 16S rRNA, evidenciou-se divergências entre os grupos. Surgiu assim o novo grupo, o gênero *Enterococcus*. A classificação inicial do gênero, proposta por Schleifer, incluía duas espécies: *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. Posteriormente, foram identificadas cerca de 28 espécies diferentes pertencentes ao gênero (GAMA, 2008). Novamente, o gênero foi caracterizado com cerca de 55 espécies, sendo *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) e *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) as principais espécies isoladas em amostras de fezes humanas (SILVA, Q. S., 2016).

O principal reservatório humano de *Enterococcus* spp. é o trato gastrointestinal, sendo também encontrado na vesícula biliar, vagina, uretra masculina e cavidade oral. Além disso, podem ser encontrados no solo, em alimentos, na água, em animais, pássaros e insetos (HONER et al., 2005). São microrganismos comensais, frequentemente associados a infecções em pacientes hospitalizados por um longo período e/ou que receberam terapias antimicrobianas diversas, atuando assim como patógenos oportunistas (HONER et al., 2005). Em infecções humanas, as espécies mais frequentes são de *Enterococcus faecalis* (aproximadamente 90% dos casos) e *Enterococcus faecium* (de 5 a 10% dos casos); no entanto, tem sido relatado o isolamento de *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus raffinosus* (GAMA, 2008).

A disseminação, e sobrevivência, do gênero *Enterococcus* no ambiente hospitalar é atribuída a sua característica de resistência intrínseca a vários antibióticos utilizados comumente. Presume-se que essa capacidade seja por fatores como mutação ou recepção de material genético de outros microrganismos através de plasmídeos e transposons (HONER et al., 2005).

2.4 Perfil de resistência antimicrobiana de *Enterococcus* spp.

O gênero *Enterococcus* apresenta características de resistências intrínsecas e progressivas adquiridas a antimicrobianos utilizados nos tratamentos das infecções a vários agentes antimicrobianos (FURTADO et al., 2005). A resistência bacteriana aos aminoglicosídeos (intrínseca e moderada) é frequente em todas as espécies no gênero. Essas, devem-se a uma baixa penetração pelo antimicrobiano na parede bacteriana. A resistência a altas concentrações é associada a resistência adquirida (aquisição de novos genes que codificam enzimas que modificam os aminoglicosídeos) ou a mutações que resultam na diminuição da ligação do agente ao ribossomo; a exemplo da estreptomicina que possui resistência ribossômica (HONER et al., 2005).

Comumente, cepas de *E. faecium* possuem alta resistência às penicilinas, devido suas proteínas de ligação às penicilinas (PBP) terem baixa afinidade pelas penicilinas (HONER et al., 2005). *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina (VRE) é um dos principais patógenos causadores de infecções hospitalares, como infecções cirúrgicas, infecções urinárias e bacteremia, por exemplo. A resistência dos enterococos à vancomicina ocorre através da produção de precursores de peptidoglicano na parede celular que se ligam fracamente ao antimicrobiano, impedindo assim sua ação de bloquear a síntese da parede celular (FURTADO et al., 2005).

A resistência à tetraciclina geralmente aparece em *Enterococcus* spp. como resistência antimicrobiana adquirida. O amplo uso deste antimicrobiano para tratamento de doenças pode ter causado uma pressão seletiva, levando a um aumento no número de aquisições genes de resistência entre as bactérias e parece estar relacionada à plasmídeos responsivos ao feromônio pCF10, que codifica a tetraciclina (CHOI & WOO, 2015). Há casos de *Enterococcus* spp. com perfil de resistência a agentes antimicrobianos, de amplo espectro além da vancomicina, como exemplo da linezolida (FURTADO et al., 2005).

Determinar uma terapia antimicrobiana adequada para infecções causadas por *Enterococcus* spp. pode ser complexo devido a maioria dos antibióticos não fazerem o efeito antimicrobiano necessário, em concentrações clinicamente relevantes. Sendo assim, em infecções mais graves e/ou sistêmica, pode-se ser necessário a utilização de esquemas terapêuticos com mais de um antimicrobiano, atuando sinergicamente para alcançar o efeito terapêutico desejado (HONER et al., 2005).

Devido às características de resistências a antimicrobianos em *Enterococcus* spp., resistência a penicilina, ampicilina, aminoglicosídeos, tetraciclina e vancomicina por exemplo, aliado ao fato de o gênero ser associado a infecções nosocomiais em pacientes com deficiência imunológica e/ou hospitalizados (HONER et al., 2005), as mudanças das características do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos desses microrganismos é de máxima importância para a saúde pública.

2.5 Fatores de patogenicidade e virulência de *Enterococcus* spp.

Antigamente o gênero *Enterococcus* era considerado comensal não patogênico, ocasionalmente associado a infecções com endocardite e infecções do trato urinário. Posteriormente, isolados de *E. faecalis* e *E. faecium* foram identificados como importantes agentes de infecções, além das já conhecidas, como exemplo de infecções de feridas e sepse. Infecções causadas por *Enterococcus* spp. são encontradas tanto em comunidade quanto em ambiente hospitalar; sendo que em pacientes hospitalizados são responsáveis por altas taxas de mortalidade (SILVA, Q. S., 2016).

O conhecimento do perfil de patogenicidade e fatores de virulência em *Enterococcus* spp. ainda é incompleto. Isso deve-se ao fato de que o gênero é comensal em humanos saudáveis e, como tal, têm virulência sutil e não são facilmente identificados. Fatores de virulência encontrados incluem aderência ao tecido hospedeiro, invasão e formação de abscessos, modulação respostas inflamatórias do hospedeiro e secreção de produtos (EATON & GASSON, 2001). Os fatores de virulência são codificados por genes que são horizontalmente transferidos entre as bactérias, o que favorece sua disseminação (SILVA, Q. S., 2016).

Grande variedade de fatores de virulência foram encontrados no gênero *Enterococcus*. Esses fatores os ajudam a sobreviver no ambiente, colonizar tecidos e causar infecções. Entre eles, destacam-se: substância de agregação (*as*), proteínas de superfícies (*esp*), hialuronidase (*hyl*), citolisinas (*cyl*), gelatinase (*gelE*), adesina de colágeno (*ace*) e antígeno A (*efaA*) (SILVA, Q. S., 2016).

Enterococcus faecalis possui fatores de virulência únicos, tais como feromônios e substância de agregação (*as*) que podem ser trocados como elementos genéticos através da conjugação. A conjugação permite o compartilhamento de informações genéticas, como fatores de virulência e resistência antimicrobiana adquirida. Entre os plasmídeos responsivos, o

feromônio pCF10 desempenha um papel significativo na disseminação de fatores de virulência e genes de resistência entre *Enterococcus* spp. (CHOI & WOO, 2015).

Enterococcus spp. são conhecidos pela capacidade de trocar informação por conjugação, e estes processos são conhecidos por ocorrer no trato gastrointestinal (microbiota dos enterococos). Assim como plasmídeos de resistência a antibióticos transmissíveis, fatores de virulência como produção de hemolisina-citolisina e capacidade de adesão são conhecidas por serem transmitidos por genes, sendo altamente eficientes os mecanismos de transferência. Feromônios sexuais também são pensados em estarem envolvidos a provocar respostas inflamatórias. Estes feromônios são quimiotáticos e podem induzir a produção de superóxido e secreção de enzimas lisossomais (EATON & GASSON, 2001).

Vários genes para fatores de virulência em *Enterococcus faecalis* foram caracterizadas (EATON & GASSON, 2001), conforme Tabela 2, a seguir:

Tabela 2: Genes para fatores de virulência em *Enterococcus faecalis* (adaptado de EATON & GASSON, 2001)

Gene	Virulência associada
<i>agg</i>	Proteína de agregação envolvida na aderência a células eucarióticas; agregação celular e conjugação.
<i>gelE</i>	Toxina; metaloendopeptidase extracelular, hidrólise de gelatina, colágeno, hemoglobina e outros compostos bioativos.
<i>cylLv cylLs</i>	Precursor de citolisina (hemolisina-bacteriocina); a expressão de <i>cylLv-Ls</i> , -M, -B e -A é necessária para a produção de citolisina ativa que lise uma ampla gama de células eucarióticas e gram-positivas.
<i>cylM</i>	Modificação pós-translacional da citolisina.
<i>cylB</i>	Transporte de citolisina.
<i>cylA</i>	Ativação de citolisina.
<i>esp</i>	Proteína associada à parede celular envolvida na evasão imune.
<i>cpd, cob, ccf, cad</i>	Feromônios sexuais quimiotáticos para leucócitos humanos; facilita a conjugação.
<i>efaAfs; efaAfm</i>	Adesinas de parede celular expressas em soro por <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i> , respectivamente.

Fonte: EATON & GASSON, 2001.

O gene *hyl* codifica uma proteína homologa à hialuronidase presente em espécies como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae*. Esse gene possui a função de despolimerização do ácido hialurônico, o que ajuda na disseminação do microrganismo nos tecidos do hospedeiro. O gene *hyl* tem sido classificado como fator de virulência potencial em isolados clínicos de *E. faecium* resistentes à vancomicina (SILVA, Q. S., 2016).

O antígeno A geralmente associado a *Enterococcus faecalis* (*efaA*) é importante na formação de biofilmes, sendo descrito como o principal antígeno de superfície de *E. faecalis*. O *efaA* tem sido identificado em soro de pacientes com endocardites causada por esta bactéria (SILVA, Q. S., 2016).

2.6 Estudos sobre a qualidade microbiológica do leite humano ordenhado em Vitória da Conquista – BA

No município de Vitória da Conquista – Bahia, Almeida J. B. (2014) realizou o estudo que analisou a qualidade microbiológica do LHO no Banco de Leite do Hospital Municipal Esaú Matos, sendo realizada a detecção do perfil fenotípico e genotípico de *Staphylococcus aureus*, bem como o perfil de resistência. A detecção de fatores de virulência foi avaliada por PCR e o gene para enterotoxina *sec* foi detectado em 1 isolado (3,44 %) das amostras LHO analisadas. Até o presente momento, não há estudos correlacionando infecções por *Enterococcus* spp. no município de Vitória da Conquista, bem como não há dados associando a condição higiênico-sanitária das coletas domiciliares por doadoras de LHO com o isolamento de bactérias entéricas.

Desta forma, mediante a importância de *Enterococcus* spp. em patologias humanas, sobretudo em pacientes com vulnerabilidade imunológica, como também da lacuna de informações específicas relacionadas, observa-se a importância da investigação da toxigenicidade e dispersão destes microrganismos, avaliação da qualidade da coleta, conservação e processamento do leite ofertado aos RNs, para melhor compreender os fatores de patogenicidade e virulência isolados de espécies de *Enterococcus* spp. presentes nas amostras de leite humano cru, pasteurizado e de amostras das mãos e da região auréolo-mamiolar de doadoras ligadas ao Banco de Leite Materno do Hospital Municipal Esaú Matos

em Vitória da Conquista (BA). Tais dados serão de suma importância para impulsionar medidas de controle mais eficazes para evitar a dispersão destes microrganismos em ambiente hospitalar.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar a virulência e resistência de isolados de *Enterococcus* spp. em amostras de doadoras de LH (regiões mamilo-areolar, mãos e alíquotas de leite) do Banco de Leite Humano do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista, Bahia, Brasil.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar cepas de *Enterococcus* spp. em amostras colhidas de região mamilo-areolar, mãos e alíquotas de leite de doadoras selecionadas para o estudo.
- Caracterizar fenotipicamente espécies de *Enterococcus* spp. isoladas das amostras.
- Determinar o perfil de resistência antimicrobiana e virulência dos isolados por meio da identificação de genes marcadores ou reguladores associados às cepas isoladas de interesse.
- Descrever e relacionar as condições higiênico-sanitárias adotadas pelas doadoras no processo de coleta e conservação do leite ordenhado aos achados microbiológicos.

4. METODOLOGIA

4.1. Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo transversal realizado a partir de amostras de material das regiões mamilo-areolar, mãos e alíquotas de LHOC e LHOP, provenientes de doadoras cadastradas no BLH do Hospital Esaú Matos. Neste estudo ocorreu, além da avaliação microbiológica de amostras biológicas das doadoras, a aplicação de questionários versando sobre questões higiênico-sanitárias das doadoras durante a coleta, acondicionamento e conservação do leite doado.

4.2. Descrição do local de coleta

O Banco de Leite Humano do Hospital Municipal Esaú Matos está localizado em Vitória da Conquista – BA. Inaugurado em 2004, trata-se de um serviço especializado para o atendimento a gestantes, puérperas e lactantes com dúvidas, dificuldades com a amamentação e aquelas com produção de leite excedente para doação. Possui atendimento aberto ao público do município e região, com funcionamento durante a semana. As lactantes são cadastradas, voluntariamente, sendo realizadas as coletas de LH semanalmente em domicílio. O LH doado passa por todas as etapas de processamento e controle microbiológico, para após serem disponibilizados.

No ano de 2018, o BLH do Hospital Municipal Esaú Matos atendeu uma média mensal de 83 doadoras, tendo realizado no ano o atendimento de 991 doadoras de LH.

4.3. Aspectos éticos

Os dados utilizados no estudo foram extraídos de um Projeto maior denominado “Identificação, caracterização de resistência e patogenicidade de *Enterococcus* spp. e Enterobactérias em amostras de doadoras de Leite Humano no Banco de Leite Humano do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista (BA)”. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Multidisciplinar em Saúde IMS/UFBA, CAAE: 80800717.8.0000.5556 – Parecer n°: 2.475.023 (Anexo 1) e pelo Comitê

de Ensino e Pesquisa do Hospital Esaú Matos, conforme Carta de Anuência (Anexo 2). O estudo seguiu todos os preceitos necessários, conforme estabelece resolução 466/2012.

4.4. Descrição das amostras

O estudo foi realizado com doadoras, cadastradas no Banco de Leite Humano do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista (BA), que tiveram o volume mínimo de 400 mL doado por semana. Leite cru doado com volume inferior a 400 mL possui necessidade de pool de amostras de outras doadoras, perdendo assim a rastreabilidade e especificidade da amostra a uma doadora única. Como critérios de exclusão, elencou-se os seguintes fatores: doadoras com lesões em mãos ou região mamilo-areolar e doação de leite cru na semana da participação do estudo com volume inferior ao necessário para realização da pasteurização individual.

Baseado nas informações inicialmente obtidas do quantitativo de doadoras/mês no Banco de Leite Materno do Hospital Municipal Esaú Matos, considerando uma média de aproximadamente 1/3 das doadoras com características de doações de volume mínimo de 400 mL doado por semana, projetou-se o presente estudo um n amostral equivalente ao número de 90 doadoras, com coleta única de amostras, considerando o período de coleta estimado por 3 meses consecutivos.

Considerando que a doação de leite no BLH ocorre por demanda espontânea e que a participação no estudo foi voluntária, aliado aos fatores do fluxo de identificação até a realização das coletas, identificação de prováveis doadoras que entrem nos critérios de inclusão, contato prévio telefônico com as mesmas, agendamento de visita e coleta de amostras, fez-se necessário a expansão do período de coleta por mais 3 meses para a obtenção do n amostral mínimo necessário de 30 doadoras.

Os isolados do presente estudo foram obtidos através de coleta de amostras de 30 doadoras participantes (região mamilo-areolar e mãos) e amostras de leite humano, enviados ao Banco de Leite Materno do Hospital Municipal Esaú Matos, antes e após a pasteurização do LH, durante o período de seis meses, entre março e agosto de 2018.

4.5. Descrição da coleta de amostras e dados

Verificou-se, de modo semanal durante o período do estudo junto à administração do BLH do Hospital Municipal Esaú Matos, a lista de doadoras em atividade. De posse destas informações, doadoras que se encaixaram no requisito volume foram convidadas a participar do estudo, mediante contato telefônico. No contato telefônico inicial eram passadas as informações preliminares sobre o estudo: objetivo, coleta de amostras, aplicação de questionários e informações referentes ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram agendadas visitas em domicílio com as doadoras que concordaram participação. De acordo com as disponibilidades das participantes, as visitas foram agendadas em horários (sempre) antecedentes a ordenha para a doação.

Nas visitas agendadas, inicialmente foram apresentadas todas as informações do estudo, tirando as dúvidas das doadoras, quando necessário. Em seguida, as doadoras que concordaram em participar assinaram o TCLE (Apêndice 1). As entrevistas foram aplicadas com utilização do Questionário sobre os Hábitos Higiênico-Sanitários da Coleta de Leite Humano e Aspectos Sociodemográficos das Doadoras (Apêndice 2). Ao fim da entrevista, foi solicitado pelas pesquisadoras que as participantes se preparassem para as ordenhas dos LH conforme procedimentos higiênico-sanitários habitualmente utilizados pelas mesmas, com finalidade de doação de LH ao BLH. Foi informado que após a preparação seriam colhidas, pelas pesquisadoras, amostras cutâneas: região mamilo-areolar e mãos por meio de swab estéril único.

Uma vez preparadas, as doadoras foram submetidas à coleta de amostra cutânea: mãos e região mamilo areolar com swab estéril único. A realização do procedimento foi de responsabilidade das pesquisadoras farmacêuticas, devidamente treinadas e habilitadas, que utilizaram todos os paramentos necessários: máscara facial, touca, luvas descartáveis e jaleco. As coletas foram realizadas com a utilização swab estéril único para as coletas de ambas as regiões, com meio de transporte Stuart. Os swabs colhidos foram identificados com códigos de números sequenciais crescentes para rastreabilidade dos resultados e confidencialidade das participantes. Após a coleta das amostras cutâneas, foram realizadas as coletas de pequeno volume inicial de LH (aproximadamente 2 mL) em frasco estéril (com identificação codificada), fornecido pelas pesquisadoras, a fim de realizar cultivo do LHO; o volume sequencial foi colhido normalmente como de costume em frasco de vidro estéril cedido pelo BLH.

