LUCIANA ALLEGRETTI FRAZÃO

Estudo comparativo de métodos bioquímicos, perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e método molecular para a caracterização fenotípica e genotípica de bactérias ácido-láticas isoladas da microbiota fecal de Papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) no Brasil

São Paulo
2014

LUCIANA ALLEGRETTI FRAZÃO

Estudo comparativo de métodos bioquímicos, perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e método molecular para a caracterização fenotípica e genotípica de bactérias ácido-láticas isoladas da microbiota fecal de Papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) no Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:
Patologia

Área de concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientador:
Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira

São Paulo
2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2933
FMVZ

Allegretti Frazão, Luciana

Estudo comparativo de métodos bioquímicos, perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e método molecular para a caracterização fenotípica e genotípica de bactérias ácido-láticas isoladas da microbiota fecal de Papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) no Brasil / Luciana Allegretti Frazão. -- 2014.
103 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira.

1. Papagaio-verdadeiro. 2. Bactérias ácido-láticas. 3. Bioquímico convencional. 4. Bioquímico automatizado. 5. Susceptibilidade aos antimicrobianos. 6. Sequenciamento genético. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Isolamento e identificação de *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp, *Enterococcus* spp da microbiota intestinal de Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*)", protocolado sob o nº1221/2007, utilizando 20 (vinte) papagaios-verdadeiros, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 21/11/07.

We certify that the Research "Isolation and identification of *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp, *enterococcus* spp of the intestinal microbiota of the Blue-Fronted Amazon Parrot (*Amazona aestiva*)", protocol number 1221/2007, utilizing 20 (twenty) parrots, under the responsibility Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/21/07.

São Paulo, 22 de novembro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FRAZÃO ALLEGRETTI, Luciana

Título: Estudo comparativo de métodos bioquímicos, perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e método molecular para a caracterização fenotípica e genotípica de bactérias ácido-láticas isoladas da microbiota fecal de Papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) no Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as aves, em especial ao Joca, Bebê, Bartô, Sam e Sansão, que me inspiram todas as manhãs e me permitem voar para alcançar os meus objetivos.

À minha família, minha base, meu porto-seguro. Mãe, Pai (*in memoriam*), Caê, Gu e Cazé, sem o amor de vocês a minha vida não haveria sentido.

AGRADECIMENTOS

Após oito anos de FMVZ-USP, mais uma etapa está chegando ao final na minha vida. É normal e esperado que ao final de um doutoramento muitos sentimentos estejam envolvidos, e comigo não poderia ser diferente. Durante todos esses anos eu tive a oportunidade de conhecer pessoas incríveis, as quais me proporcionaram não somente um amadurecimento científico como também crescimento pessoal. A todos vocês que simplesmente me fizeram sorrir e passaram de alguma forma pelo meu caminho, deixo registrado aqui a minha sincera gratidão.

Agradeço ao meu orientador, Prof Dr. Antonio José Piantino Ferreira, pelos ensinamentos, pelas risadas, pelas broncas construtivas e por todos esses anos de companheirismo.

A Profa Claudete S. A. Ferreira por tanto carinho e atenção sempre demonstrados com todos. Você, com todo respeito, é com certeza a nossa mãe no laboratório.

A você Liliana Revolledo, não tenho palavras. O meu muito obrigada sempre será pouco. Tenho uma profunda admiração por você.

Ao amigo Jorge L. Chacón Villanueva pela amizade e pelas infinitas ajudas no mundo molecular.

Agradeço a Profa Dra. Marina B. Martinez do Hospital Universitário e FCF – USP por ter concedido o uso do aparelho Vitek 2; e as técnicas Silvia e Cristiane por terem me auxiliado com as amostras.

A Elza da Biblioteca da FMVZ-USP pela rapidez e agilidade nas correções da minha tese.

A Marta Brito Guimarães por toda amizade, pelos conselhos, por sempre se preocupar e me guiar na vida da melhor possível. O meu muito obrigada de coração!

A Profa Terezinha Knobl pela ajuda e amizade.

Aos amigos mais queridos, Natália Philadelpho, Yamê Davies, Marcos Paulo V. de Cunha, Luís Nuñez Naranjo, Silvana Santander, Dennis Zannato, Claudia Carranza, Marcia Cristina Menão, Renata Hurtado, Juliana Sinhorini, Vanessa Vertematti, Joelma Moura Alvarez,

Carla Limone, Claudia Niemeyer, Camila Peloso, Luciana S. Sacanavini, Marcos A. Elmer Lopes, Gabriele Bin, Maria Eugenia Moraes, Lilian A. Sanches, Livia Queiroz, Andyara Lena, André Saidenberg, Lidiane M. Martins e Antonio Carlos Pedroso. Agradeço a todos por terem caminhado junto comigo, em algum período, durante essa jornada.