Os swabs e frascos estéreis utilizados respectivamente para a coleta de amostras cutâneas e de leite humano ordenhado receberam selos de marcação identificados com códigos de números sequenciais crescentes para efeitos de correlação das amostras. Cada participante foi identificada com um número, de acordo com a ordem de participação no estudo, seguido pelas iniciais do nome completo. Além do número sequencial e as iniciais das doadoras, as amostras foram codificadas por tipo: swab (Sw), leite cru (LC) e leite pasteurizado (LP). Foram utilizados um swab e dois frascos por doadoras: um no momento da coleta para o LHO cru e outro para amostras de LHO pasteurizado. Os selos de identificação dos frascos tinham cores diferentes para diferenciar amostras de LHO cru (selo azul) e LHO pasteurizado (vermelho).

Os swabs foram transportados em caixa térmica, sem refrigeração, e as alíquotas de leite cru foram transportadas em caixa térmica refrigerada (com utilização de gelox). As caixas de transporte foram imediatamente encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas do Instituto Multidisciplinar em Saúde – UFBA, onde ocorreram posteriores sementeiras das amostras e todo processamento microbiológico.

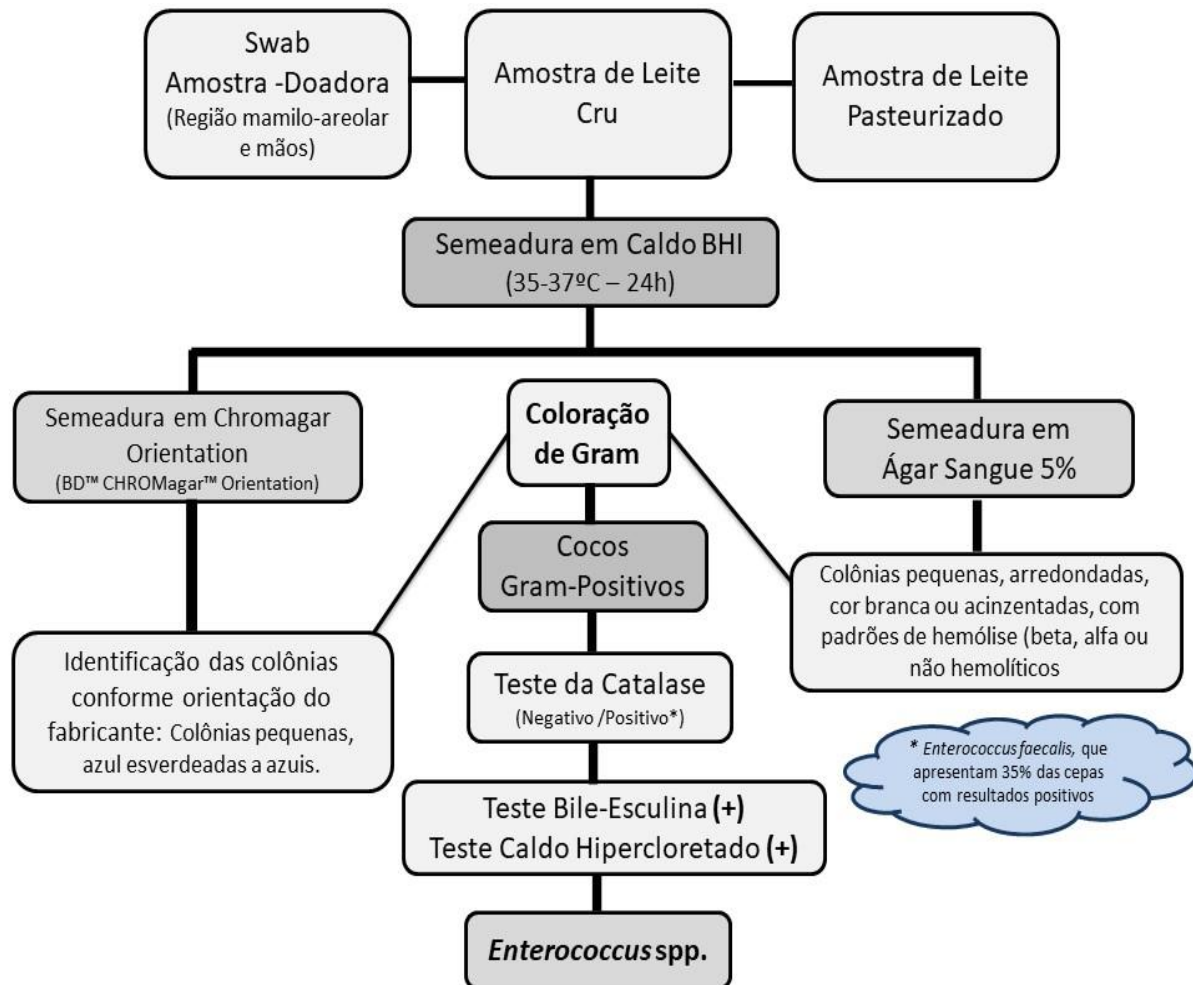
O BLH sinalizou semanalmente a chegada de frascos marcados com codificação do estudo e imediatamente resgatou-se alíquota de LH destes frascos após pasteurização. As amostras de LH pasteurizadas foram transportadas em caixa térmica refrigerada (com utilização de gelox) e imediatamente encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas do Instituto Multidisciplinar em Saúde – UFBA, onde ocorreram posteriores sementeiras das amostras e todo processamento microbiológico.

4.6. Isolamento e identificação de *Enterococcus* spp.

As amostras biológicas foram inicialmente inoculadas em meio de enriquecimento caldo BHI – Brain Heart Infusion (HIMEDIA[®]) e incubadas em estufa bacteriológica a 35-37°C por 24 horas. Após isso, foram repicadas em placas de Petri com meio Ágar Sangue 5% (Ágar Base, HIMEDIA[®]) e Chromagar Orientation (BD[™] CHROMagar[™] Orientation), para diferenciação de *Enterococcus* spp. em estufa bacteriológica a 35-37°C, por 24 horas. Os dois meios juntos foram importantes para elevar a sensibilidade do isolamento e identificação dos microrganismos de interesse no presente estudo.

As etapas para isolamento e identificação de *Enterococcus* spp. estão resumidas no fluxograma abaixo, sendo posteriormente descritas, de forma mais detalhada, nos itens a seguir.

Fluxograma 1: Isolamento e identificação das espécies de *Enterococcus* spp. em amostras isoladas da região mamilo-areolar, mãos, leite cru e pasteurizado de doadoras do Banco de Leite Humano do Hospital Esau Matos.



4.6.1. Identificação de *Enterococcus* spp.

Os microrganismos que tiveram crescimento no meio Ágar Sangue 5% apresentando colônias pequenas, arredondadas, cor branca ou acinzentadas, com padrões de hemólise (beta, alfa ou não hemolíticos) foram selecionados para realização de identificação das colônias.



Figura 1 – *Enterococcus* spp., não hemolítico, em meio Ágar Sangue 5%.

Em paralelo, as colônias com crescimento em Chromagar Orientation (BD™ CHROMagar™ Orientation), com características presuntivas de *Enterococcus* spp., de acordo o fabricante (colônias pequenas, azul esverdeadas a azuis), também foram selecionadas.

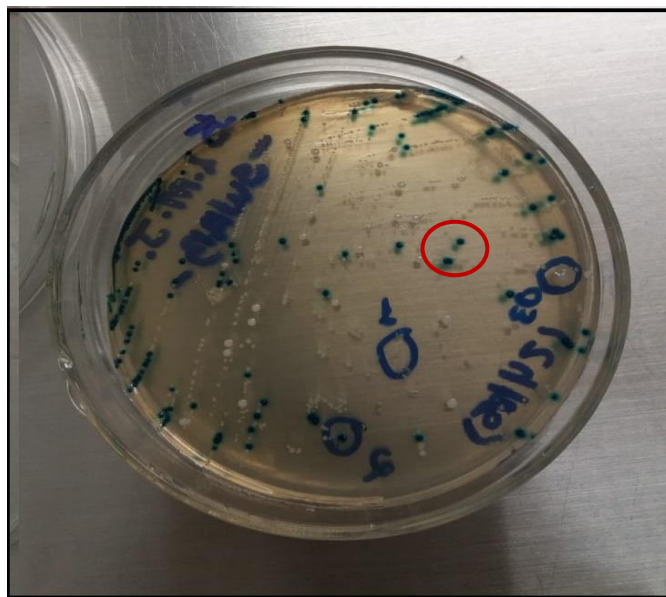


Figura 2 – Cepa de *Enterococcus* spp. – colônias azuis – em meio Chromagar Orientation (BD™ CHROMagar™ Orientation).

A identificação das colônias presuntivas de *Enterococcus* spp., selecionadas em ambos meios Ágar Sangue 5% e CHROMagar Orientation (BD™ CHROMagar™ Orientation), foram submetidas à metodologia de Coloração de Gram para observação das características morfológicas. Quando observados cocos Gram positivos em cadeias, independentemente do tamanho, foram realizados testes confirmatórios: em paralelo ao Gram, foram considerados como *Enterococcus* spp. quando ocorreu crescimento bacteriano após submissão aos testes de bile esculina e crescimento em caldo hipercloretoado (de ambos os meios); nos dois casos independente do resultado da catalase.

4.6.1.1. Características morfológicas

Foram produzidos, a partir de colônias isoladas do meio Ágar Sangue 5% e CHROMagar Orientation (BD™ CHROMagar™ Orientation), esfregaços em lâminas de vidro, utilizando fio de platina. Após coloração pelo método de Gram convencional, utilizando os corantes cristal de violeta, lugol, álcool-acetona e fucsina (Renylab®), as características morfológicas das células foram observadas ao microscópio óptico (Figura 3), objetiva de imersão 100x. As amostras bacterianas caracterizadas como cocos Gram-positivos, aos pares, isolados ou em pequenas cadeias foram então submetidas ao teste da catalase objetivando o fortalecimento da caracterização presuntiva do gênero *Enterococcus*.

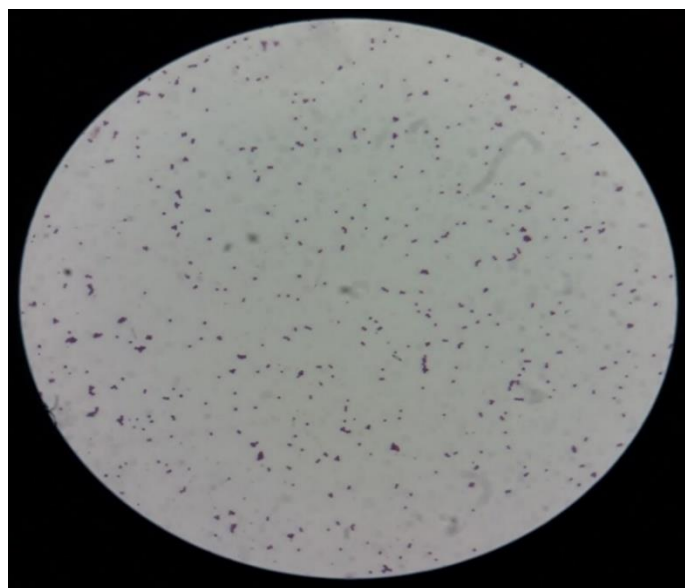


Figura 3 – Bacterioscopia por coloração de Gram: *Enterococcus* spp.

4.6.1.2. Produção da enzima catalase

A partir de colônias presuntivas de *Enterococcus* spp., isoladas do meio Ágar Sangue e CHROMagar Orientation (BD™ CHROMagar™ Orientation) foi realizado o teste da catalase. A observação da presença da enzima catalase foi verificada pela metodologia convencional, em lâmina de vidro, com peróxido de hidrogênio [H₂O₂ a 3% (v/v)] e uso de suspensão espessa do microrganismo. A formação de bolhas ocorre quando há hidrólise da H₂O₂ pela ação da enzima catalase. A ausência de bolhas é indicativa de reação negativa, característica de *Enterococcus* spp. Todavia, a presença de reação positiva não exclui a possibilidade de serem *Enterococcus faecalis*, que apresentam 35% das cepas com resultados positivos para o teste (MENEZES, E. A. et. al., 2005). Dessa forma, cocos gram-positivos aos pares, isolados ou em pequenas cadeias, com reação catalase negativa (ou positiva), foram submetidos aos testes de identificação do gênero, conforme descrições abaixo.

4.6.1.3. Hidrolise da esculina em presença de bile e caldo hipercloretado (NaCl 6,5%)

Todos os espécimes presuntivos de *Enterococcus* spp., isolados do meio Ágar Sangue 5% e CHROMagar Orientation (BD™ CHROMagar™ Orientation), foram inoculados por meio de semeadura mista (punctura + estrias) no meio Ágar Bile-Esculina - MBiolog™, e inoculadas em caldo BHI + 6,5% de NaCl (MBiolog™) e incubadas a 35-37°C por 24 horas, imediatamente após BHI. Foram realizados ambos os meios para comparação dos resultados e aumento da sensibilidade dos mesmos.

O teste de hidrolise da esculina em presença de bile foi considerado positivo, quando houve crescimento acompanhado de enegrecimento, do meio resultante da hidrólise da esculina, na presença de bile formando esculina. *Streptococcus bovis* e *Enterococcus* spp. apresentam resultados positivos e é necessário o resultado do Caldo Hipercloretado para diferenciação. O caldo BHI suplementado com 6,5 % de cloreto de sódio age como um agente seletivo, pois nessa concentração o NaCl interfere na permeabilidade de membrana celular, bem como no equilíbrio osmótico e eletro cinético em organismos intolerantes a ele. A turvação do meio indica tolerância ao meio hiperosmótico e conseqüente crescimento bacteriano.

Testes positivos para hidrolise da esculina em presença de bile e caldo hipercloretado (NaCl 6,5%) confirmam a identificação de *Enterococcus* spp., entre os microorganismos que

apresentam-se como cocos Gram positivos. Os espécimes com resultados positivos a esses testes foram submetidos a avaliação da produção de atividade antimicrobiana (item 4.7).

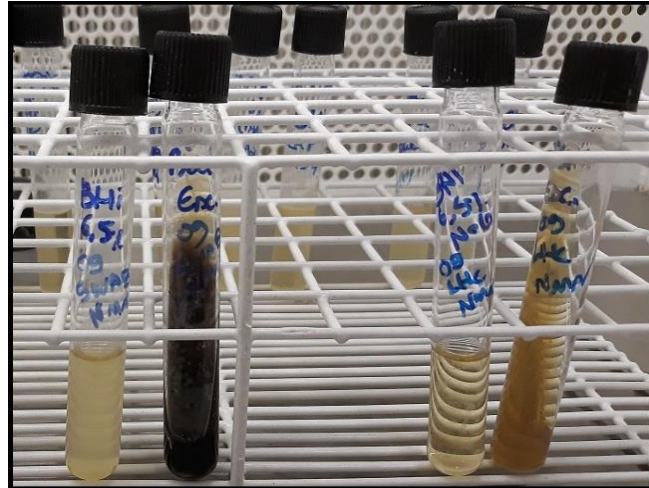


Figura 4 – Resultados para testes de bile esculina e caldo hipercloretado: *Enterococcus* spp. Resultados positivos à esquerda.

4.6.1.4. Armazenamento / criopreservação dos isolados

Para todas as amostras com a identificação de *Enterococcus* spp. confirmadas, foram preparadas suspensões espessas do microrganismo em crio tubos, contendo 2,0 mL da solução de BHI glicerinado a 20% (v/v) e conservadas em freezer a -20°C (FACKLAM, SAHM, TEIXEIRA, 1999). Estas amostras foram utilizadas durante todo o trabalho para a realização dos testes necessários de biologia molecular, a fim de identificar genes de resistência e virulência.

4.7. Antibiograma

Todas as cepas de *Enterococcus* spp. isoladas em amostras cutâneas e de leite foram submetidas a avaliação da atividade antimicrobiana. A avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada através da utilização do teste de difusão em ágar (BRASIL, 2010; FRACALANZZA, 2007; VALENZUELA, 2010), utilizando o Método de Kirby e Bauer (1966). O método utilizado, os discos de antimicrobianos selecionados e os critérios para as

leituras e interpretações dos diâmetros dos halos de inibição seguiram as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* [(CLSI), 2017].

Os ensaios foram realizados a partir de suspensões bacterianas em solução salina a 0,85% esterilizada, com turbidez semelhante à da solução padrão 0,5 de McFarland (aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL). As suspensões foram semeadas por disseminação, com ajuda de swabs esterilizados sobre a superfície seca de placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (Becton Dickinson®), de maneira a se obter um crescimento uniforme e confluyente sobre a superfície dos meios inoculados. Foram colocados discos de papel de filtro (Laborclin®) com os antimicrobianos selecionados para o gênero *Enterococcus*, os mesmos estão apontados na Tabela 3. Em seguida foram incubados em estufa bacteriológica (Estufa Bacteriológica FANEN), durante 24 horas a 35-37°C.