Agradeço a todos os funcionários envolvidos direta ou indiretamente, Maurício, Livia, Hermes, Rosinha, Guimarães, Luiz, Lúcio, Garcia e Santos.

Agradeço a UNIP pela formação acadêmica, a USP pela formação científica e a CAPES pelo suporte financeiro que viabilizou este estudo.

Ao Enio Bovino, Luiz Felipe Scabar, Cristiano Baldan, Elcio Giovani, Paschoal Armonia, Vicente Borelli, Aldo Neto, Caio Biasi, Rodrigo Prazeres e João Paulo Boccia pela amizade, companheirismo, e por tornarem meus dias de trabalho tão mais agradáveis.

Agradeço ao Prof Dr. David Janz pela oportunidade de ter conhecido a University of Saskatchewan, pela compreensão durante a confecção da minha tese e pelo convívio.

Agradeço a Lucy por todos os ensinamentos, pelo acolhimento e carinho durante estes 5 meses na University of Saskatchewan.

Agradeço a todos os amigos que conheci durante a minha jornada em Saskatoon, Aricia, João, Carol, Mariana, Michelly, Sofia, Tabata, Carla, Veronica, Poliana, Tullio, Anderson, Thiago, Yan, Sarah, Jake, Jith, Cloe, Anita, Landon, Stephanie e Eric. Mas meu agradecimento especial a Renata Giacomini e ao Matheus Costa, por todas as mensagens, gargalhadas, carinho, força, auxílios com a tese, por terem sido a minha família nestes meses... Enfim, sem vocês em Saskatoon, essa jornada não deixaria memórias tão doces quanto deixará. Sentirei saudades. Obrigada de coração!

RESUMO

FRAZÃO ALLEGRETTI, L. **Estudo comparativo de métodos bioquímicos, perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e método molecular para a caracterização fenotípica e genotípica de bactérias ácido-láticas isoladas da microbiota fecal de Papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) no Brasil.** [Comparative study of biochemical tests, microbial susceptibility profiling and molecular methods for phenotypic and genotypic characterization of acid-lactic bacteria isolated from fecal microbiota of Blue-fronted Amazon Parrots (*Amazona aestiva*) from Brazil]. 2014. 103 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2014.

A microbiota do trato gastrointestinal dos psitacídeos é composta por bactérias Gram-positivas, entre elas as bactérias ácido lácticas. Porém, há poucos estudos na literatura descrevendo a microbiota do trato gastrointestinal dessas aves. O objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar fenotipicamente e genotipicamente, por três diferentes métodos, as bactérias ácido lácticas isoladas da microbiota fecal de papagaios verdadeiros. Um total de 80 amostras bacterianas foram estudadas, sendo que 31 amostras eram provenientes da microbiota fecal de papagaios-verdadeiros de vida livre e 49 amostras eram de papagaios-verdadeiros de cativeiro. Foram realizadas provas bioquímicas convencionais, automatizadas (Vitek 2) e o sequenciamento completo do gene 16S rRNA e realizada a análise comparativa dos resultados. Das 80 amostras analisadas, em 40 (50%) destas foram identificadas as espécies, pois apresentaram concordância de identificação em pelo menos dois métodos, e as demais 40 amostras (50%) não apresentaram concordância entre os testes, não sendo possível definir a espécie. As espécies identificadas foram: *Enterococcus avium* (02 amostras), *Enterococcus faecium* (03 amostras), *Enterococcus faecalis* (15 amostras), *Enterococcus hirae* (15 amostras), *Lactococcus lactis* (02 amostras) e *Staphylococcus warneri* (02 amostras). Dentre as amostras identificadas, sete (07) amostras apresentaram concordância no resultado nas três técnicas analisadas, trinta e uma (31) amostras apresentaram concordância pelo bioquímico automatizado e pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, e apenas duas (02) amostras apresentaram concordância pelo bioquímico convencional e pelo sequenciamento de DNA. A similaridade de utilização de substratos pelas cepas foi definida em treze (13) amostras, nas demais amostras estudadas houve uma

diferença no consumo de substratos nas provas bioquímicas. O perfil de resistência a antimicrobianos evidenciou resistência em onze (11) amostras, quatro (04) a benzilpenicilina, quatro (04) a eritromicina, duas (02) a gentamicina e uma (01) a estreptomicina. A análise filogenética baseada no coeficiente de *Neighbor-Join* para comparar a similaridade entre as sequências geradas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, mostrou uma tendência de agrupamento bacteriano de acordo com o local de onde as aves eram provenientes. Verificou-se que a identificação através do teste bioquímico convencional apresentou resultados inconsistentes quando comparados com o teste bioquímico automatizado e com o sequenciamento de DNA. Por sua vez, a técnica do sequenciamento genético demonstrou uma elevada confiabilidade nos resultados obtidos; sugerindo-se a utilização deste como teste de eleição e também como teste complementar as provas bioquímicas, para assim diminuir a probabilidade de erro de identificação bacteriana de bactérias ácido lácticas em papagaios.