Tabela 3 – Relação dos antimicrobianos utilizados no antibiograma para espécimes de *Enterococcus spp.*

<i>Enterococcus spp.</i>				
Antimicrobianos	Classe	CLSI - Leitura dos Halos (mm)		
		Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina 10 µg	Penicilina	≥ 17	---	≤ 16
Penicilina 10 units		≥ 15	---	≤ 14
Tetraciclina 30 µg	Tetraciclina	≥ 19	15 - 18	≤ 14
Ciprofloxacino 5 µg	Fluoroquinolonas	≥ 21	16 - 20	≤ 15
Norfloxacino 10 µg		≥ 17	13 - 16	≤ 12
Levofloxacino 5 µg		≥ 17	14 - 16	≤ 13
Nitrofurantoína 300 µg	Nitrofurantoína	≥ 17	15 - 16	≤ 14
Linezolida 30 µg	Oxazolidinonas	≥ 23	21 - 22	≤ 20
Vancomicina 30 µg	Glicopeptídeos	≥ 17	15 - 16	≤ 14

Fonte: CLSI (2017).

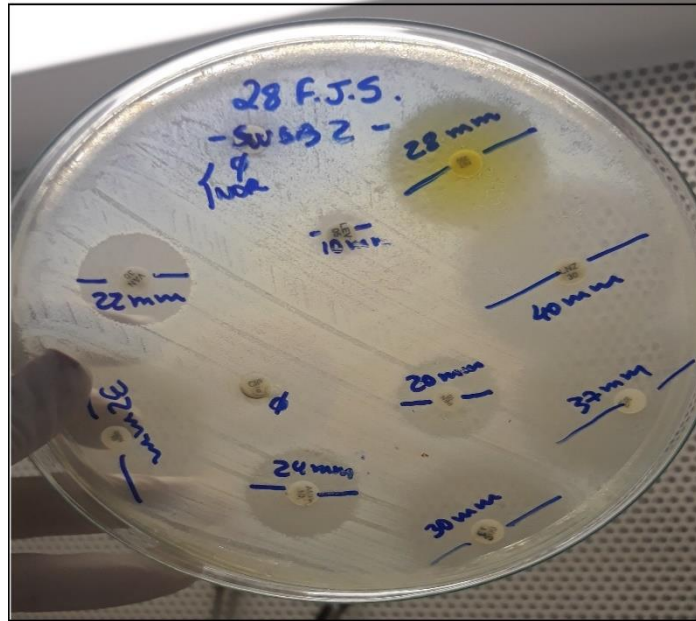


Figura 5 – Antibiograma Método de Kirby e Bauer para um espécime de *Enterococcus* spp. isolado no estudo.

4.8. Extração do DNA

As amostras de *Enterococcus* spp. armazenadas em meio de BHI glicerinado a 20% (v/v) em freezer a -20°C passaram pelo processo de degelo espontâneo e, em seguida, $30\mu\text{L}$ das soluções foram inoculadas em 2mL de caldo BHI e incubadas em estufa a $35\text{-}37^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, para ativação das cepas. Após incubação, realizou-se a homogeneização dos tubos de cultivo e ocorreu a extração de 1mL/cada, sendo acondicionadas em eppendorfs estéreis.

Para a Extração de DNA, foi utilizado o método de fervura, adaptado do método descrito por Fan e colaboradores (1995). As amostras foram centrifugadas a 14.000 RPM por 15 minutos em centrífuga (HT centrifuge). Posteriormente, os sobrenadantes foram retirados e os pellets foram lavados, duas vezes, com $100\mu\text{L}$ de PBS (Phosphate Buffer Saline), seguidos de centrifugação a 14.000 RPM por 15 minutos. Os pellets obtidos foram ressuspensos em $50\mu\text{L}$ de Tampão PBS e, posteriormente, ficaram por 10 minutos a temperatura de 100°C em bloco seco. Após esse período, foram acondicionados imediatamente em gelo por 5 minutos, seguido de centrifugação a 14.000 RPM por 5 minutos. Os sobrenadantes, contendo o DNA, foram transferidos para eppendorfs e estocados a -20°C até o momento do uso.

4.9. Detecção dos genes constitutivos de *Enterococcus* spp.

Como os métodos microbiológicos convencionais utilizados somente permitiram identificar o gênero *Enterococcus*, sendo as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* de grande relevância clínica, considerando ainda que numa mesma doadora poderia ser isolada mais de uma espécie, realizou-se a pesquisa para os genes constitutivos para ambas espécies.

Todos os isolados que foram identificados convencionalmente como *Enterococcus* spp., foram submetidos à técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação dos genes *ddl* que codificam as ligases D-alanina, espécie-específicos para *E. faecalis* e *E. faecium*, conforme descrito por Dutka-Malen, Evers e Courvalin (1995). Os primers foram sintetizados pela Invitrogen Brasil Ltda. A sequência dos primers utilizados para essa etapa estão a seguir, na Tabela 4.

Tabela 4: Genes constitutivos *ddl* em *E. faecalis* e *E. faecium*, sequências dos *primers* e tamanhos (pb).

Gene amplificado	Sequência de <i>primers</i>	Tamanho – Pares de Bases (pb)	Temperatura de Anelamento (TA)
<i>ddl E. faecalis</i>		941 pb	54°C
<i>ddl E</i> ₁	5' ATC AAG TAC AGT TAG TCT 3'		
<i>ddl E</i> ₂	3' ACG ATT CAA AGC TAA CTG 5'		
<i>ddl E. faecium</i>		550 pb	
<i>ddl F</i> ₁	5' TAG AGA CAT TGA ATA TGC C 3'		
<i>ddl F</i> ₂	3' TCG AAT GTG CTA CAA TC 5'		

Fonte: DUTKA-MALEN, EVERS, COURVALIN, 1995.

A reação foi preparada para um volume final de 25µL por tubo, compreendendo 50 pmol de cada um dos primers. Em termociclador, foram feitas as amplificações, obedecendo a uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 54°C (30 ciclos), 1 minuto a 72°C, concluindo com uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

4.10. Detecção dos genes de resistência

Considerados os resultados fenotípicos de resistência antimicrobiana, os isolados foram avaliados quanto à presença de genes de resistência à quinolonas. As amostras de DNA extraídas anteriormente pelo método de fervura descrito por Fan et. al. (1995) foram submetidas à reação de PCR para a detecção dos genes *gyrA* e *parC*.

A reação para o gene *gyrA* foi conduzida de acordo os primers a seguir (Tabela 5), sintetizados pela Invitrogen Brasil Ltda, de acordo com adaptação do protocolo de Amin, Jalal e Wretlind (1999). A reação foi preparada para um volume final de 25µL por tubo, compreendendo 45 pmol dos primers. Foram feitas as amplificações, em termociclador, obedecendo a uma desnaturação inicial de 94°C por 1 minuto, 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C (30 ciclos), 1 minuto a 72°C, concluindo com uma extensão final a 72° C por 10 minutos.

Tabela 5: Detecção de genes de resistência à quinolonas *gyrA* em amostras de *Enterococcus* spp.

Gene amplificado	Sequência de primers (5'3')	Tamanho – Pares de Bases(pb)	Temperatura de Anelamento (TA)
<i>gyrA</i>		241 pb	55°C
<i>gyrA</i> 1-F	CGG GAT GAA CGA ATT GGG TGT GA		
<i>gyrA</i> 1-R	AAT TTT ACT CAT ACG TGC TTC GG		

Fonte: AMIN, JALAL, WRETLIND, 1999.

A reação para o gene *parC* foi conduzida de acordo os primers a seguir (Tabela 6), sintetizados pela Invitrogen Brasil Ltda, de acordo com adaptação do protocolo de Brisse e colaboradores (1999). A reação foi preparada para um volume final de 25µL por tubo, compreendendo 45 pmol dos primers. Foram feitas as amplificações obedecendo a uma desnaturação inicial de 94°C por 1 minuto, 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 48,7°C (30 ciclos), 1 minuto a 72°C, concluindo com uma extensão final a 72° C por 10 minutos.

Tabela 6: Detecção de genes de resistência à quinolonas *parC* em amostras de *Enterococcus* spp.

Gene amplificado	Sequência de primers (5'3')	Tamanho – Pares de Bases(pb)	Temperatura de Anelamento (TA)
<i>parC</i>		191 pb	48,7°C
<i>parC-A</i>	TTC CCG TGC ATT TCG ATC AGT ACT TC		
<i>parC-B</i>	CGT ATG ACA AAG GAT TCC GTA AA TC		

Fonte: BRISSE et al., 1999.

4.11. Detecção dos genes de virulência

A presença de genes de virulência em *Enterococcus* spp. foi investigada em todas as amostras positivas para o gênero na etapa de identificação, através da técnica de PCR.

4.11.1 Genes de virulência *ace*, *efaA* e *gelE* e *as*

Para a detecção dos genes *ace* (adesina de colágeno geralmente associada a *E. faecalis*), *efaA* (antígeno A geralmente associado a *E. faecalis*), *gelE* (gelatinase) e *as* (substância de agregação), a reação foi conduzida de acordo os primers a seguir (Tabela 7), sintetizados pela Invitrogen Brasil Ltda, de acordo com adaptação do protocolo de Mannu e colaboradores (2003).

A reação foi preparada para um volume final de 25µL por tubo, compreendendo 20 pmol de cada um dos primers. Para os primers *ace*, *efaA*, *gelE*, foram feitas as amplificações, em termociclador, obedecendo a uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C (30 ciclos), 1 minuto a 72°C, concluindo com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Para o primer *as*, em termociclador, foram feitas as amplificações obedecendo a uma desnaturação inicial de 94°C por 1 minuto, 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 54°C (30 ciclos), 1 minuto a 72°C, concluindo com uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Tabela 7: Detecção de genes de virulência *ace*, *efaA*, *gelE* e *as* em amostras de *Enterococcus* spp.

Gene amplificado	Sequência de <i>primers</i> (5'3')	Tamanho – Pares de Bases(pb)	Temperatura de Anelamento (TA)
<i>ace</i>		320 pb	56°C
<i>ace1</i>	AAA GTA GAA TTA GAT CCA CAC		
<i>ace2</i>	TCT ATC ACA TTC GGT TGC G		
<i>efaA</i>		499 pb	
<i>efaA1</i>	CGT GAG AAA GAA ATG GAG GA		
<i>efaA2</i>	CTA CTA ACA CGT CAC GAA TG		
<i>gelE</i>		402 pb	
<i>gelE1</i>	AGT TCA TGT CTA TTT TCT TCA C		
<i>gelE2</i>	CTT CAT TAT TTA CAC GTT TG		
<i>as</i>		406 pb	54°C
<i>as1</i>	CCA GTA ATC AGT CCA GAA ACA ACC		
<i>as2</i>	TAG CTT TTT TCA TTC TTG TGT TTG TT		

Fonte: MANNU et al., 2003.

4.11.2 Genes de virulência *cylA* e *hyl*

Para a detecção dos genes *cylA* (citolisina) e *hyl* (hialuronidase), a reação foi conduzida de acordo os primers a seguir (Tabela 8), sintetizados pela Invitrogen Brasil Ltda, de acordo com adaptação do protocolo de Vankerckhoven e colaboradores (2004).

Tabela 8: Detecção de genes de virulência *cylA* e *hyl* em amostras de *Enterococcus* spp.

Gene amplificado	Sequência de <i>primers</i> (5'3')	Tamanho – Pares de Bases(pb)	Temperatura de Anelamento (TA)
<i>cylA</i>		688 pb	56°C
CYT I	ACT CGG GGA TTG ATA GGC		
CYT IIb	GCT GCT AAA GCT GCG CTT		
<i>hyl</i>		276 pb	
HYL n1	ACA GAA GAG CTG CAG GAA ATG		
HYL n2	GAC TGA CGT CCA AGT TTC CAA		

Fonte: VANKERCKHOVEN et al., 2004.

A reação foi preparada para um volume final de 25µL por tubo, compreendendo 20 pmol de cada um dos primers (*cyl* e *hyl*). Em termociclador, foram feitas as amplificações, obedecendo a uma desnaturação inicial de 95°C por 15 minutos, 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C (30 ciclos), 1 minuto a 72°C, concluindo com uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

4.11.3 Genes de virulência *esp*

Para a detecção do gene *esp* (proteína de superfície), a reação foi conduzida de acordo os primers a seguir (Tabela 9), sintetizados pela Invitrogen Brasil Ltda, de acordo com adaptação do protocolo de Shankar e colaboradores (1999).

Tabela 9: Detecção de genes de virulência *esp* em amostras de *Enterococcus* spp.

Gene amplificado	Sequência de primers (5'3')	Tamanho – Pares de Bases(pb)	Temperatura de Anelamento (TA)
<i>esp</i>			
<i>esp46</i>	TTA CCA AGA TGG TTC TGT AGG CAC	913 pb	58°C
<i>esp47</i>	CCA AGT ATA CTT AGC ATC TTT TGG		

Fonte: SHANKAR et al., 1999.

A reação foi preparada para um volume final de 25µL por tubo, compreendendo 20 pmol de cada um do primer (*esp*). Em termociclador, foram feitas as amplificações, obedecendo a uma desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 63°C (30 ciclos), 4 minutos a 72°C, concluindo com uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

4.12. Amplificação dos genes de enterocinas

Para a detecção dos genes de enterocinas (Enterocina A, Enterocina B, Enterocina P e Enterocina 31 – também conhecida como Bacteriocina), a reação foi conduzida de acordo os primers a seguir (Tabela 10), sintetizados pela Invitrogen Brasil Ltda, de acordo com adaptação do protocolo Vancanneyt e colaboradores (2002).

A reação foi preparada para um volume final de 25µL por tubo, compreendendo 50 pmol de cada um dos primers. Em termociclador, foram feitas as amplificações obedecendo a uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C (30 ciclos), 1 minuto a 72°C, concluindo com uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Tabela 10: Detecção de genes de enterocinas Enterocina A, Enterocina B, Enterocina P e Enterocina 31 em amostras de *Enterococcus* spp.

Gene amplificado	Sequência de <i>primers</i> (5'3')	Tamanho – Pares de Bases(pb)	Temperatura de Anelamento (TA)
Enterocina A		138 pb	58°C
Enterocina A - F	GGT ACC ACT CAT AGT GGA AA		
Enterocina A - R	CCC TGG AAT TGC TCC ACC TAA		
Enterocina B		201 pb	
Enterocina B - F	CAA AAT GTA AAA GAA TTA AGT ACG		
Enterocina B - R	AGA GTA TAC ATT TGC TAA CCC		
Enterocina P		87 pb	
Enterocina P - F	GCT ACG CGT TCA TAT GGT AAT		
Enterocina P - R	GCT AAA GAG AAT ATT GCA GGA		
Enterocina 31		130 pb	
Enterocina 31 - F	CCT ACG TAT TAC GGA AAT GGT		
Enterocina 31 - R	AAT GGT TGG GTA CAA CAT GGC		

Fonte: VANCANNEYT et al., 2002.

Todos os produtos das amplificações de PCR (tópicos 4.8, 4.9.1, 4.9.2, 4.9.3, 4.10 e 4.11) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0%, corados com brometo de etídio (10 mg/mL) por 15 minutos, visualizados e fotografados em transiluminador de UV. Um marcador de peso molecular “DNA Ladder de 100 pb” (Invitrogen®, Brasil) foi utilizado como padrão para o cálculo do tamanho dos fragmentos amplificados. Os resultados foram considerados positivos, quando a presença foi confirmada pela amplificação das bandas com fragmentos de DNA do tamanho esperado, de acordo com cada padrão de gene.

4.13. Análise estatística de dados

A análise descritiva das variáveis do estudo foi realizada com o banco de dados constituído em Microsoft Excel e as análises realizadas através do o Programa Estatístico EPI INFO (versão 7.2.2.6). Para a comparação de frequências foi utilizado o Teste de qui-quadrado, considerando índice de significância $p < 0,05$ e IC 95%.

5. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. A. G. **Amamentação: um híbrido natureza cultura**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1999.

ALMEIDA, J. B. **Deteção, resistência e patogenicidade de estafilococos multirresistentes em amostras do Banco de Leite Materno do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista (BA)**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia e Biotecnologia de Micro-organismos) – Universidade Estadual de Santa Cruz, 2014.

AMIN, N. E.; JALAL, S.; WRETLIND, B. Alterations in GyrA and ParC Associated with Fluoroquinolone Resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, n.4, p. 947-949, 1999.

ARAÚJO, L. P. P. *et al.* Análise de Coliformes em Leite Humano Ordenhado. **Interagir: pensando a extensão**, Rio de Janeiro, n. 15, p. 29-34, 2010.

BONFIM, V. S. **Perfil lipídico do concentrado com liofilizado de leite humano para amamentação de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

BORGES, M. S. **Avaliação da qualidade do leite humano ordenhado**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Uberlândia, 2016.

BORGES, M. S. *et al.* Quality of human milk expressed in a human milk bank and at home. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.94, n.4, p. 399-403, 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Leite Humano**. Resolução RDC nº 171, de 4 de setembro de 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos**. Brasília: Anvisa, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Saúde da criança: nutrição infantil, aleitamento materno e alimentação complementar**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, Série A. Normas e Manuais Técnicos, Cadernos de Atenção Básica, n. 23, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. 5. ed., v. 1, p. 59-73. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Saúde da criança: aleitamento materno e alimentação complementar**. 2. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BRISSE, S. *et al.* Association of Alterations in ParC and GyrA Proteins with Resistance of Clinical Isolates of *Enterococcus faecium* to Nine Different Fluoroquinolones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, n. 10, p. 2513-2516, 1999.

CHOI, J. M.; WOO, G. J. Transfer of Tetracycline Resistance Genes with Aggregation Substance in Food-Borne *Enterococcus faecalis*. **Curr Microbiol.**, v. 70, p. 476-484, 2015.

CLSI. M100-S26: Performance Standards for Antimicrobial Suscetibility Testing. USA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 27 ed., 2017.

COSTA, E. A. **Vigilância Sanitária: proteção e defesa da saúde**. São Paulo: Sobravime, 2004.