Palavras-chave: Papagaio-verdadeiro. Bactérias ácido lácticas. Bioquímico convencional. Bioquímico automatizado. Susceptibilidade aos antimicrobianos. Sequenciamento genético.

ABSTRACT

FRAZÃO ALLEGRETTI, L. **Comparative study of biochemical tests, microbial susceptibility profiling and molecular method for phenotypic and genotypic characterization of acid-lactic bacteria isolated from fecal microbiota of Blue-fronted Amazon Parrots (*Amazona aestiva*) from Brazil.** [Estudo comparativo de métodos bioquímicos, perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e método molecular para a caracterização fenotípica e genotípica de bactérias ácido-láticas isoladas da microbiota fecal de Papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) no Brasil]. 2014. 103 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2014.

Gastrointestinal microbiota of psittacines mainly consists largely of Gram-positive bacteria, including acid-lactic bacteria. However, the literature presents very few reports on profiling the gastrointestinal microbiota of these birds. The aim of this study was to identify and to characterize phenotypically and genotypically acid-lactic bacteria isolated from fecal microbiota of Blue-fronted Amazon Parrots. For such, three different methods were used on eighty bacterial strains. Thirty-one fecal samples were collected from free-living Blue-fronted Amazon Parrots, while forty-nine were from captive birds. Traditional biochemical tests, automated biochemical test (Vitek 2) and complete gene sequencing of 16S rRNA were performed. Results of these three methods were compared. Forty samples (50%) had agreement between at least two of the three methods, and bacterial species identification was confirmed, while strains from the remaining 40 samples were not identified, once agreement between at least two methods was not found. The species identified were: *Enterococcus avium* (02 samples), *Enterococcus faecium* (03 samples), *Enterococcus faecalis* (15 samples), *Enterococcus hirae* (15 samples), *Lactococcus lactis* (02 samples) and *Staphylococcus warneri* (02 samples). Agreement between the three methods was observed in seven samples. Thirty-one samples presented agreement between automated biochemical tests and sequencing of the 16S rRNA gene. Only two samples presented agreement between traditional biochemical tests and gene sequencing. Similarities of substrate consumed by strains in both traditional and automated biochemical tests were observed in thirteen samples, while the other samples presented some difference in substrates utilization. Antimicrobial resistance profile showed that eleven samples were resistant to some antibiotic. Four were

resistant to benzilpenicilin, four to erythromycin, two to gentamicin and one to estreptomycin. The phylogenetic test based on *Neighbor-Join* coefficient, which compares the similarity between 16S rRNA sequences, showed a trend for grouping of strains according to the geographical origin of each bird. However, species identification using traditional biochemical tests showed to be inconsistent when compared to automated biochemical tests and gene sequencing results. On the other hand, genetic sequencing technique results showed to be highly reliable. Thus, this method should be used both as gold standard and as complementary to the biochemical tests for acid-latic bacteria identification in Blue-fronted Amazon Parrots gastrointestinal microbiota.

Keywords: Blue-fronted Amazon Parrot. Acid-latic bactéria. Traditional biochemical test. Automated biochemical test. Antimicrobial resistance. Gene sequencing.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	O PAPAGAIO VERDADEIRO: O TRATO GASTROINTESTINAL E SUA MICROBIOTA.....	16
2.2	GÊNERO <i>Lactobacillus</i>	19
2.3	GÊNERO <i>Enterococcus</i>	20
2.4	GÊNERO <i>Lactococcus</i>	22
2.5	GÊNERO <i>Pediococcus</i>	24
2.6	RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS.....	25
2.7	PROVAS BIOQUÍMICAS E MOLECULARES PARA A DETERMINAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS.....	26
3	OBJETIVOS	31
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1	ORIGEM DAS AMOSTRAS DE PAPAGAIO-VERDADEIRO (<i>Amazona aestiva</i>)	32
4.2.1	Amostras bacterianas	32
4.2.2	Extração do DNA bacteriano	33
4.2.3	Reagentes de extração.....	33
4.2.4	Protocolo de extração.....	34
4.2.5	Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	35
4.2.6	Deteção do Produto Amplificado.....	36
4.2.8	Caracterização Bioquímica das Amostras Bacterianas	38
4.2.8.2	Caracterização Bioquímica Automatizada	39
4.2.9	Perfil de Susceptibilidade a Antimicrobianos das Amostras Bacterianas Estudadas.....	39
5	RESULTADOS	43
5.1	IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA PELO MÉTODO DE ANÁLISE BIOQUÍMICA AUTOMATIZADA (Vitek 2).....	43
5.2	IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA PELO MÉTODO DE ANÁLISE BIOQUÍMICA CONVENCIONAL	43