DA COSTA, E. C. **Caracterização Microbiológica e Físico-Química de Leite Humano em diferentes períodos de lactação**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2012.

DUTKA-MALEN, S.; EVERS, S.; COURVALIN, P. Detection of Glycopeptide Resistance Genotypes and Identification to the Species Level of Clinically Relevant Enterococci by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 24–27, 1995.

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular Screening of Enterococcus Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.4, p. 1628-1635, 2001.

EUCLIDES, M. P. Nutrição do Lactente: Base Científica para uma alimentação adequada. 2.ed. **Revista Atual**, Viçosa, p. 488, 2000.

FACKLAM, R. R.; SAHM, M. D.; TEIXEIRA, L. M. In: Murray, B. E.; et. al. **Enterococcus. Manual of Clinical Microbiology**, 7 ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, p. 297-305, 1999.

FAN, H.H.; KLEVEN, S.H.; JACKWOOD, M.W. Application of polymerase chain reaction with arbitrary to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian. Dis.**, v.39, p. 729-735. 1995.

FRACALANZZA, S. A. P. **Identificação, resistência a antimicrobianos e caracterização molecular de Enterococcus isolados de alimentos**. Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007.

FURTADO, M. A. M. *et al.* Incidence of vancomycin-resistant Enterococcus at a university hospital in Brazil. **Rev. Saúde Pública** , v.39, n.1, 2005.

FOULQUIÉ-MORENO, M. R. *et al.* The role and application of *enterococci* in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p. 1-24, 2006.

GAMA, B. A. **Análise da resistência antimicrobiana e de genes de virulência em Enterococcus spp.** Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular), Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

GOMES, M. B. **Caracterização de Enterococcus spp. isolados de alimentos quanto à presença de genes de virulência**. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

- HONER, R. *et al.* Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hosp. Universitário de Santa Maria. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.41, n.6, p. 391-395, 2005.
- IKONEM, R. S.; MIETTINEM, A.; GROONOS, P. Bacteriological quality control in a human milk bank. **Klin Pädiatr.** v. 194, p. 295-297, 1982.
- JELLIFE, D. B.; JELLIFE, E. F. P. **Human milk in the modern world.** Oxford: Oxford Universit, 500, 1979.
- MACKIE, R. I; SCHIR, A.; GASKINS, H. R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 69, n. 5, p.1035S-1045S, 1999.
- MANNU, L. *et al.* Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 291-304, 2003.
- MARTIN, R. *et al.* Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. **The Journal of Pediatrics.** v. 143, p. 754-758, 2003.
- MARTIN, R. *et al.* Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. **Research in Microbiology.** v. 158, p. 31-37, 2007.
- MENEZES, E. A. *et al.* Infecções Hospitalares urinárias causadas por *Enterococcus faecalis* na cidade de Fortaleza. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 37, n.2, p. 65-67, 2005.
- MENEZES, G. **Avaliação dos procedimentos higiênico-sanitários utilizados durante a coleta domiciliar e o transporte do leite humano ordenhado.** Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.
- MURRAY, P. *et al.* **Microbiologia médica.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 220-223, 2004.
- MUSSI-PINHATA, M. M.; DO NASCIMENTO, S. D. Infecções neonatais Hospitalares. **Jornal de Pediatria**, v. 77, Supl. 1, 2001.
- MUSSI-PINHATA, M. M.; REGO, M. A. C. Particularidades imunológicas do pré-termo extremo: um desafio para a prevenção da sepse hospitalar. **J. Pediatr.**, v. 81, n. 1, p. S59-S68, 2005.
- NOVAK, F. R. *et al.* Resistência antimicrobiana de coliformes isolados de leite humano ordenhado. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n.3, p. 713-717, 2001.
- NOVAK, F. R.; CORDEIRO, D. M. B. The correlation between aerobic mesophilic microorganism counts and Dornic acidity in expressed human breastmilk. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.7, n.1, 2007.
- NOVAK, F. R. *et al.* Sensorial analysis of expressed human milk and its microbial load. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.84, n.2, p. 181-184, 2008.

SERAFINI, A. B. *et al.* Qualidade microbiológica de leite humano obtido em banco de leite. **Rev. Saúde Pública**, v.37, n.6, p.775-9, 2003.

SILVA, Q. S. **Detecção e identificação de genes de resistência aos antimicrobianos e de virulência em *Enterococcus* spp. isolados de alimentos e de amostras clínicas.** Tese (Doutorado em Microbiologia), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2016.

SILVA, V. A. A. L. *et al.* Maternal breastfeeding: indicators and factors associated with exclusive breastfeeding in a subnormal urban cluster assisted by the Family Health Strategy. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 643, p. 8, 2018.

SILVEIRA, L. A. M. *et al.* Controle Microbiológico do Leite Humano Universitário. **Rev. baiana saúde pública**, v.36, p.3, 2012.

SHANKAR, V. *et al.* Infection-Derived *Enterococcus faecalis* Strains Are Enriched in *esp*, a Gene Encoding a Novel Surface Protein. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 193-200, 1999.

UNICEF - FUNDO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A INFÂNCIA. Importância do leite materno na infância. **Rev. Hig. Alimentar.**, v.3, n.1, p. 172-173, 1984.

VALENZUELA, A.S. *et al.* Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: Antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. **Food Microbiology**, v. 27, p. 955-961, 2010.

VANCANNEYT, M. *et al.* Intraspecies genomic group in *Enterococcus faecium* in their correlation with origin and pathogenicity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1381-1391, 2002.

VANKERCKHOVEN, V. *et al.* Development of a multiplex PCR for the detection of *asaI*, *gelE*, *cylA* and *hyl* genes in Enterococci and survey for virulence determinants among European Hospital isolates of *Enterococcus faecium*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 42, n.10, p. 4473-4479, 2004.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Indicators for assessing infant and young child feeding practices.** Washington D.C., USA, 2007.

CAPÍTULO 1

Identificação, caracterização de resistência e patogenicidade de *Enterococcus* spp. em amostras de doadoras de Leite Humano.

Luana Andrade Mendes Santana¹, Nívea Nara Novais Andrade¹, Lucas Santana Coelho da Silva², Milena Soares dos Santos¹, Cláudio Lima Souza¹, Lucas Miranda Marques^{1,2}, Márcio Vasconcelos Oliveira^{1*}.

¹Multidisciplinary Institute of Health, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Brazil.

²University of Santa Cruz (UESC), Campus Soane Nazaré de Andrade, Ilhéus, Brazil.

Multidisciplinary Institute of Health: Rua Rio de Contas, 58 – Quadra 17 – Lote 58, Bairro Candeias – CEP: 45.029-094, Vitória da Conquista, BA, Brazil.

*Address correspondence to: Phone: +55 77 3429-2710.

Email: marciomvof@gmail.com (Márcio Vasconcelos Oliveira)

RESUMO

O leite humano é a fonte alimentar primordial para os recém-nascidos e lactentes. Frequentemente, bebês internados necessitam de suporte nutricional do Banco de Leite Humano (BLH). Espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* podem ser contaminantes de amostras de leite humano ordenhado, já que fazem parte da microbiota de doadoras saudáveis. Diante da importância de *Enterococcus* spp. em patologias humanas, sobretudo em neonatos, o objetivo do estudo foi identificar e caracterizar a virulência e resistência de isolados em amostras (regiões mamilo-areolar, mãos e alíquotas de leite) de doadoras de leite humano do Banco de Leite Materno do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista, Bahia. Ademais, verificou-se as condições higiênico-sanitárias das doadoras, a fim de esclarecer possíveis meios de contaminação do leite ordenhado. Foram coletadas amostras cutâneas das 30 participantes (swab estéril único) e alíquotas e leite cru e pasteurizado. Em todos os isolados de *Enterococcus* spp. procedeu-se antibiograma, por método de disco difusão, e técnicas de biologia molecular para pesquisa de genes de resistência e virulência. Foram identificados espécimes de *Enterococcus* spp. em 30% (n=9) das doadoras, sendo isolados 11 espécimes. A resistência à tetraciclina foi a mais encontrada, em 63% dos isolados (n=7), seguida de sensibilidade intermediária à ciprofloxacino, 27% dos isolados (n=3). Em 63% (n=7) dos isolados, foi encontrado o gene *efaA* e em 27% (n=3) o gene *ace*. O presente estudo apresentou a responsabilidade do controle microbiológico pelo BLH e a necessidade de traçar alternativas para impedir a chegada de espécies de *Enterococcus* spp. em ambiente hospitalar.

Palavras-Chave: Leite humano. *Enterococcus* spp. Virulência.

Introdução

É consenso que não existe um substituto ideal para o leite humano (LH), mesmo com os avanços tecnológicos atuais nos campos de produção, processamento, conservação e preparo de alimentos para bebês nos primeiros meses de vida¹. O LH possui características nutricionais capazes de atender os recém-nascidos (RNs), contendo todos os nutrientes que atendem apropriadamente as necessidades fisiológicas e metabólicas nessa faixa etária². Biologicamente, é um fluido complexo contendo proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais, componentes imunológicos tais como IgA, enzimas, interferon, além de fatores tróficos ou moduladores de crescimento³.

Situações como nascimentos prematuros, internações em unidade neonatal, doenças e morte materna, principalmente em decorrência de complicações obstétricas, e quando há baixa produção de leite pelas mães podem levar a dificuldades no estabelecimento e manutenção do aleitamento materno, sendo necessário, portanto, da utilização de outros meios para complementar a nutrição dos RNs. Nesse contexto, o uso do leite humano doado tornou-se uma alternativa eficiente para a amamentação⁴, onde os recém-nascidos podem ser alimentados com leite obtido em Bancos de Leite Humano – BLH⁵.

O BLH é um centro especializado responsável pela promoção e incentivo ao aleitamento materno, execução das atividades de coleta, processamento e controle de qualidade de colostro, leite de transição e leite maduro, para posterior distribuição a bebês que dele necessitam como fator de sobrevivência, sob prescrição de médico ou de nutricionista⁶. Um dos pontos de alerta mais importantes com os BLHs é o controle microbiológico do leite doado, pois este pode ser um excelente meio de cultura para vários tipos de microrganismos, introduzidos durante a coleta, transporte e até o processamento, uma vez que não dispõe de nenhuma barreira física que impeça a penetração de patógenos contaminantes⁷.

Entre os microrganismos associados a importantes infecções de RNs, e que podem ser contaminantes de amostras de LHO, estão as espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus*. *Enterococcus* spp. são integrantes da microbiota do trato gastrointestinal de humanos saudáveis⁸, podendo estar presente em número significativo nas mãos e utensílios de doadoras de leite, a depender de suas condições higiênicas. A presença dessas bactérias no leite humano indica que o mesmo entrou em contato, de forma direta ou indireta, com material de origem fecal, comprometendo a qualidade do leite humano ordenhado⁹. Espécies de *Enterococcus* spp., sobretudo *E. faecalis* e *E. faecium*, podem ser amplamente patogênicas para os recém-nascidos

e precisam, portanto, ser efetivamente inativadas pelo processo de pasteurização realizado no BLH, caso estejam presentes em leite doado¹⁰.

O gênero *Enterococcus* constitui o grupo das bactérias ácido-láticas mais controverso pois, mesmo tendo grande potencial biotecnológico, tem associação com doenças graves envolvendo seres humanos. Ademais, têm-se revelado cada vez mais como microrganismos que apresentam cepas com perfil de multirresistência à fármacos de uso terapêutico¹¹, a resistência aos antimicrobianos aminoglicosídeos, ampicilina, penicilina e vancomicina para tratamento de infecções por *Enterococcus* spp., sendo elencado como um importante problema para os pacientes infectados por esses, ocasionando a redução das opções de tratamento^{12,13}.

O conhecimento do perfil de patogenicidade e fatores de virulência em *Enterococcus* spp. ainda é incompleto. Isso deve-se ao fato de que o gênero é comensal em humanos saudáveis e, como tal, têm virulência sutil e não são facilmente identificados¹³. Têm sido estudados alguns fatores determinantes, ainda assim controversos, sobre os mecanismos de regulação gênica em *Enterococcus* spp. Os fatores de virulência encontrados incluem aderência ao tecido hospedeiro, invasão e formação de abscessos, modulação respostas inflamatórias do hospedeiro e secreção de produtos¹⁴.

Diante deste cenário, para suprir a demanda nutricional em neonatos com indicação, é essencial o cumprimento rigoroso de todos os passos para garantir a qualidade desejada no controle microbiológico do leite humano ofertado pelos Bancos de Leite. Para isso, é condição *sine qua non*, garantir a aplicação de condições higiênico-sanitárias da coleta à oferta do leite para os bebês, passando por um processo rigoroso de controle de qualidade. Até o presente momento, não foram registrados estudos correlacionando rotas de contaminação por *Enterococcus* spp. em leite humano no município de Vitória da Conquista (BA), bem como não há dados associando às condições higiênico-sanitárias das coletas domiciliares por doadoras de LHO com o isolamento de bactérias entéricas.

Desta forma, considerando a facilidade destes microrganismos contaminarem o leite doado, mediante a importância clínica destes patógenos em humanos, sobretudo em pacientes com vulnerabilidade imunológica, e pela sua grande possibilidade de dispersão por meio de vetores, profissionais de saúde, insetos e outros, observa-se a importância da investigação da toxigenicidade e dispersão desses, avaliação da qualidade da coleta, conservação e processamento do leite ofertado aos RNs. Esses procedimentos são essenciais para o melhor entendimento dos fatores de patogenicidade e virulência de espécies de *Enterococcus* spp. presentes nas amostras de leite humano cru, pasteurizado e de amostras das mãos e das regiões auréolo-mamiolar de doadoras ligadas ao Banco de Leite Materno do Hospital Municipal Esaú

Matos em Vitória da Conquista (BA). Tais dados são extremamente importantes para o entendimento desta temática, a fim de contribuir sobremaneira não só para minorar a disseminação de cepas de *Enterococcus* spp. em ambiente hospitalar, mas sobretudo para a diminuição dos impactos que os mesmos podem causar sobretudo em bebês vulneráveis, seja de forma direta ao ingerir leite contaminado, seja por veiculação humana no ambiente hospitalar.

Material e Métodos

Desenho do estudo, população, local e período

Trata-se de um estudo transversal realizado a partir de amostras de material das regiões mamilo-areolar, mãos e alíquotas de LHO cru e LHO pasteurizado, provenientes de doadoras saudáveis cadastradas no Banco de Leite Humano do Hospital Esaú Matos em Vitória da Conquista, Bahia, Brasil.

Recrutou-se para o presente estudo, doadoras cadastradas no Banco de Leite que tinham histórico de doação de volume médio semanal maior ou igual a 400 mL. Leite cru doado com volume inferior a 400 mL possui necessidade de pool de amostras de outras doadoras, perdendo assim a rastreabilidade e especificidade da amostra a uma doadora única. Como critérios de exclusão, elencou-se os seguintes fatores: doadoras com lesões em mãos ou região mamilo-areolar e doação de leite cru na semana da participação do estudo com volume inferior ao necessário para realização da pasteurização individual.

Os isolados microbianos obtidos no presente estudo ocorreu através da coleta única de amostras da região mamilo-areolar e mãos, alíquotas de leite ordenhado cru e leite ordenhado pasteurizado de 30 doadoras no período compreendido entre março e agosto de 2018.

Considerações Éticas

Os dados utilizados no estudo foram extraídos de um Projeto maior denominado “Identificação, caracterização de resistência e patogenicidade de *Enterococcus* spp. e Enterobactérias em amostras de doadoras de Leite Humano no Banco de Leite Humano do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista (BA)”. O projeto foi aprovado pelo

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Multidisciplinar em Saúde IMS/UFBA, CAAE: 80800717.8.0000.5556 – Parecer nº: 2.475.023. O estudo seguiu todos os preceitos necessários estabelecidos pela resolução 466/2012.

Coleta das amostras e dados

Verificou-se, de modo semanal, durante o período do estudo junto à administração do BLH do Hospital Municipal Esaú Matos a lista de doadoras em atividade. De posse destas informações, doadoras que se encaixaram no requisito volume foram convidadas a participar do estudo, mediante contato telefônico. As coletas das amostras foram realizadas nos domicílios das doadoras em visitas agendadas em horários sempre antecedentes a ordenha para a doação. Nas visitas agendadas, inicialmente foram apresentadas todas as informações do estudo, tirando as dúvidas das doadoras, quando necessário. Em seguida, as doadoras que concordaram em participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Neste estudo ocorreu, além da avaliação microbiológica de amostras biológicas das doadoras, a aplicação de questionários versando sobre questões higiênico-sanitárias das doadoras durante a coleta, acondicionamento e conservação do leite doado. Após a assinatura do TCLE pelas doadoras, foram realizadas as entrevistas através da utilização do Questionário sobre os Hábitos Higiênico-Sanitários da Coleta de Leite Humano e Aspectos Sociodemográficos das Doadoras. Ao fim da entrevista, foi solicitado pelas pesquisadoras que as participantes se preparassem para as ordenhas dos LH conforme procedimentos higiênico-sanitários habitualmente utilizados pelas mesmas, com finalidade de doação de LH ao BLH.

Uma vez preparadas, as doadoras foram submetidas às coletas de amostras cutâneas, região mamilo-areolar e mãos, por meio de swab estéril único com meio de transporte Stuart. Estas amostras foram colhidas pelas pesquisadoras farmacêuticas, devidamente treinadas e habilitadas, que utilizaram todos os paramentos necessários: máscara facial, touca, luvas descartáveis e jaleco.