5.3	IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA PELO MÉTODO DE SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO GENE 16S rRNA	44
5.5	ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS RESULTADOS E OS SUBSTRATOS DAS PROVAS BIOQUÍMICAS OBTIDOS PELOS MÉTODOS DE ANÁLISE BIOQUÍMICA AUTOMATIZADA PELO SISTEMA VITEK 2 E DE ANÁLISE BIOQUÍMICA CONVENCIONAL DE AMOSTRAS BACTERIANAS ESTUDADAS	54
5.6	ANÁLISE DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS MEDICAMENTOS ANTIMICROBIANOS DE AMOSTRAS BACTERIANAS ESTUDADAS REALIZADA PELO APARELHO VITEK 2.....	59
5.7	ANÁLISE DA ÁRVORE FILOGENÉTICA	62
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS	73
	APÊNDICE	91

1 INTRODUÇÃO

O papagaio *Amazona aestiva* também chamado popularmente de papagaio-verdadeiro é um dos psitacídeos mais populares no Brasil. O trato gastrointestinal dessas aves possui algumas particularidades na sua anatomia e fisiologia.

A anatomia do trato gastrointestinal destas aves é composta por: orofaringe, esôfago, ingluvío, estômago, duodeno, jejuno, ílio, cólon, reto e cloaca. Os nutrientes são absorvidos em sua maioria no intestino delgado, enquanto no intestino grosso é onde acontece a fermentação bacteriana.

A microbiota intestinal dos psitacídeos é composta principalmente por bactérias Gram-positivas, e dentre elas pelas bactérias ácido lácticas (BAL), como os *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Pediococcus*.

Lactobacillus são bacilos ou cocobacilos presentes na microbiota do trato gastrointestinal de humanos e animais, nas plantas e nos alimentos. Não são patogênicos e são reconhecidos pelo seu potencial probiótico. Portanto, são comumente adicionados nos alimentos de humanos e animais. Algumas espécies de *Lactobacillus* já foram descritas como potenciais carreadores de genes de resistência aos medicamentos antimicrobianos (SALMINEN; WRIGHT, 1998).

Enterococcus podem ser encontrados em diferentes locais, devido a sua facilidade de adaptação a uma grande diversidade de ambientes. Espécies pertencentes a este gênero foram reclassificadas através da utilização de técnicas moleculares, como por exemplo, pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. *Enterococcus faecium* e o *Enterococcus faecalis* são as espécies mais relatadas por apresentarem resistência bacteriana, principalmente relacionada ao antibiótico vancomicina.

Pediococcus não são considerados patogênicos e podem ser encontrados na microbiota intestinal de animais e nas plantas. São frequentemente utilizados como fermentadores de vegetais, alimentos e bebidas. Isolados de *Pediococcus* presentes nos alimentos também já foram correlacionados com a resistência a antimicrobianos (HAAKENSEN et al., 2009; HAAKENSEN; VICKERS; ZIOLA, 2009).

Lactococcus estão presentes na microbiota de plantas, animais e humanos, porém são bastante descritos em produtos lácteos. Elliott e Facklam (1996)

relataram resistência bacteriana a clindamicina, penicilina e cefalotina. No entanto, cepas vancomicina resistentes são menos relatadas neste gênero, quando comparadas aos *Enterococcus*. *Lactococcus* podem ser frequentemente confundidos com *Enterococcus*, devido a sua grande similaridade fisiológica com este gênero. No entanto, com o auxílio de novas técnicas moleculares este gênero tem sido identificado com uma maior facilidade.

Com o auxílio de uma variedade de métodos bioquímicos e/ou moleculares, muitos gêneros e espécies bacterianas estão sendo reclassificadas. A probabilidade de identificação correta aumenta quando são utilizadas provas bioquímicas associadas à moleculares (KIM et al., 2008; RUOFF, 2011). Tradicionalmente, as bactérias eram identificadas através de provas bioquímicas convencionais, onde os substratos eram preparados manualmente. Atualmente, estão disponíveis no mercado sistemas de identificação fenotípica automatizados. Esta metodologia é capaz de avaliar uma grande quantidade de substratos em um período de tempo menor do que a identificação tradicional. Entretanto, há relatos na literatura descrevendo problemas com esse tipo de identificação (BECKER et al., 2004; BOSSHARD et al., 2004; CLARRIDGE III; 2004; KIM et al.; 2008; BECKER; EIFF, 2011). Com o avanço das técnicas moleculares, estudos descreveram uma identificação bacteriana confiável com a utilização do sequenciamento do gene 16S rRNA. Bactérias não cultiváveis da microbiota intestinal passaram a ser identificadas através de metodologias moleculares (TRINGE; HUGENHOLTZ, 2008; CLAEISSON et al., 2010; CAPORASO et al., 2011; MIZRAHI-MAN; DAVENPORT; GILAD, 2013).