Após a coleta das amostras cutâneas, foram realizadas as coletas de amostras de leite ordenhado cru pelas próprias participantes, sendo solicitado as mesmas que realizassem o procedimento da mesma forma que habitualmente fazem para a coleta de leite para doação. Foram realizadas as coletas de pequeno volume inicial de LH (aproximadamente 2 mL) em frasco estéril (com identificação codificada), fornecido pelas pesquisadoras, a fim de realizar

cultivo do LHO; o volume sequencial foi colhido normalmente como de costume em frasco de vidro estéril cedido pelo BLH.

Os swabs e frascos estéreis utilizados respectivamente para a coleta de amostras cutâneas e de leite humano ordenhado receberam selos de marcação identificados com códigos de números sequenciais crescentes para efeitos de correlação das amostras. Cada participante foi identificada com um número, de acordo com a ordem de participação no estudo, seguido pelas iniciais do nome completo. Além do número sequencial e as iniciais das doadoras, as amostras foram codificadas por tipo: swab (Sw), leite cru (LC) e leite pasteurizado (LP). Foram utilizados um swab e dois frascos por doadoras: um no momento da coleta para o LHO cru e outro para amostras de LHO pasteurizado. Os selos de identificação dos frascos tinham cores diferentes para diferenciar amostras de LHO cru (selo azul) e LHO pasteurizado (vermelho).

Os swabs foram transportados em caixa térmica, sem refrigeração, e as alíquotas de leite cru foram transportadas em caixa térmica refrigerada, com utilização de gelox. As caixas de transporte foram imediatamente encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas do Instituto Multidisciplinar em Saúde – UFBA, onde ocorreram posteriores sementeiras das amostras e todo processamento microbiológico.

O BLH sinalizou semanalmente a chegada de frascos marcados com codificação do estudo e imediatamente resgatou-se alíquota de LH destes frascos após pasteurização. As amostras de LH pasteurizadas foram transportadas em caixa térmica refrigerada, com utilização de gelox, e imediatamente encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas do Instituto Multidisciplinar em Saúde – UFBA para posteriores sementeiras das amostras e todo processamento microbiológico.

Isolamento e identificação e de *Enterococcus* spp.

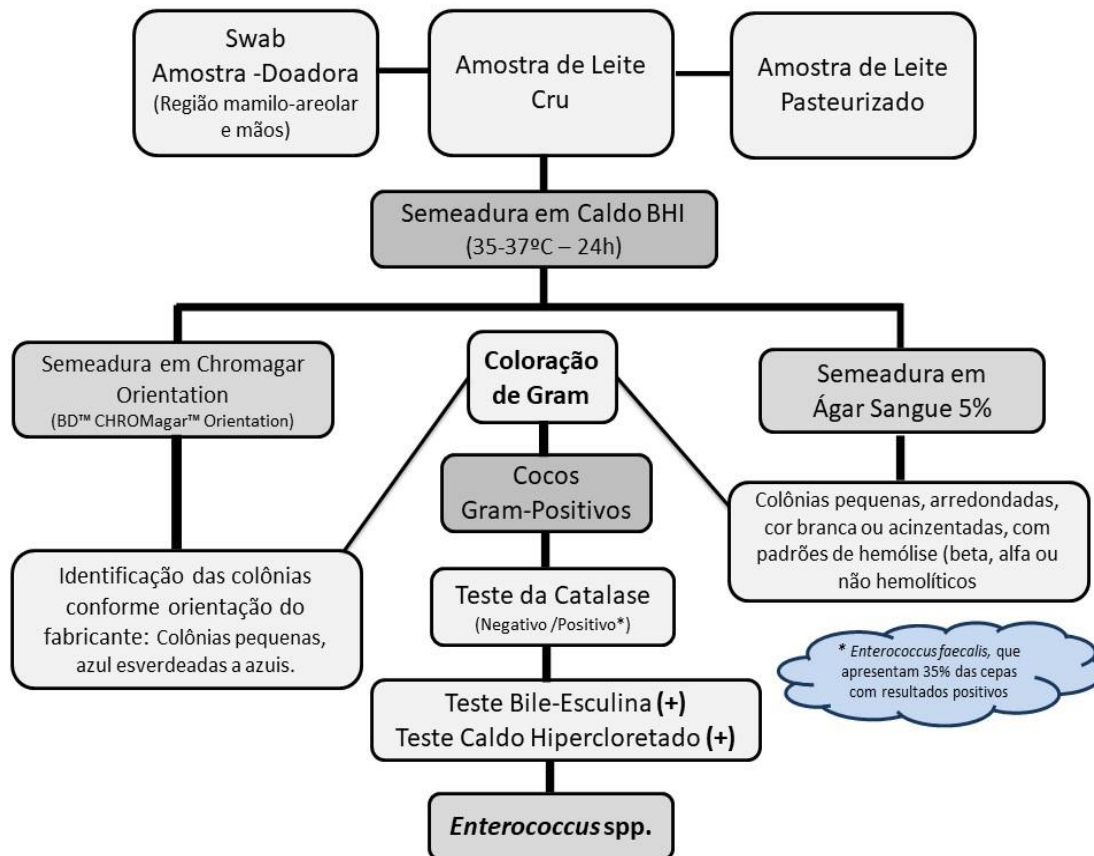
Ao chegar ao laboratório, todas as amostras biológicas foram imediatamente inoculadas em meio de enriquecimento, caldo BHI – Brain Heart Infusion (HIMEDIA®) e incubadas em estufa bacteriológica a 35-37°C por 24 horas. Após isso, foram repicadas em placas de Petri com meio Ágar Sangue 5% (Ágar Base, HIMEDIA®) e Chromagar Orientation (BD™ CHROMagar™ Orientation) em estufa bacteriológica a 35-37°C, por 24 horas. Os dois meios juntos foram importantes para elevar a sensibilidade do isolamento e identificação dos microrganismos de interesse no presente estudo.

As colônias com características presuntivas de *Enterococcus* spp., selecionadas em ambos meios foram submetidas à metodologia de Coloração de Gram para observação das características morfotintoriais, teste da catalase e posteriores testes para identificação do gênero *Enterococcus*: hidrólise da esculina em presença de bile e crescimento e caldo hipercloretado (NaCl 6,5%), conforme Fluxograma 1 a seguir.

Foram considerados como *Enterococcus* spp. quando ocorreu crescimento bacteriano após submissão aos testes de hidrólise da esculina em presença de bile e crescimento em caldo hipercloretado (de ambos os meios), nos dois casos independente do resultado da catalase.

Para a detecção dos genes constitutivos, de virulência e resistência em *Enterococcus* spp., todas as amostras positivas na etapa de identificação foram submetidas à técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), reativação em meio BHI e repique em ágar cromogênico.

Fluxograma 1: Isolamento e identificação das espécies de *Enterococcus* spp. em amostras isoladas da região mamilo-areolar, mãos, leite cru e pasteurizado de doadoras do Banco de Leite Humano do Hospital Esau Matos.



Armazenamento / criopreservação dos isolados

Para todas as amostras com a identificação de *Enterococcus* spp. confirmadas, foram preparadas suspensões espessas do microrganismo em crio tubos, contendo 2,0 mL da solução de BHI glicerinado a 20% (v/v) e conservadas em freezer a -20°C (FACKLAM, SAHM, TEIXEIRA, 1999)¹⁵. Estas amostras foram utilizadas durante todo o trabalho para a realização dos testes necessários de biologia molecular, a fim de identificar genes de resistência e virulência.

Antibiograma

Todas as cepas de *Enterococcus* spp. isoladas em amostras cutâneas e de LH foram submetidas a avaliação da atividade antimicrobiana. A avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada através da utilização do teste de difusão em ágar^{16,17,18}, utilizando o Método de Kirby e Bauer (1966). O método utilizado, os discos de antimicrobianos selecionados e os critérios para as leituras e interpretações dos diâmetros dos halos de inibição seguiram as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* [(CLSI), 2017]¹⁹.

Deteção dos genes constitutivos, de virulência e resistência em *Enterococcus* spp.

Como os métodos microbiológicos convencionais utilizados somente permitiram identificar o gênero *Enterococcus*, sendo as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* de grande relevância clínica, considerando ainda que numa mesma doadora poderia ser isolada mais de uma espécie, realizou-se a pesquisa para os genes constitutivos para ambas espécies. Para confirmação das espécies de *Enterococcus* spp., as amostras foram submetidas à técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação dos genes *ddl* que codificam as ligases D-alanina, espécie-específicos para *E. faecalis* e *E. faecium*, conforme descrito por Dutka-Malen, Evers e Courvalin (1995)²⁰.

Para detecção de genes de resistência à quinolonas, as amostras foram submetidas à reação de PCR para a detecção dos genes *gyrA* e *parC* conforme adaptação dos protocolos descritos por Amin, Jalal e Wretlind (1999)²¹ e Brisse e colaboradores (1999)²², respectivamente.

Para a detecção dos genes de virulência *ace* (proteína que adere ao colágeno e à laminina favorecendo a adesão bacteriana comumente associada a endocardites), *efaA* (antígeno A de superfície comumente associado à formação de biofilmes e endocardites), *geIE* (gelatinase - metaloprotease que hidrolisa a gelatina, colágeno, hemoglobina e peptídeos; comumente associada a endocardites e peritonites) e *as* (substância de agregação - glicoproteína de superfície com várias funções, entre elas a de facilitar a conjugação e transferência horizontal de genes e auxílio na adesão à superfície de células eucarióticas), a reação foi conduzida de acordo adaptação do protocolo de Mannu e colaboradores (2003)²³.

Para a detecção dos genes *cylA* (citolisina - proteína capaz de lisar hemácias humanas) e *hyl* (hialuronidase - despolimeriza o ácido hialurônico, auxiliando na disseminação do microorganismo nos tecidos do hospedeiro), a reação foi conduzida de acordo adaptação do protocolo de Vankerckhoven e colaboradores (2004)²⁴. Para a detecção do gene *esp* (proteínas de superfície), a reação foi conduzida de acordo com adaptação do protocolo de Shankar e colaboradores (1999)²⁵.

Para a detecção dos genes de enterocinas (Enterocina A, Enterocina B, Enterocina P e Enterocina 31 – também conhecida como Bacteriocina), a reação de PCR foi conduzida de acordo adaptação do protocolo de Vancanneyt e colaboradores (2002)²⁶.

Análise Estatística de Dados

A análise descritiva das variáveis do estudo foi realizada com o banco de dados constituído em Microsoft Excel e as análises realizadas através do o Programa Estatístico EPI INFO (versão 7.2.2.6). Para a comparação de frequências foi utilizado o Teste de qui-quadrado, considerando índice de significância $p < 0,05$ e IC 95%.

Resultados

Considerando os critérios metodológicos, foram coletadas amostras em 30 doadoras cadastradas no Banco de Leite do Hospital Esaú Matos, em Vitória da Conquista (BA), obtendo um total de 81 amostras coletadas: 30 amostras provenientes de swab contendo amostra cutânea das regiões mamilo-areolar e mãos das doadoras, 30 amostras de leite humano cru e 21 amostras provenientes de leite humano pasteurizado. Mesmo seguindo os critérios, para 9 participantes

do estudo não foi possível a obtenção da alíquota de leite pasteurizado por conta das mesmas não terem doado volume suficiente para realização de pasteurização em frasco único; ocorrendo perda de 30% de amostras pasteurizadas.

Foram isoladas cepas de *Enterococcus* spp. em 9 doadoras (30%), sendo um total de 11 cepas foram identificadas: 7 cepas (63,6%) foram de amostras de swab contendo amostra cutânea das regiões mamilo-areolar e mãos das doadoras e 4 cepas (36,4%) foram isoladas em amostras de leite ordenhado cru. Nas amostras de leite humano pasteurizado não houve detecção de *Enterococcus* spp., mas em 38% (n=8) isolou-se outros microrganismos que não constituíram interesse deste estudo, sendo o principal *Staphylococcus aureus*.

As participantes do estudo foram questionadas em relação à aspectos socioeconômicos e às condições higiênico-sanitárias com a finalidade de atrelar variáveis selecionadas à rota de contaminação do leite humano por *Enterococcus* spp. Neste contexto, a maioria das participantes tinha idade até 30 anos, eram casadas ou moravam com conjugue, tinham renda familiar de acima de 2 salários mínimos, filho único e cursaram até ensino médio, conforme Tabela 1 que revela a análise descritiva dos aspectos socioeconômicos das participantes deste estudo.

Em relação à análise dos procedimentos higiênico-sanitários seguidos pelas doadoras para a coleta de leite enviado para doação, a maioria relatou os seguintes procedimentos: realizavam a lavagem das mãos antes da coleta de leite, às vezes verificavam o tamanho das unhas e cortavam quando necessário antes da ordenha, sempre prendiam o cabelo, realizavam a lavagem dos seios antes da ordenha, utilizavam máscara na ordenha, evitavam conversar durante a ordenha, desprezavam o primeiro jato de leite, faziam a ordenha através de bomba manual/elétrica e usavam os frascos estéreis fornecidos pelo Banco de Leite do Hospital Esaú Matos, conforme Tabela 2 que revela a análise descritiva das condições higiênico-sanitárias de coleta das participantes deste estudo.

No caso das doadoras que fizeram a ordenha com o uso de Bombas (n=24), todas afirmaram que higienizam o aparelho antes do uso, sendo que apenas 19 doadoras (79%) usam o hipoclorito (recomendação para a higienização). Em relação ao tipo de bomba utilizada, das 24 doadoras que relataram o uso de bomba, 18 doadoras (75%) estavam em uso de bomba manual e 6 doadoras (25%) em uso de bomba elétrica.

As 14 doadoras (46,7%) que relataram não desprezar o primeiro jato foram orientadas em relação ao motivo e necessidade do procedimento. Das 16 doadoras (53,3%) que afirmaram a realização do procedimento, 2 doadoras (12,5%) não realizaram o desprezo durante a entrevista. Das 30 doadoras entrevistadas, 18 (60%) afirmaram não conversar durante a coleta. Entretanto, todas conversaram durante o procedimento no momento da entrevista.

Ao correlacionar o isolamento de *Enterococcus* spp. com as variáveis selecionadas neste estudo, verificou-se que das 9 doadoras que foram identificadas como portadoras dos espécimes, 77,8% destas (n=7) relataram uso de bomba de sucção para coleta de leite e em apenas 22,2% (n=2) a coleta láctea ocorreu por expressão manual. Todas elas relataram o procedimento de lavagem das mãos antes das ordenhas.

Tabela 1 – Análise Descritiva dos aspectos socioeconômicos e condições higiênico-sanitárias de coleta das doadoras de LH das doadoras de LH (n = 30) cadastradas no BLH do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista (BA) - 2018.

Análise Descritiva dos aspectos socioeconômicos das doadoras de LH.		
Variável	n	(%)
Faixa Etária		
Até 30 anos	19	63,3
Superior a 30 anos	11	36,7
Estado Civil / Conjugal		
Casada / com companheiro	20	66,7
Solteira ou Divorciada / sem companheiro	10	33,3
Renda Familiar		
Menos de 2 salários mínimos ¹	9	30,0
A partir de 2 salários mínimos	21	70,0
Quantidade de filhos		
Filho único	16	53,3
Dois ou mais filhos	14	36,7
Escolaridade		
Até o Ensino Médio	21	70,0
Superior Completo	9	30,0
Total	30	100,0
Análise Descritiva das condições higiênico-sanitárias das doadoras de LH.		
Variável	n	(%)
Lavagem das mãos antes da coleta		
Às vezes / Nunca	1	3,3
Sempre	29	96,7
Verificação do tamanho das unhas/cortar antes da coleta		
Às vezes / Nunca	18	60,0
Sempre	12	40,0

(continuação)

Hábito de prender os cabelos antes da coleta		
Às vezes / Nunca	6	20,0
Sempre	24	80,0
Lavagem dos seios antes da coleta		
Às vezes / Nunca	4	13,3
Sempre	26	86,7
Uso de máscara durante a coleta		
Às vezes / Nunca	4	13,3
Sempre	26	86,7
Evitar conversar durante a coleta		
Às vezes / Nunca	12	40,0
Sempre	18	60,0
Desprezo de primeiro jato de leite no início da coleta		
Às vezes / Nunca	14	46,7
Sempre	16	53,3
Forma de realização da ordenha		
Bomba Manual / Elétrica	24	80,0
Ordenha Manual	6	20,0
Frequência de higienização da bomba²		
Às vezes / Nunca	0	0
Sempre antes de usar	24 ¹	100,0 ¹
Total	30	100,0

¹Salário mínimo no período R\$ 954,00.

²Pergunta aplicada apenas às doadoras que informaram realizar ordenha através de bomba manual e elétrica.

Variáveis socioeconômicas das doadoras de LH como idade, estado civil, renda familiar, quantidade de filhos e escolaridade, como também as variáveis concernentes aos procedimentos higiênico-sanitários relatados, lavagem das mãos antes das ordenhas, conversa durante as ordenhas e desprezo do primeiro jato de leite no início da coleta não foram capazes de explicar a presença de *Enterococcus* spp. em amostras das participantes ($p > 0,05$).

Dos 11 espécimes de *Enterococcus* spp., foram encontrados algum tipo de resistência antimicrobiana em 10 isolados (91%). A resistência à tetraciclina foi a mais encontrada (63% dos isolados – n=7), seguida de sensibilidade intermediária à ciprofloxacino (27% dos isolados – n=3). Foi encontrado perfil de resistência os antimicrobianos quinolônicos testados (ciprofloxacino, norfloxacino e levofloxacino) em 9% dos isolados (n=1). Todos os isolados

mostraram-se sensíveis à vancomicina. A tabela 2 descreve o perfil de sensibilidade encontrado dos isolados.