Nesse contexto e em consequência da dificuldade de identificação de algumas colônias de bactérias ácido lácticas da microbiota fecal de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*), no qual considerando também que existe uma quantidade escassa de relatos na literatura, este trabalho teve como objetivo identificar bactérias ácido lácticas isoladas da microbiota fecal de papagaios-verdadeiros.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O PAPAGAIO VERDADEIRO: O TRATO GASTROINTESTINAL E SUA MICROBIOTA

O papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) também conhecido como papagaio-comum ou papagaio-de-frente-azul, mede cerca de 38 cm de comprimento e pesa em torno de 400 gramas, possui a parte dorsal e a ventral verdes, penas azuis na região superior ao bico e amarelas em torno da face. A distribuição e a intensidade da coloração das penas podem variar de acordo com a localização geográfica que a ave habita. A cor da íris dos adultos é amarelo-alaranjada e dos jovens marrom. É comumente encontrado em beira de rios, cerrados e em mata úmida ou seca da Bolívia, Paraguai, Argentina e do Brasil (SICK, 1997). Essas aves não estão ameaçadas de extinção, são classificadas como CITES II, ou seja, são abundantes em alguns locais e em outros é pouco frequente, decorrente a destruição do meio ambiente, ao contrabando e ao comércio ilegal. Os papagaios-verdadeiros também são muito procurados como animais de estimação por serem dóceis, belos, inteligentes e possuírem a capacidade de fala (COLLAR, 1997; SICK, 1997; IUCN RED LIST CATEGORY; 2009).

A anatomia e a fisiologia do trato gastrointestinal dos psitacídeos podem variar um pouco das outras aves. Estudos sobre a fisiologia do trato digestório das galinhas colaboraram para um melhor entendimento da motilidade, liberação de enzimas gástricas e os mecanismos de absorção dos alimentos das aves de companhia (LANGLÓIS, 2003). As principais funções do trato gastrointestinal são realizar a digestão dos alimentos e extrair energia para o organismo (HIRD, 2013). A anatomia do sistema digestório dos psitacídeos consiste nas seguintes porções: orofaringe, esôfago, ingluvío, estômago, duodeno, jejuno, ílio, cólon, reto e cloaca (SCHMIDT; REAVILL; PHALEN, 2008; DONELEY, 2010).

As aves não possuem palato mole, e o palato duro é dividido por uma estrutura chamada coana, a qual conecta a cavidade oral com a cavidade nasal. O formato da língua também irá variar de acordo com o alimento da ave. Os psitacídeos possuem

uma língua grossa, redonda e rica em papilas gustativas (SCHMIDT; REAVILL; PHALEN, 2008; DONELEY, 2010). O esôfago é dividido em esôfago cervical, ingluvío e esôfago torácico. O esôfago cervical e torácico é revestido por epitélio escamoso estratificado, o qual possui a característica de produzir muco, auxiliando no início da digestão dos alimentos. Nem todas as aves possuem ingluvío, no entanto os psitacídeos, em geral, possuem. O ingluvío é uma dilatação do esôfago, onde não há produção de muco, e tem como finalidade o armazenamento e a fermentação dos alimentos, preparando-os para a digestão gástrica posterior (SCHMIDT; REAVILL; PHALEN, 2008; DONELEY, 2010).

O estômago das aves é composto por dois compartimentos, sendo eles: o proventrículo ou estômago glandular e o ventrículo ou estômago muscular (FURLAN, 2000). O proventrículo e o ventrículo desempenham um papel crucial promovendo um ambiente adequado para que possa haver a redução física e química do alimento ingerido pela ave, tanto em tamanho como em complexidade, para que o mesmo possa ser adequadamente absorvido pelo intestino delgado (LANGLOIS, 2003). O formato e o tamanho irão variar de acordo com a dieta de cada espécie (LUMEIJ, 1994; SCHMIDT, 1999; FURLAN, 2000; MACWHIRTER, 2003). O proventrículo é um compartimento glandular, fusiforme, que possui parede fina e é composto por células ou glândulas secretoras de muco, ácido hidrocloreídrico e pepsinogênio. O ventrículo ou estômago muscular é altamente especializado na trituração de alimentos duros ou para misturar as secreções digestivas com os alimentos (FURLAN, 2000). O pH do proventrículo e ventrículo são diferentes, geralmente o pH ventricular é mais baixo do que o do proventrículo. O pH gástrico influencia em fatores, como a digestão, principalmente das proteínas, a destruição de bactérias presentes nos alimentos e proporciona o meio ácido adequado para a atuação das enzimas digestivas (MCLELLAND, 1991).