Todos os 11 espécimes de *Enterococcus* spp. foram analisados por meio da Reação em Cadeia de Polimerase para detecção dos genes de resistência à quinolonas (genes *gyrA* e *pacC*). Todavia, não foram obtidos resultados positivos para esses genes.

Tabela 2 – Perfil de sensibilidade dos isolados (n=11) de *Enterococcus* spp. encontrado frente ao rol de antimicrobianos utilizados seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* [(CLSI), 2017].

Antimicrobianos	Sensível n (%)	Intermediário n (%)	Resistente n (%)
Ampicilina 10 µg ¹	11 (100,0)	0 (0)	0 (0)
Penicilina 10 un ²	9 (81,8)	0 (0)	2 (18,2)
Tetraciclina 30 µg	4 (36,4)	0 (0)	7 (63,6)
Ciprofloxacino 5 µg	7 (63,6)	3 (27,3)	1 (9,1)
Norfloxacino 10 µg	9 (81,8)	0 (0%)	2 (18,2)
Levofloxacino 5 µg	10 (90,9)	0 (0)	1 (9,1)
Nitrofurantoína 300 µg	9 (81,8)	0 (0)	2 (18,2)
Linezolid 30 µg	11 (100,0)	0 (0)	0 (0)
Vancomicina 30 µg	11 (100,0)	0 (0)	0 (0)

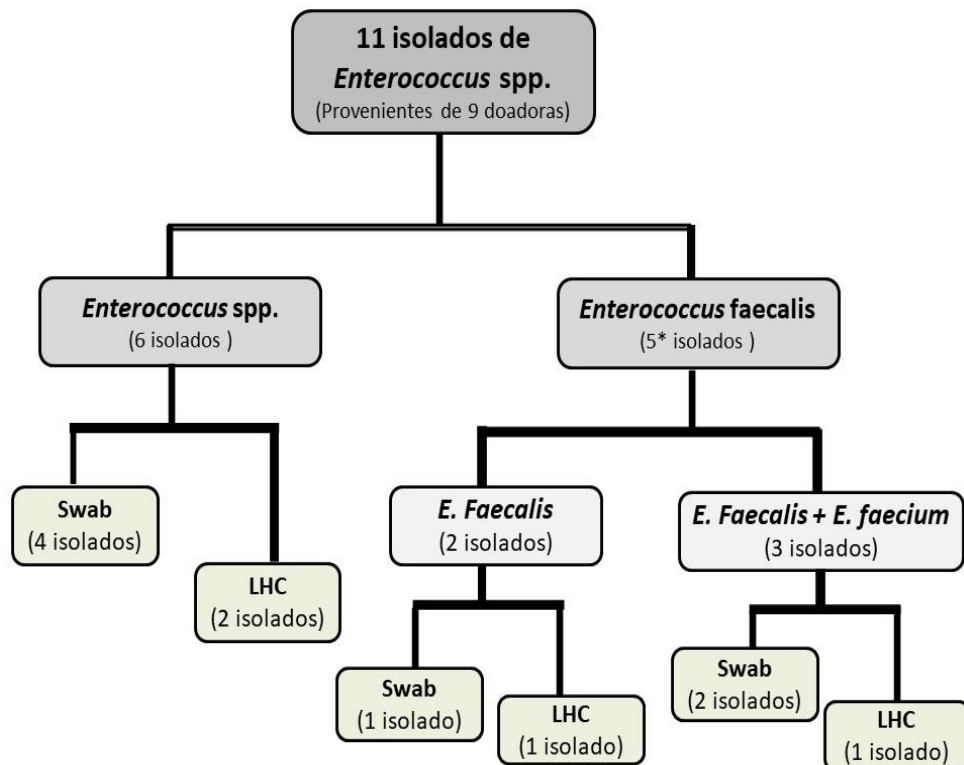
Fonte: Estudo.

¹µg: micrograma - sendo 1µg = 0.001 miligramas (mg). ²un = unidades.

Os 11 isolados de *Enterococcus* spp. foram analisados por PCR para detecção do gene constitutivo *ddl* que codificam as ligases D-alanina, espécie-específicos para *E. faecalis* e *E. faecium*. Após essa análise observou que, dos 11 espécimes de *Enterococcus* spp. provenientes das 9 participantes, 6 isolados foram identificados como *Enterococcus* spp. e 5 isolados foram identificados como para *E. faecalis*. Todavia, verificou-se que 3 isolados de *E. faecalis* apresentaram co-colonização com cepas de *E. faecium*. Ou seja, três doadoras possuíam cepas das espécies *E. faecalis* e *E. faecium*. Isso deve-se ao fato de que, após a identificação inicial do gênero *Enterococcus* ter sido realizada, as colônias armazenadas foram coletadas do meio CHROMagar Orientation (BD™ CHROMagar™ Orientation). Como o meio identifica o gênero e não as espécies de *Enterococcus* spp., foram coletadas colônias de ambas espécies.

O Fluxograma 2 abaixo demonstra o perfil de identificação de espécies de *Enterococcus* spp. das doadoras do estudo.

Fluxograma 2 – Perfil de identificação de espécies de *Enterococcus* spp. das doadoras de leite humano participantes do estudo.



Legenda: *5 isolados de *Enterococcus faecalis*, sendo 2 isolados contendo somente *E. faecalis* e 3 isolados contendo co-colonização de *E. faecalis* e *E. faecium*.

Todos os 11 isolados de *Enterococcus* spp. foram submetidos a PCR para detecção dos genes de virulência *ace* (adesina de colágeno), *efaA* (antígeno A), *gelE* (gelatinase), *as* (substância de agregação), *cylA* (citolisina), *hyl* (hialuronidase) e *esp* (proteína de superfície), conforme resultados na Tabela 4. Dos 11 isolados, 7 isolados (63%) apresentaram o gene *efaA* (antígeno A) e 3 isolados (27%) apresentaram o gene *ace* (adesina de Colágeno). Não foi encontrado resultado para presença do gene *gelE* (gelatinase).

Outros genes que tiveram investigação genotípica através de PCR nos isolados de *Enterococcus* spp. foram os genes de virulência *as* (Substância de Agregação), *cylA*

(Citolisina), *hyl* (Hialuronidase) e *esp* (Proteínas de superfície). Os genes de enterocinas Enterocina A, Enterocina B, Enterocina P e Enterocina 31 (também conhecida como Bacteriocina) também foram investigadas. Nenhum isolado apresentou resultado positivo para esses genes.

Tabela 3 - Distribuição dos genes de virulência de *E. faecium*, *E. faecalis* e *Enterococcus* spp.

Genes de Virulência	<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>		<i>Enterococcus</i> spp.		TOTAL	
	n (isolados)	%	n (isolados)	%	n (isolados)	%	n (isolados)	%
<i>ace</i>	1*	33	1*	33	2	67	3	27
<i>efaA</i>	3**	43	2**	28	3	43	7	63
<i>gelE</i>	0	-	0	-	0	-	0	-
<i>as</i>	0	-	0	-	0	-	0	-
<i>cylA</i>	0	-	0	-	0	-	0	-
<i>hyl</i>	0	-	0	-	0	-	0	-
<i>esp</i>	0	-	0	-	0	-	0	-

Fonte: Estudo.

*gene *ace* encontrado em 1 isolado (contendo cepas de *E. faecalis* e *E. faecium*).

**gene *efaA* encontrado em 3 isolados de *E. faecalis* (sendo um isolado único de *E. faecalis* e 2 isolados de *E. faecalis* e *E. faecium*).

Discussão

Tem sido crescente a utilização de LHO em unidades de terapia neonatal. É necessário que o leite ofertado passe por rigoroso controle de qualidade microbiológico, vez que é consumido por bebês em situação de vulnerabilidade²⁷. A realização do controle de qualidade do leite é fundamental para que o mesmo atue como adjuvante terapêutico e não como veiculador de agentes patogênicos⁵.

Entre os microrganismos associados a importantes infecções de RNs, e que podem ser contaminantes de amostras de LHO, estão as espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus*, que são integrantes da microbiota de humanos saudáveis⁸. Martin e colaboradores realizaram estudos^{28,29} em 2003 e 2007 onde isolaram cepas de *E. faecium*, dentre outros patógenos, em leite humano por meio do isolamento de DNA bacteriano em amostras colhidas quatro dias após os partos. Os mesmos autores encontraram, em amostras de leite coletadas sete dias após os partos, a presença de bactérias gram-positivas, entre elas, cepas de *E. faecalis* e *E. faecium*,

utilizando o mesmo método; o que reforça a facilidade de contaminação do leite humano por *Enterococcus* spp.

No presente estudo encontrou-se, *Enterococcus* spp. em amostras cutâneas de doadoras, mãos e região mamilo-areolar e amostras de LHO cru, algo que corrobora com a necessidade do conhecimento dos microorganismos que podem ser veiculados via amostras de leite para o ambiente hospitalar, e que referenda a necessidade do cuidado a ser dispensado durante a manipulação dos volumes doados ao BLH, considerando que estas bactérias podem ser facilmente disseminadas por profissionais no ambiente hospitalar.

Um estudo⁵ sobre a qualidade microbiológica de leite humano obtido em BLH, encontrou um percentual de 70,4% de crescimento de microrganismos em amostras de LHO não pasteurizado e 50,7% em amostras de LHO pasteurizado. Estudos mais recentes encontraram percentuais menores, como o estudo³⁰ da análise de coliformes fecais em LHO que encontrou um percentual de 9,3% de crescimento bacteriano, microrganismos pertencentes ao grupo coliforme (não ocorreu a identificação das espécies) em amostras de leite humano. Outro estudo³¹ sobre o controle microbiológico do LH encontrou um percentual de 7,5% para amostras de LH contaminadas por microrganismos (sendo a maioria por *Staphylococcus* spp. coagulase negativo). Um quarto estudo⁴ encontrou um percentual de 6% para crescimento bacteriano positivo para coliformes totais em culturas para amostras de LH com coleta domiciliar, e 2% das amostras coletadas no BLH. Esses dados ratificam a importância da realização dos procedimentos higiênicos sanitários adequados, já que foi constatada presença de coliformes fecais em amostras de LH, como também a realização do controle microbiológico das amostras de LHO para que o mesmo não seja veículo de disseminação de microrganismos patogênicos, sobretudo em ambiente hospitalar.

Até o presente momento, não há estudos correlacionando infecções por *Enterococcus* spp. no município de Vitória da Conquista (BA), bem como não há dados associando os aspectos socioeconômicos das doadoras de LHO e as condições higiênico-sanitárias das coletas domiciliares com o isolamento de bactérias entéricas. No presente estudo, foram isolados espécimes de *Enterococcus* spp. em 30% das participantes. Nas amostras de LHO pasteurizado, não houve o isolamento dessas cepas. Entretanto, houve detecção de crescimento de outros microrganismos (que não foi interesse desse estudo) em 38% (8 isolados) das amostras analisadas. No estudo foi encontrado um percentual mais alto de contaminação microbiana de LHO, quando comparado aos estudos citados. Esses dados corroboram a importância do cumprimento dos procedimentos higiênicos sanitários e controle microbiológico das amostras de LH.

Infecções enterocócicas podem ter origem na própria microbiota, ou serem transmitidos entre pacientes³², por meio das mãos dos profissionais da saúde, por exemplo. Ao encontrar *Enterococcus* spp. em 30% das participantes do estudo, observa-se a frequência que cepas desta natureza chegam ao ambiente hospitalar, seja pela presença das doadoras no ambiente hospitalar, para aquelas que doam leite mas estão com seu(s) bebê(s) internado(s), ou ainda via leite doado, e neste caso, se não ocorrer os cuidados necessários no processamento, esses microrganismos podem disseminar no ambiente hospitalar por meio dos profissionais que manuseiam o leite, como também de outros vetores, como insetos³⁴.

De qualquer forma, ocorrendo a dispersão microbiana, pode desencadear impactos diretos ao infectar pacientes e indiretos ao compor a microbiota hospitalar podendo, não somente, contribuir para variabilidade/seleção de microrganismos multirresistentes e amplamente virulentos, servindo de reservatório que pode novamente implicar em impactos diretos aos pacientes, agora de forma mais importante ao passo que oferecem dificuldade terapêutica e maior potencial de letalidade.

Neste estudo, dos 11 espécimes de *Enterococcus* spp., foram encontrados algum tipo de resistência antimicrobiana em 91% dos isolados (n=10). As taxas de resistência à tetraciclina (63%) nos espécimes de *Enterococcus* spp. foram superiores às encontradas em outros estudos, como o estudo³³ sobre a caracterização de cepas hospitalares enterocócicas que encontrou perfil de resistência de 5% à tetraciclina. Esse mesmo estudo³³ encontrou taxas de sensibilidade intermediária à ciprofloxacino em 97% dos isolados. Outro estudo³², que avaliou a detecção e identificação de genes de resistência aos antimicrobianos e de virulência em *Enterococcus* spp. isolados de alimentos e de amostras clínicas, verificou um percentual de 29,5% de sensibilidade intermediária à ciprofloxacino em isolados provenientes de alimentos. Essas taxas são superiores às do presente estudo que teve sensibilidade intermediária à ciprofloxacino em 27% dos isolados.

O gênero *Enterococcus* apresenta características de resistências intrínsecas e progressivas adquiridas a vários agentes antimicrobianos, comumente utilizados nos tratamentos de infecções bacterianas³⁵. A determinação de uma terapia adequada para infecções causadas por *Enterococcus* spp. pode ser complexa devido a maioria dos antibióticos não fazerem o efeito antimicrobiano necessário desejado¹². Devido às características de resistências em *Enterococcus* spp., a penicilina, ampicilina, aminoglicosídeos, tetraciclina e vancomicina por exemplo, aliado ao fato de o gênero ser associado a infecções nosocomiais em pacientes com deficiência imunológica e/ou hospitalizados¹², as mudanças das características do perfil de

sensibilidade aos antimicrobianos desses microrganismos é de máxima importância para a saúde pública.

O mecanismo de patogenicidade em *Enterococcus* spp. ainda não está bem esclarecido. Sabe-se que o gênero *Enterococcus* possui fatores de virulência que estão associados com a gravidade e duração de infecções causadas em humanos. É provável que esses fatores estejam envolvidos na disseminação desses microrganismos em ambiente hospitalar, causando principalmente infecções urinárias, endocardites e bacteremias³⁶.

Entre os fatores de virulência associados a esse gênero, o gene *efaA* está relacionado com a formação de biofilmes, sendo descrito como um dos principais antígenos de superfície em *E. faecalis*, tendo sido identificado em soro de pacientes com endocardites causada por este microorganismo³². Os Biofilmes enterocócicos são intrinsecamente tolerantes a antimicrobianos, dificultando assim para o tratamento de infecções³⁷. Outro fator de virulência associado ao gêneros é o gene *ace*, responsável pela codificação da proteína adesina de colágeno envolvida com o mecanismo de adesão. Esta proteína tem um papel importante no processo da endocardite³².

O conhecimento do perfil de patogenicidade e fatores de virulência em *Enterococcus* spp. ainda é incompleto. Isso deve-se ao fato de que o gênero é comensal em humanos saudáveis e, como tal, têm virulência sutil e não são facilmente identificados. Fatores de virulência encontrados incluem aderência ao tecido hospedeiro, invasão e formação de abscessos, modulação respostas inflamatórias do hospedeiro e secreção de produtos¹⁴.

Em um estudo³³ sobre a caracterização de cepas hospitalares de *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina, suscetibilidade a antimicrobianos e fatores de virulência, foi identificada a presença do gene *ace* (adesina de colágeno) em 66% dos isolados de *E. faecalis* e 2% nos isolados de *E. faecium*. O gene *efaA* (antígeno A) foi encontrado em 100% dos isolados de *E. faecalis* em 5,1% dos isolados de *E. faecium*. Outro estudo³², sobre a detecção e identificação de genes de resistência aos antimicrobianos e de virulência em *Enterococcus* spp. isolados de alimentos e de amostras clínicas, identificou a presença do gene *ace* em 61% dos isolados de *Enterococcus* spp. de origem clínica (isolados de pacientes).

No presente estudo, dos 11 espécimes de *Enterococcus* spp., foi identificada a presença de fatores de virulência em 7 isolados (63%), sendo encontrados os genes *ace* e *efaA*. Dos isolados enterocócicos, 27% (n=3) apresentaram positividade para o gene *ace* e 63% (n=7) para o gene *efaA*. Em 3 isolados foram identificados ambos os genes. O perfil de virulência do estudo, para os genes citados, está similar ao dos estudos encontrados: a presença do gene *ace*

é menor quando comparado ao gene *efaA*, em amostras de *Enterococcus* spp. provenientes de amostras clínicas e/ou alimentos.

Em relação à identificação de espécies, dos 3 isolados identificados com o gene *ace*, 67% (n=2) dos isolados são *Enterococcus* spp. e em 33% dos isolados (n=1) continham cepas de *E. faecium* e *E. faecalis*. Dos 7 isolados identificados com o gene *efaA*, 42% dos isolados (n=3) são *Enterococcus* spp., 29% dos isolados (n=2) são *E. faecalis* e 29% dos isolados (n=2) continham cepas de *E. faecalis* e *E. faecium*.

Os BLHs rotineiramente não identificam microrganismos em amostras de LHO, apenas cultivam LHP e, em caso de crescimento microbiano, realizam o descarte do leite contaminado. Um olhar mais aprofundado, aponta que a realização de uma identificação exata de bactérias que chegam em amostras de LHO torna-se requisito essencial para a detecção e compreensão de reservatórios/fontes de infecção para o ambiente hospitalar. Uma vez que os BLHs frequentemente estão dentro de unidades materno infantis e amostras de LHO podem, depender da carga microbiana, tipo de microrganismo presente e forma de manipulação, funcionar como meio de introdução microbiana e, ocorrendo isso, vetores, como funcionários, insetos e outros meios, podem disseminá-los, algo que pode contribuir de forma decisiva para ocorrência de infecções relacionadas à serviços de saúde e, impactar nas estatísticas de morbi-mortalidade infantil e custos de saúde.

Os altos percentuais encontrados no isolamento de *Enterococcus* spp. em amostras de doadoras do Banco de Leite Humano, aliado ao elevado percentual de resistência antimicrobiana encontrados (principalmente frente aos antimicrobianos tetraciclina e ciprofloxacino) e de positividade para os fatores de virulência (*ace* e *efaA*) no estudo ratifica a importância da realização de um controle rígido desde a coleta à distribuição do leite humano doado, tendo o máximo de cuidado durante o processamento para evitar a dispersão dos microrganismos. Considerando essas características, a entrada desses microrganismos em ambiente hospitalar eleva o risco de probabilidade de infecção aos pacientes internados, sobretudo aqueles com vulnerabilidade imunológica.

MATERIAL SUPLEMENTAR

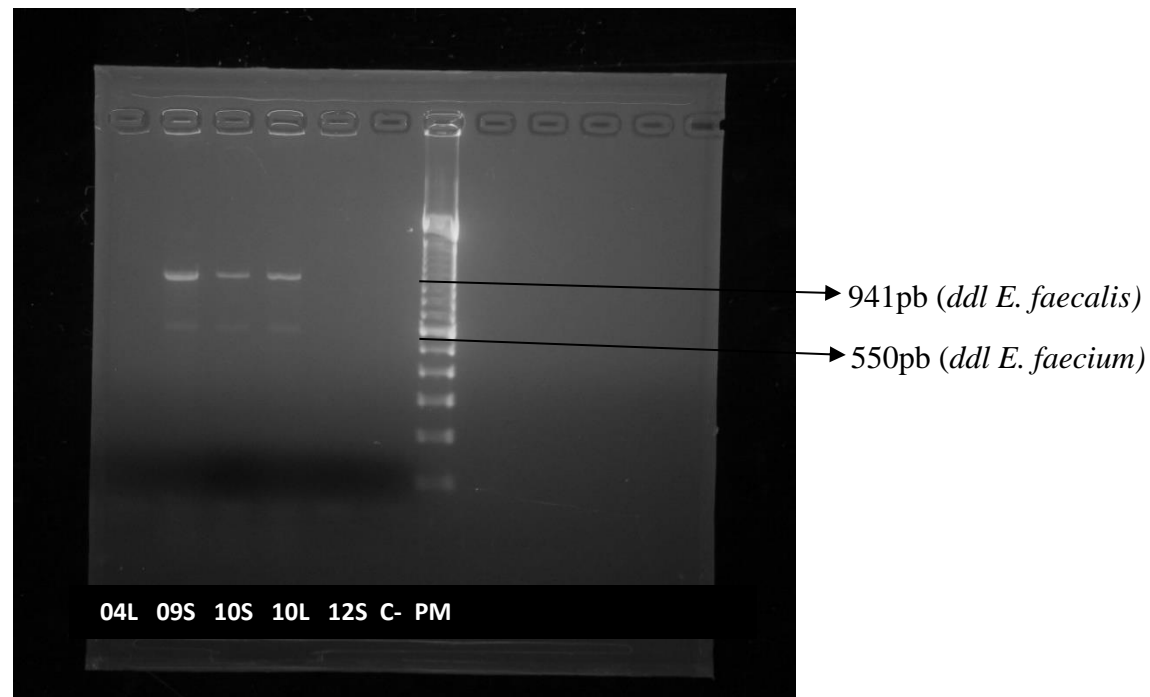


Figura 1 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação genotípica da presença dos genes constitutivos *ddl* - *ddl E.faecalis* (941pb) e *ddl E.faecium* (550pb) – para diferenciação de espécies de *Enterococcus* spp. em amostras de doadoras do Banco de Leite Materno do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista (BA), 2019. Colunas 1 a 5: amostras de Swab (S) e Leite humano cru (L). Coluna 6: Controle negativo. Coluna 7: Padrão de peso molecular – 100pb.

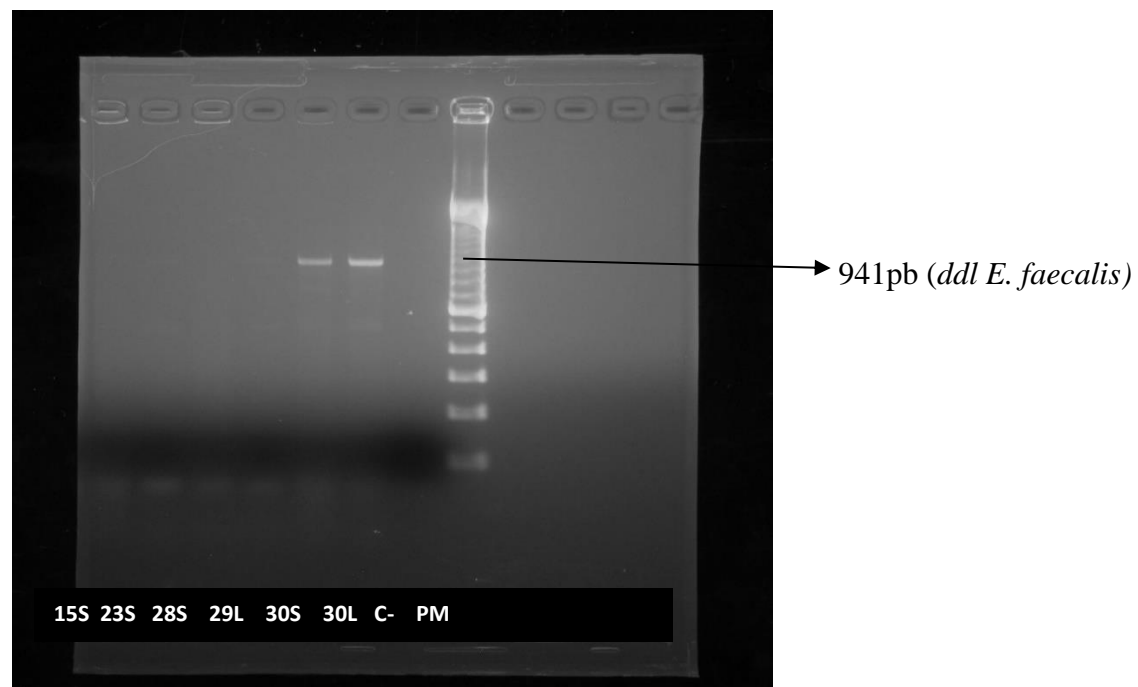


Figura 2 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação genotípica da presença dos genes constitutivos *ddl* - *ddl E.faecalis* (941pb) e *ddl E.faecium* (550pb) – para diferenciação de espécies de *Enterococcus* spp. em amostras de doadoras do Banco de Leite Materno do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista (BA), 2019. Colunas 1 a 6: amostras de Swab (S) e Leite humano cru (L). Coluna 7: Controle negativo. Coluna 8: Padrão de peso molecular – 100pb.

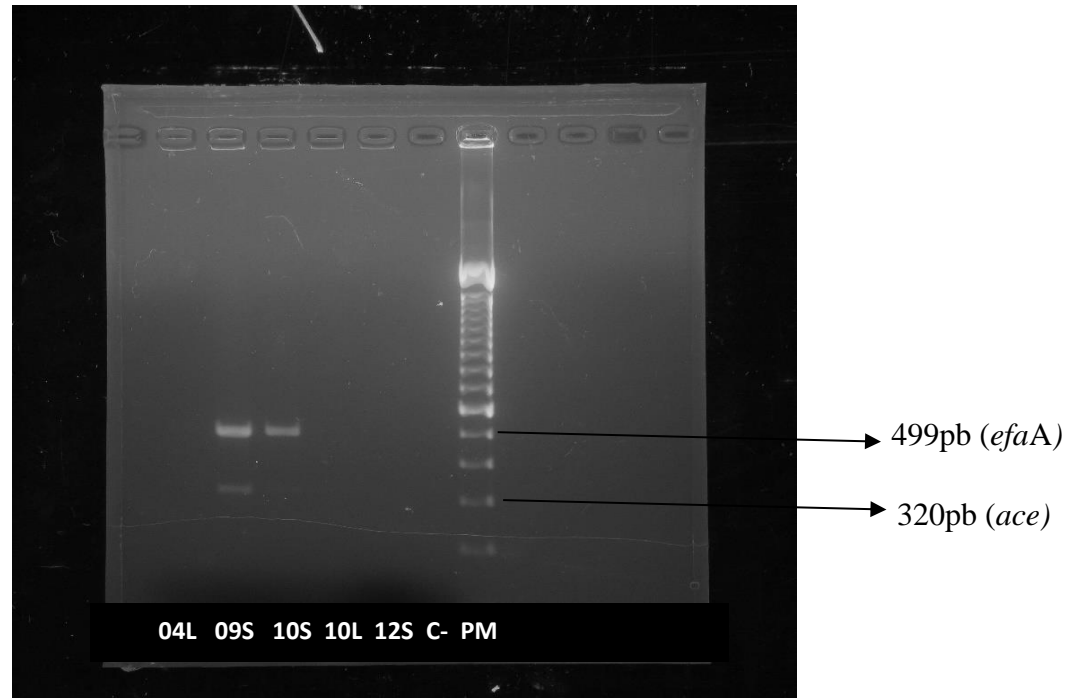


Figura 3 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação genotípica da presença dos genes os genes de virulência *ace* (320pb), *efaA* (499pb) e *gelE* (402pb) nos isolados de *Enterococcus* spp. em amostras de doadoras do Banco de Leite Materno do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista (BA), 2019. Colunas 1 a 5: amostras de Swab (S) e Leite humano cru (L). Coluna 6: Controle negativo. Coluna 7: Padrão de peso molecular – 100pb.

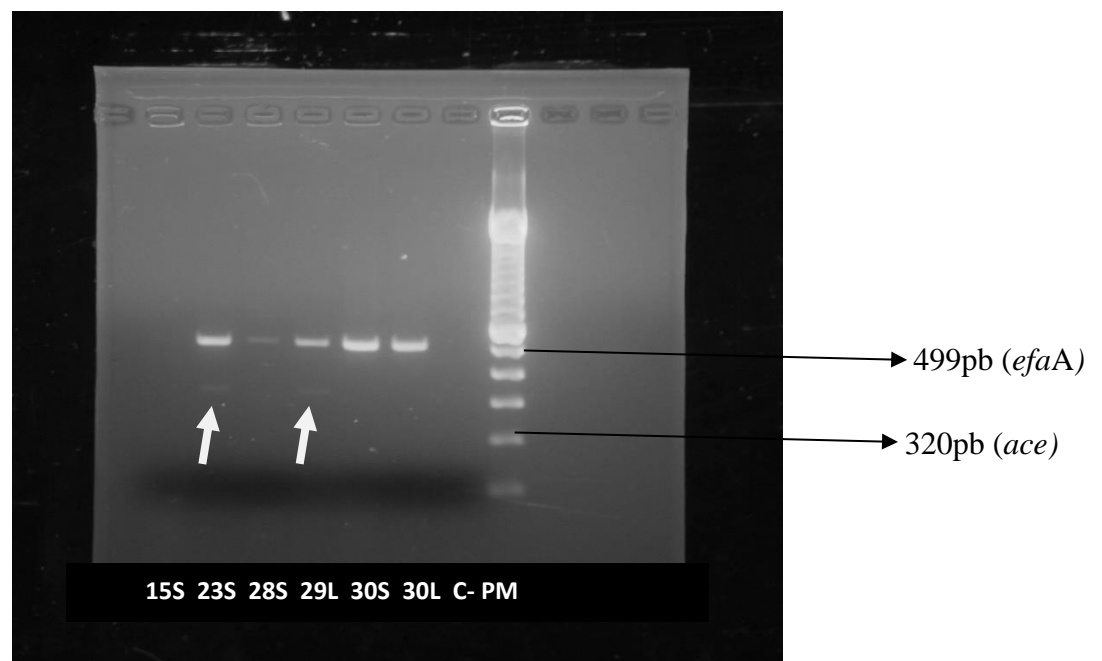


Figura 4 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação genotípica da presença dos genes os genes de virulência *ace* (320pb), *efaA* (499pb) e *gelE* (402pb) nos isolados de *Enterococcus* spp. em amostras de doadoras do Banco de Leite Materno do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista (BA), 2019. Colunas 1 a 6: amostras de Swab (S) e Leite humano cru (L). Coluna 7: Controle negativo. Coluna 8: Padrão de peso molecular – 100pb.

Referências

1. SILVA, V. A. A. L. *et al.* Maternal breastfeeding: indicators and factors associated with exclusive breastfeeding in a subnormal urban cluster assisted by the Family Health Strategy. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 643, p. 8, 2018.
2. BORGES, M. S. **Avaliação da qualidade do leite humano ordenhado**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Uberlândia, 2016.
3. EUCLIDES, M. P. Nutrição do Lactente: Base Científica para uma alimentação adequada. 2.ed. **Revista Atual**, Viçosa, p. 488, 2000.
4. BORGES, M. S. *et al.* Quality of human milk expressed in a human milk bank and at home. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 94, n.4, p. 399-403, 2018.
5. SERAFINI, A. B. *et al.* Qualidade microbiológica de leite humano obtido em banco de leite. **Rev. Saúde Pública**, v.37, n.6, p.775-9, 2003.
6. ALMEIDA, J. A. G. **Amamentação: um híbrido natureza cultura**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1999.
7. IKONEM, R. S.; MIETTINEM, A.; GROONOS, P. Bacteriological quality control in a human milk bank. **Klin Pädiatr.** v. 194, p. 295-297, 1982.
8. MURRAY, P. *et al.* **Microbiologia médica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 220-223, 2004.
9. NOVAK, F.R. *et al.* Resistência antimicrobiana de coliformes isolados de leite humano ordenhado. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n.3, p. 713-717, 2001.
10. MENEZES, G. **Avaliação dos procedimentos higiênico-sanitários utilizados durante a coleta domiciliar e o transporte do leite humano ordenhado**. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.
11. FOULQUIÉ-MORENO, M. R. *et al.* The role and application of *enterococci* in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.1-24, 2006.
12. HONER, R. *et al.* Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hosp. Universitário de Santa Maria. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.41, n.6, p. 391-395, 2005.
13. GOMES, M. B. **Caracterização de *Enterococcus* spp. isolados de alimentos quanto à presença de genes de virulência**. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.
14. EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.4, p. 1628-1635, 2001.

15. FACKLAM, R. R.; SAHM, M. D.; TEIXEIRA, L. M. In: Murray, B. E.; et. al. **Enterococcus. Manual of Clinical Microbiology**, 7 ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, p. 297-305, 1999.
16. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. 5. ed., v. 1, p. 59-73. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.
17. FRACALANZZA, S. A.P. **Identificação, resistência a antimicrobianos e caracterização molecular de *Enterococcus* isolados de alimentos**. Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007.
18. VALENZUELA, A.S. *et al.* Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: Antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. **Food Microbiology**, v. 27, p. 955-961, 2010.
19. CLSI. M100-S26: Performance Standards for Antimicrobial Suscetibility Testing. USA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 27 ed., 2017.
20. DUTKA-MALEN, S.; EVERS, S.; COURVALIN, P. Detection of Glycopeptide Resistance Genotypes and Identification to the Species Level of Clinically Relevant Enterococci by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 24-27, 1995.
21. AMIN, N. E.; JALAL, S.; WRETLIND, B. Alterations in GyrA and ParC Associated with Fluoroquinolone Resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, n.4, p. 947-949, 1999.
22. BRISSE, S. *et al.* Association of Alterations in ParC and GyrA Proteins with Resistance of Clinical Isolates of *Enterococcus faecium* to Nine Different Fluoroquinolones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, n. 10, p. 2513-2516,1999.
23. MANNU, L. *et al.* Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 291-304, 2003.
24. VANKERCKHOVEN, V. *et al.* Development of a multiplex PCR for the detection of *asaI*, *gelE*, *cylA* and *hyl* genes in Enterococci and survey for virulence determinants among European Hospital isolates of *Enterococcus faecium*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 42, n.10, p. 4473-4479, 2004.
25. SHANKAR, V. *et al.* Infection-Derived *Enterococcus faecalis* Strains Are Enriched in *esp*, a Gene Encoding a Novel Surface Protein. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 193-200, 1999.
26. VANCANNEYT, M. *et al.* Intraspecies genomic group in *Enterococcus faecium* in their correlation with origin and pathogenicity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1381-1391, 2002.
27. BONFIM, V. S. **Perfil lipídico do concentrado com liofilizado de leite humano para amamentação de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

28. MARTIN, R. *et al.* Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. **The Journal of Pediatrics**. v. 143, p. 754-758, 2003.
29. MARTIN, R. *et al.* Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. **Research in Microbiology**. v. 158, p. 31-37, 2007.
30. ARAÚJO, L. P. P. *et al.* Análise de Coliformes em Leite Humano Ordenhado. **Interagir: pensando a extensão**, Rio de Janeiro, n. 15, p. 29-34, 2010.
31. SILVEIRA, L. A. M. *et al.* Controle Microbiológico do Leite Humano Universitário. **Rev. baiana saúde pública**, v.36, p.3, 2012.
32. SILVA, Q. S. **Detecção e identificação de genes de resistência aos antimicrobianos e de virulência em *Enterococcus* spp. isolados de alimentos e de amostras clínicas.** Tese (Doutorado em Microbiologia), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2016.
33. COELHO, M. R. **Caracterização de cepas hospitalares de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE): suscetibilidade a antimicrobianos e fatores de virulência.** Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.
34. OLIVEIRA, P. S. *et al.* Isolation, pathogenicity and disinfection of *Staphylococcus aureus* carried by insects in two public hospitals of Vitória da Conquista, Bahia, Brazil. **Braz J Infect Dis**. v. 8, n.2, p. 129–136, 2014.
35. FURTADO, M. A. M. *et al.* Análise de Coliformes em Leite Humano Ordenhado. **Interagir: pensando a extensão**, Rio de Janeiro, n. 15, p. 29-34, 2010.
36. SACRAMENTO, A. G. **Caracterização molecular de *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina em amostras clínicas, ambientes aquáticos e alimentos.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
37. KIMBERLY A. K. *et al.* Biofilm-associated infection by enterococci. **Nature Reviews Microbiology**. v.17, p. 82-94, 2019.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Detectou-se a presença de *Enterococcus* spp. em amostras de swab único (mãos e região mamilo-areolar de doadoras) e leite humano ordenhado cru obtidos no BLH do Hospital Municipal Esaú Matos. A análise do leite humano ordenhado mostrou que este pode servir como reservatório para *Enterococcus* spp., incluindo cepas com os genes que codificam os fatores de virulências *ace* e *efaA*, associados à formação de biofilme enterocócicos, aumentando o risco de causar infecções. As amostras de leite humano ordenhado pasteurizado estavam isentas desse microrganismo, indicando que o método de pasteurização está sendo eficaz contra essas cepas. Entretanto, foi encontrado um percentual de 38% (8 isolados das 21 amostras de leite pasteurizado analisadas) com outras bactérias de não interesse no estudo.