O intestino das aves, principalmente dos psitacídeos, é considerado relativamente simples e curto. O intestino delgado é subdividido em três porções: duodeno, jejuno e íleo. No intestino delgado ocorre a absorção da maioria dos nutrientes ingeridos pelas aves. Na junção entre o jejuno e o íleo há uma estrutura remanescente do saco da gema denominada divertículo vitelínico, o qual não apresenta relevância fisiológica. O intestino grosso é composto pelo ceco e pelo cólon. Os psitacídeos não possuem ceco. No intestino grosso, devido a grande

quantidade de microrganismos, acontece a fermentação bacteriana, a digestão de alimentos fibrosos, a síntese de vitamina K, do complexo B e a reabsorção de água. A cloaca é a porção final do trato gastrointestinal, conecta o meio interno com o meio externo. Nesta desembocam o sistema digestivo, urinário e reprodutivo, denominados *coprodeum*, *urodeum* e *proctodeum*, respectivamente (SCHMIDT; REAVILL; PHALEN, 2008; DONELEY, 2010). Através de um orifício na pele são excretadas juntas as fezes e a urina, assim como, a transferência de gameta no momento da cópula (LOMBARDO; THORPE; POWER, 1999; WHITE et al., 2010).

As bactérias do trato gastrointestinal talvez sejam transferidas durante a cópula, tanto as cepas com potencial patogênico quanto as com potencial benéfico (SHELDON, 1993; LOMBARDO, 1998; LOMBARDO; THORPE; POWER, 1999; WHITE et al., 2010). No entanto, o conhecimento sobre a formação da microbiota intestinal em aves ainda não é muito bem esclarecido, uma vez que poucos estudos avaliaram a microbiota intestinal das mesmas em diferentes períodos da vida, tanto em aves selvagens quanto em aves de cativeiro. Essas informações constituiriam uma importante base para a compreensão de mecanismos como a aquisição e transmissão de bactérias, a prevalência de patógenos entéricos, e as consequências de determinadas comunidades bacterianas para a saúde do hospedeiro (LOMBARDO et al., 1996; MILLS; LOMBARDO; THORPE, 1999; VILLERS et al., 2008; XENOULIS et al., 2010; GONZALEZ-BRAOJOS et al., 2012; DONGEN et al., 2013).

Estima-se que haja entre 10^9 a 10^{14} bactérias/ g de fezes no intestino dos animais (FULLER, 1989). Geralmente *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Clostridium* são os gêneros bacterianos encontrados no intestino delgado de aves saudáveis, sendo que essa microbiota aumenta em densidade e diversidade nas regiões distais do intestino (GONG et al., 2008).

A microbiota saudável definida como normal é aquela que conserva e promove o bem-estar e a ausência de doenças, especialmente do trato gastrointestinal (ISOLAURI; SALMINEN; OUWEHAND, 2004). Acredita-se que 99% da microbiota sejam compostas por bactérias facultativas, ou seja, aeróbicas e anaeróbicas, e produtoras de ácido láctico, incluindo bactérias exclusivamente anaeróbicas como *Bifidobacterium* sp., *Bacteroides* sp., *Fusobacterium* sp. e *Eubacterium* sp. O restante desta microbiota (1%) é constituído de bactérias

consideradas nocivas ao hospedeiro, entre estas, *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Clostridium* sp., *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., entre outras (SAVAGE, 1977). Segundo Rupley (1999) a microbiota normal da cloaca das aves é predominantemente Gram-positiva e isso inclui *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp. não β -hemolítico e *Staphylococcus* sp. (excluindo *S. aureus*). Os microrganismos Gram-negativos identificados foram *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Acinetobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Escherichia coli*, *Pasteurella* sp. e *Aeromonas* sp. Em geral o isolamento de *Proteus* sp., *Salmonella* sp., *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Listeria* sp., *Erysipelothrix* sp., *Staphylococcus aureus* hemolítico, *Escherichia coli*, *Mycoplasma* sp., *Clostridium* sp., *Campylobacter* sp., *Mycobacterium* sp. é clinicamente importante em aves doentes (MORRISEY, 1997; RUPLEY, 1999; FRIEND; FRANSON, 1999).

2.2 GÊNERO *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* é o mais amplo dentre o grupo das bactérias ácidas lácticas (LAB), e são comumente encontrados em plantas, alimentos, e no trato gastrointestinal de humanos e animais. Atualmente possui 200 espécies descritas na literatura, sendo estas classificadas em três grupos: homofermentativos obrigatórios, heterofermentativos obrigatórios e heterofermentativos facultativos (KONEMAN et al., 2005; EUZÉBY, [2013?]).

Os *Lactobacillus* são bacilos ou cocobacilos Gram-positivo, imóveis em sua grande maioria, catalase e oxidase negativa, não reduzem nitrato, não produzem indol ou H₂S e nem formam esporos (KONEMAN et al., 2005). Na indústria de alimentos os *Lactobacillus* são adicionados na fabricação de queijos, iogurtes, salsichas, pães e peixes fermentados, e têm sido utilizados como biopreservativo natural de vegetais não fermentados. Algumas espécies de *Lactobacillus*, com demonstrados efeitos benéficos no hospedeiro, são denominados de probióticos. Essas cepas são capazes de colonizar a microbiota do trato gastrointestinal, estimulando assim a produção de imunoglobulinas, indução da expressão de

interferons em macrófagos, acidificação do meio, efeitos hipocolesteromiantes, ligação de componentes mutagênicos, produção de bacteriocinas, e prevenção da adesão de bactérias patogênicas nas células epiteliais, entre outros (SANDERS, 1994; SCHIFFRIN; BLUM, 2001). Os probióticos que contém *Lactobacillus* também são adicionados nos alimentos dos animais de produção e de companhia (GAGGIA; MATTARELLI; BIAVATI, 2010). Estudos futuros com os *Lactobacillus* provavelmente os incluirão na construção de cepas capazes de produzir enzimas e nutrientes essenciais ou exibir epítomos como componentes de vacinas orais (ANGELIS; GOBBETTI, 2004). Algumas cepas com reconhecida ação probiótica são: *L. acidophilus* NCFM, *L. acidophilus* La-5, *L. casei* Shirota, *L. casei* DN-114 001, *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* HN001, *L. rhamnosus* GR-1, *L. plantarum* 299v, e *L. reuteri* ATCC 55730 (BARRANGOU et al., 2011).

O gênero apresenta grande variabilidade fenotípica, bioquímica e fisiológica. O avanço nas técnicas de biologia molecular tem gerado novas informações filogenéticas sobre o gênero e sobre a diversidade funcional das espécies. Nos últimos anos aproximadamente vinte (20) espécies de *Lactobacillus* foram validadas e publicadas. Entretanto, a divisão em três grupos de *Lactobacillus* de acordo com a sua capacidade fermentativa não se repete quando o gênero é analisado filogeneticamente. Portanto, esta é uma das grandes dificuldades descritas para se caracterizar uma nova espécie de *Lactobacillus*. No entanto, os novos recursos tecnológicos como o sequenciamento de DNA têm contribuído bastante para reclassificar e classificar novas espécies (SALMINEN; VRIGHT, 2004; BARRANGOU et al., 2011).

2.3 GÊNERO *Enterococcus*

Por um longo tempo o gênero *Enterococcus* foi classificado como *Streptococcus*. Este se destacava por apresentar alta resistência a agentes físicos e químicos. Com o surgimento dos métodos moleculares muitos microrganismos foram reclassificados taxonomicamente, inclusive o gênero *Enterococcus* que foi reconhecido e separado do gênero *Streptococcus* em 1984. As primeiras espécies a

serem reclassificadas para o novo gênero foram o *Enterococcus faecalis* e o *Enterococcus faecium*, anteriormente denominadas de *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium*. Desde então, novas espécies de *Enterococcus* foram descritas e propostas para a inclusão no gênero (EUZEBY, 1997; FACKLAM; CARVALHO; TEIXEIRA, 2002). Essas reclassificações foram realizadas através do sequenciamento do gene 16S rRNA, o que possibilitou a construção de um dendograma, evidenciando assim a relação entre as espécies dos gêneros *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Lactococcus* (FISHER; PHILLIPS, 2009).

Enterococcus são bactérias Gram-positivas, catalase negativas, não formadora de esporos, anaeróbia facultativa e podem ocorrer tanto em cocos únicos quanto em cadeias. Crescem geralmente a 10°C e 45°C, sendo a temperatura ótima de crescimento 37°C, em pH 9,6 com 6,5% de NaCl e na presença de sais biliares a 40% (meio bile esculina) (FERREIRA; ÁVILA, 2001; FISHER; PHILLIPS, 2009). Podem ser encontrados no solo, nas plantas, na água, nos alimentos, e na microbiota tanto de animais quanto de humanos (FISHER; PHILLIPS, 2009; TEIXEIRA et al., 2011). Enterococci pertencem ao grupo de organismos que produzem bacteriocinas reconhecido como bactérias ácido lácticas (BAL) (HEALTH PROTECTION AGENCY, 2005). Esse grupo de BAL apresentam uma baixa quantidade de citosina e guanosina no DNA, cuja porcentagem varia de 32 a 44 mol%. O tamanho do genoma pode variar de 2,0 a 3,5 Mb. O sequenciamento completo do gênero *Enterococcus* tem contribuído bastante para uma melhor compreensão sobre as características deste gênero, uma vez que não há critérios fenotípicos disponíveis para se distinguir claramente o gênero *Enterococcus* dos demais gêneros (TEIXEIRA et al., 2011).