Na análise fenotípica de resistência aos antimicrobianos, dos isolados de *Enterococcus* spp., pelo teste de antibiograma por disco difusão, mostrou que de forma geral os isolados foram sensíveis aos antimicrobianos ampicilina, linezolida e vancomicina e tiveram perfis de resistência aos antimicrobianos tetraciclina, ciprofloxacino, norfloxacino, levofloxacino, nitrofurantoína e penicilina. Mesmo apresentando resistência aos antimicrobianos quinolônicos, não foram detectados os genes de resistências *gyrA* e *parC*, através das reações de PCR realizadas. Esse fato pode ser associado a interferentes como diferenças de pH do meio Muller Hinton, temperatura do meio, densidade do inóculo, entre outros.

A detecção de fatores de virulência foi avaliada por PCR e os genes *efaA* e *ace* foram encontrados em 63% e 27% dos isolados, respectivamente. Esses fatores de virulência estão associados à formação de biofilmes enterocócicos e endocardites, dificultando assim para o tratamento das infecções.

Considerando que grande parte dos recém-nascidos prematuros são encaminhados para a UTI (Unidade de Terapia Intensiva), necessitando assim de suplementação alimentar com LHO, o consumo de LHO contaminado pode levar a infecções de naturezas brandas a graves. Uma identificação exata dos patógenos bacterianos é um requisito essencial tanto para detecção de reservatórios e fontes de infecção, o monitoramento de sua distribuição, quanto para a tomada de decisões para melhoramento do controle microbiológico.

O presente estudo apresentou a responsabilidade do controle microbiológico pelo Banco de Leite Humano e a necessidade de traçar alternativas para impedir a chegada de espécies de *Enterococcus* spp. em ambiente hospitalar (dispersão de patógenos comunitários em ambiente hospitalar), possivelmente como causadores de infecções neonatais importantes que aumentam o tempo de internamento e, conseqüentemente, os custos do serviço de saúde.



APÊNDICE 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Estudo: Identificação, caracterização de resistência e patogenicidade de *Enterococcus* spp. e Enterobactérias em amostras de doadoras de Leite Humano no Banco de Leite Humano do Hospital Municipal Esau Matos em Vitória da Conquista (BA). Pesquisador Responsável: Márcio Vasconcelos Oliveira. Demais Pesquisadoras: Luana Andrade Mendes Santana e Nívea Nara Novais Andrade.

A senhora está sendo convidada a participar de uma pesquisa. Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que a senhora não consiga entender, converse com as pesquisadoras responsáveis pela pesquisa para esclarecê-los.

Em caso de prováveis participantes que não saibam ler, o Termo será lido para a mesma por uma das pesquisadoras, esclarecendo todos os passos e conteúdo presente.

A proposta deste termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) é explicar tudo sobre a pesquisa e solicitar a sua permissão para participar do mesmo.

Objetivo do Estudo

O objetivo do estudo é: Identificar espécies de bactérias *Enterococcus* spp. e de Enterobactérias (*Escherichia* spp., *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp.), por métodos laboratoriais, visando caracterizar a patogenicidade e resistência à antimicrobianos dos microrganismos isolados de amostras da região mamilo-areolar e mãos de doadoras de LHO e de alíquotas de LHO dessas doadoras no momento da ordenha e após a pasteurização, através do serviço do Banco de Leite Materno do Hospital Municipal Esau Matos em Vitória da Conquista (BA).

Duração do Estudo

A duração total do estudo é de dois anos.

A sua participação no estudo será de um dia para a coleta do material em sua residência e preenchimento de Questionário constituído em três módulos onde são abordadas perguntas fechadas em relação aos Procedimentos Maternos durante a coleta, armazenamento domiciliar de LHO e informações socioeconômicas.

Descrição do Estudo

Participarão do estudo aproximadamente 90 doadoras voluntárias cadastradas no Banco de Leite Humano do Hospital Esau Matos.

Este estudo será realizado pela Universidade Federal da Bahia, através do Programa de Pós-Graduação em Biociências.

A senhora foi escolhida a participar do estudo porque é doadora voluntária do Banco de Leite Humano e aceitou, mediante contato telefônico, receber as pesquisadoras para esclarecimentos sobre o projeto em seu domicílio.

Procedimento do Estudo

Após entender e concordar em participar a senhora deverá responder a um questionário sobre como realiza a ordenha do leite e algumas informações pessoais para que possamos obter informações importantes para analisar os resultados.

Após o preenchimento do questionário será realizada imediatamente a coleta dos materiais.

Para a coleta de amostra das mãos e região mamilo-areolar (das duas mamas), a pesquisadora estará com equipamentos de proteção individual e utilizará swab estéril. Após a coleta, as amostras serão identificadas e armazenadas imediatamente para evitar contaminações.

Após a coleta do swab será solicitado que a senhora colha uma pequena amostra da ordenha do leite (aproximadamente 2 mL) em um frasco estéril entregue pelas pesquisadoras, após isso a senhora pode seguir rotineiramente a ordenha do leite para entregar ao Banco de Leite.

As amostras serão identificadas com as iniciais da doadora, a data da coleta e o número do questionário respondido.

Também será obtida uma amostra do leite doado após o procedimento de pasteurização no Banco de Leite Humano do Hospital Esaú Matos.

As amostras serão enviadas ao Laboratório de Análises Clínicas do IMS/UFBA para a realização das análises microbiológicas, exceto a amostra de LHO pasteurizado que será coletado posteriormente no BLH.

Riscos Potenciais, Efeitos Colaterais e Desconforto

O presente estudo pode ocasionar desconforto, cansaço ou constrangimento no momento de preencher o questionário, para diminuir isso preparamos um questionário com perguntas diretas e respostas apenas de marcar. Além disso pode haver desconforto e constrangimento no momento da coleta das amostras na região dos seios, para diminuir o constrangimento essa coleta será realizada por uma pesquisadora do sexo feminino, treinada para realizar o procedimento de maneira rápida, segura e profissional. A coleta do LHO será realizada pela própria doadora, conforme procedimentos higiênico-sanitários de costume.

Benefícios para o participante

Não há benefício direto para a participante desse estudo. Todavia, os resultados obtidos com este estudo poderão ajudar a identificar microrganismos presentes nas amostras e métodos para diminuir a contaminação do leite. Tais dados serão de suma importância para a avaliação do controle microbiológico do processo de pasteurização das amostras de leite humano do Banco de Leite do Hospital Esaú Matos, bem como a qualidade do leite ofertado no setor da UTI Neonatal e identificação dos possíveis riscos potenciais aos RNs internados na unidade.

Compensação

Você não receberá nenhuma compensação para participar desta pesquisa e também não terá nenhuma despesa adicional.

Participação Voluntária/Desistência do Estudo

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, você somente participa se quiser. A não participação no estudo não implicará em nenhuma alteração para a realização da ordenha que veio realizar.

Após assinar o consentimento, você terá total liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar do estudo se assim o desejar, sem quaisquer prejuízos pessoais.

Se houver necessidade de solicitar a exclusão de sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com uma das pesquisadoras envolvidas nesse estudo por meio dos telefones (71) 99122-5390; (77) 98841-3638.

Após todos os esclarecimentos sobre a pesquisa, caso consinta em participar, assinará duas cópias deste presente termo que também será assinado por uma das pesquisadoras responsáveis, ficando você de posse com uma delas.

Utilização de Registros e Confidencialidade

Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do paciente a todo o momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifiquem serão divulgados, a menos que seja exigido por lei.

O questionário que irá conter suas identificações e esse termo de consentimento assinado poderão ser inspecionados por agências reguladoras e pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo, sua identidade não será revelada nessas apresentações.

Quem Devo Entrar em Contato em Caso de Dúvida

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os responsáveis pelo estudo nesta instituição são Luana Andrade Mendes Santana e Nívea Nara Novais Andrade que poderão ser encontrados na Universidade Federal da Bahia – Campus Anísio Teixeira ou nos respectivos telefones: (77) 99921-5390 e (77) 98841-3638.

Declaração de Consentimento

Concordo e aceito participar do estudo intitulado: “Identificação, caracterização de resistência e patogenicidade de *Enterococcus* spp. e Enterobactérias em amostras de doadoras de Leite Humano no Banco de Leite Humano do Hospital Municipal Esaú Matos em Vitória da Conquista (BA)”.

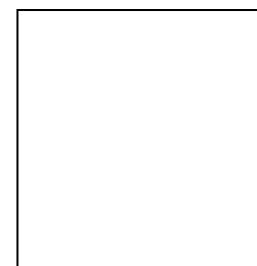
Li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Tive oportunidade de perguntar sobre o estudo e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Entendo que estou livre para decidir não participar desta pesquisa. Entendo que ao assinar este documento, não estou abdicando de nenhum de meus direitos legais.

Eu autorizo a utilização do meu questionário e dos resultados da análise das amostras colhidas para o comitê de Ética e Pesquisa e para agências reguladoras.

Nome do Voluntário

Data

Assinatura do Voluntário



Impressão Digital

Assinatura do Pesquisador Responsável

Data



APÊNDICE 2 - QUESTIONÁRIO DOS PROCEDIMENTOS MATERNOS DURANTE A COLETA E ARMAZENAMENTO DOMICILIAR DE LEITE HUMANO ORDENHADO (LHO) E INFORMAÇÕES SOCIO-ECONÔMICAS

(Adaptado do Modelo Original: MENEZES, G. Avaliação dos Procedimentos Higiênico-Sanitários utilizados durante a coleta domiciliar e o transporte do Leite Humano Ordenhado. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, 2011).

DOADORA Nº: _____

DATA: _____

BLOCO 01 – Características Socioeconômicas

1. Idade:

- de 18 a 25 anos
- de 26 – 30 anos
- acima de 30 anos

2. Estado Civil:

- Casada
- Solteira
- Divorciada
- Viúva

3. Renda Familiar Total:

- Acima de 20 salários mínimos
- De 10 a 20 salários mínimos
- De 4 a 10 salários mínimos
- De 2 a 4 salários mínimos
- Menos de dois salários mínimos

4. Número de filhos:

- () Único filho
 () Dois filhos
 () Três filhos
 () Mais de três filhos

5. Escolaridade:

- () Analfabeto/ até a 3ª Série Fundamental
 () 4ª Série Fundamental
 () Fundamental Completo
 () Médio Completo ou profissionalizante
 () Superior Completo

BLOCO 02 – Práticas higiênicas utilizadas na coleta:

Para responder as perguntas abaixo assinale a coluna com a frequência de realização do procedimento durante as coletas de leite para o Banco de Leite.

Assinale SEMPRE para os procedimentos que realiza em todas as coletas, assinale ÀS VEZES para os procedimentos que realiza em algumas coletas e NUNCA para os procedimentos que não são adotados para a coleta.

PROCEDIMENTO	SEMPRE	ÀS VEZES	NUNCA
Lavar as mãos com água e sabão ou utilização de álcool antes da coleta			
Verificar o tamanho das unhas e cortar, se necessário, antes da coleta.			
Prender os cabelos com auxílio de touca antes da coleta.			
Lavar o seio com água potável antes da coleta.			
Utilizar máscara descartável durante a coleta.			

Evitar conversar durante a coleta.			
Desprezar o primeiro jato de leite no início da coleta.			

BLOCO 03: Materiais e utensílios utilizados para ordenha:

01 - Para a coleta do leite qual frasco você utiliza?

- Frasco esterilizado fornecido pelo Banco de Leite Humano
 Outro utensílio de uso domiciliar (Qual: _____)

02 - Se o utensílio for de uso domiciliar, antes da utilização você realiza lavagem e fervura em água por 15 min?

- Sim Não

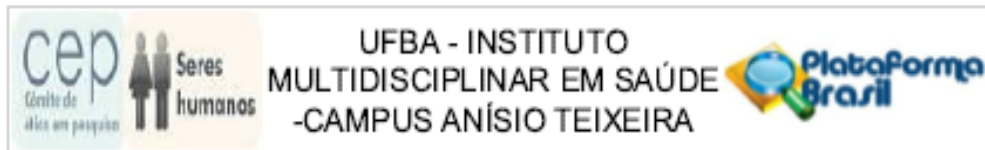
03 – Você utiliza hipoclorito (água sanitária) para desinfetar o utensílio utilizado?

- Sim Não

04 – Após a coleta como você armazena o leite imediatamente em geladeira?

- Sim Não

ANEXO 1 – PARECER DE APROVAÇÃO DO PROJETO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS NO INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE (IMS/UFBA)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação, caracterização de resistência e patogenicidade de *Enterococcus* spp. e Enterobactérias em amostras de doadoras do Banco de Leite Humano do Hospital Municipal Esau Matos em Vitória da Conquista (BA).

Pesquisador: Márcio Vasconcelos Oliveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 80800717.8.0000.5556

Instituição Proponente: Instituto Multidisciplinar em Saúde-Campus Anísio Teixeira

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.475.023

Apresentação do Projeto:

O projeto intitulado "Identificação, caracterização de resistência e patogenicidade de *Enterococcus* spp. e Enterobactérias em amostras de doadoras do Banco de Leite Humano do Hospital Municipal Esau Matos em Vitória da Conquista (BA)" possui um pesquisador principal e duas assistentes. Trata-se de um estudo de corte transversal com doadoras regulares de leite humano cadastradas nesse Banco de Leite Humano.

As altas taxas de infecções hospitalares entre recém-nascidos são uma grande preocupação na área de saúde, pois fatores críticos mostraram estar associados com este problema, incluindo os alimentos, como o leite humano.

Estudos comprovam que o leite humano é uma fonte de micro-organismos para a colonização inicial da microbiota do recém-nascido que são frequentemente encontradas do mamilo, auréola e tecidos adjacentes, bem como dutos lactíferos. Embora a pasteurização do leite humano ordenhado (LHO) seja um processo adequado para desinfecção, cepas bacterianas podem se apresentar viáveis no LHO a ser consumido por RNs, que em sua maioria estão na UTI, são prematuros e altamente vulneráveis, o que pode levar às infecções bacterianas brandas à graves.

Deste modo, micro-organismos pertencentes ao gênero *Enterococcus* e espécies de bactérias da família Enterobacteriaceae como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. podem colonizar principalmente o trato gastrointestinal de doadoras de LHO saudáveis e contaminar o

Endereço: RIO DE CONTAS, 58 Qd. 17, Lote 58
Bairro: CANDEIAS **CEP:** 45.029-094
UF: BA **Município:** VITORIA DA CONQUISTA
Telefone: (77)3429-2720 **E-mail:** ospims@ufba.br

**ANEXO 2 – TERMO DE ANUÊNCIA DA COMISSÃO DE ENSINO EM PESQUISA –
HOSPITAL ESAÚ MATOS - VITÓRIA DA CONQUISTA**



Vitória da Conquista, 17 de Agosto de 2017.

Ofício - Def. 070/ 2017 – CEPE

Da: Comissão de Ensino, Pesquisa e Extensão – FSVC.

Att: Sr. Prof. Márcio Vasconcelos de Oliveira

Cumprimentando-o cordialmente, e em resposta à solicitação para realização de coleta de dados na Fundação Pública de Saúde de Vitória da Conquista, por meio do orientador do mestrado de Biociências do Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia – UFBA, Sr. Prof. Márcio Vasconcelos de Oliveira, com a finalidade de integração de dados para a pesquisa intitulada “IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DE RESISTÊNCIA E PATOGENICIDADE DE ENTEROCOCCUS SSP. E ENTEROBACTÉRIAS EM AMOSTRAS DE DOADORAS DO BANCO DE LEITE HUMANO DO HOSPITAL MUNICIPAL ESAÚ MATOS EM VITÓRIA DA CONQUISTA (BA).” Tal solicitação encontra-se **DEFERIDA** pela Comissão de Ensino, Pesquisa e Extensão da Fundação Pública de Saúde de Vitória da Conquista.

Atenciosamente,


Sr. Stênio Fernando Pimentel Duarte,
Presidente do CEPE