Enterococcus são usados ocasionalmente como probióticos. Cepas como, por exemplo, *E. faecium* SF68 são utilizadas como forma de tratamento de enterites, tanto de crianças quanto de adultos (LEWENSTEIN; FRIGERIO; MORONI, 1979; BELLOMO et al., 1980). Bellomo et al. (1980), Bruno e Frigerio (1981), e D'Appuzo e Salzberg (1982) descreveram que essa cepa diminui a duração dos sintomas da diarreia e o tempo para a normalização das fezes. Agerholm – Larsen et al. (2000) também descreveram outra cepa de *E. faecium* com ação probiótica que é capaz de reduzir o colesterol a curto prazo, porém a longo prazo sua ação é incerta (LUND et al., 2000). O uso do gênero *Enterococcus* como probiótico ainda é uma questão de

controvérsia. Embora algumas cepas sejam bem estabelecidas com ação probiótica, a sua utilização como probióticos tem sido questionada pela existência de cepas resistentes a antibióticos e a associação com doenças. A possibilidade de existência de que os genes de resistência aos antimicrobianos ou genes que codifiquem fatores de virulência possam ser transferidos para as estirpes bacterianas com ação probiótica do trato gastrointestinal contribui para esta controvérsia (FRANZ et al., 2003). No entanto, muito pouco ainda é conhecido sobre a sua patogenicidade e epidemiologia da infecção em espécies animais. Porém, já foram relatadas infecções ocasionadas por *E. faecalis* em frangos, como endocardite, artropatia, síndrome de hipertensão pulmonar, má absorção e consequente diminuição no ganho de peso, e septicemias (WAGES, 2003; GREGERSEN et al., 2010).

2.4 GÊNERO *Lactococcus*

O gênero *Lactococcus* se caracteriza por se apresentar como células cocóides Gram-positivas que ocorrem em pares ou pequenas cadeias em meio líquido. Produz ácido láctico a partir da lactose do leite que é mantido a temperatura em torno de 20 a 30°C durante 10 a 20 horas. São imóveis, homofermentativos obrigatórios, anaeróbios facultativos, catalase e oxidase negativa, não formam endósporos e crescem geralmente a 10°C, mas não a 45°C, sendo a temperatura ótima de crescimento a 30°C (HOLT et al., 1994; RUOFF, 1994; TEUBER, 1995; COURVALIN et al., 1998; HUTKINS, 2006). Por um longo período foram considerados como habitantes naturais de plantas, porém foram relacionados com a microbiota do leite (HUTKINS, 2006). São descritas seis (06) espécies filogeneticamente distintas, sendo elas: *Lactococcus lactis*, *Lactococcus garvie*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum*, e *Lactococcus raffinolactis*. Uma das espécies mais importantes dentre todas as bactérias ácido lácticas é o *Lactococcus lactis*, devido à sua capacidade de fermentar diferentes tipos de queijos e produtos lácteos (HUTKINS, 2006).

As bactérias pertencentes ao gênero *Lactococcus* não são consideradas patogênicas para o homem e animais, pois existem poucos isolados associados com

infecções oportunistas (RUOFF, 1994; COURVALIN; VOSS; RUBENS, 1998). No entanto, o número de relatos tem aumentado e infecções de trato urinário, endocardites, peritonites, osteomielites, septicemias, abscessos de fígado e isolados de sangue, foram descritos (JAMES; HARDMAN; PATTERSON, 2000; ANTOLIN et al., 2004; FIHMAN et al., 2006; GUZ et al., 2006; WANG et al., 2007). O *Lactococcus garvieae* é conhecido como um patógeno de peixes, e infecções humanas foram relacionadas com o consumo de peixes (WANG et al., 2007).

O gênero *Lactococcus* é fisiologicamente similar ao gênero *Enterococcus*, dessa forma, é possível e acredita-se que muitas vezes possa ser identificado erroneamente com o mesmo. Métodos moleculares, como o sequenciamento genético, a hibridização de DNA e a análise do perfil de proteínas tem auxiliado na identificação de algumas espécies de *Lactococcus* (ELLIOT; FACKLAM, 1996; TEIXEIRA et al., 1996; DEASY et al., 2000).

2.5 GÊNERO *Pediococcus*

O gênero *Pediococcus* é composto por células cocóides, que se agrupam em pares, são Gram-positivos, catalase negativa, homofermentativos obrigatórios, anaeróbios facultativos, imóveis, não formam esporos e requerem um rico complexo nutricional. Seu crescimento é dependente da presença de carboidrato fermentável. A temperatura ótima de crescimento varia entre 25°C a 40°C, porém algumas espécies podem crescer até 50°C (HOLT et al.; 1994; HUTKINS, 2006). Alguns pediococci podem ser distinguidos de outras bactérias ácido lácticas através de sua capacidade de tolerar a pH ácidos (pH 4,2) e a soluções salinas concentradas (NaCl 6,5%). *Pediococcus* produzem ácido-lático a partir exclusivamente da fermentação da glicose, são saprófitos e foram primeiramente isolados de plantas, assim como, de outros ambientes, como a urina animal. No entanto, são principalmente encontrados em produtos alimentícios e vegetais em decomposição (PERDERSON, 1949; SMITH; PALUMBO, 1983; HOLT; 1994; HUTKINS 2006).

Onze espécies são descritas pertencentes ao gênero, sendo elas: *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus inopinatus*, *Pediococcus halophilus*, *Pediococcus dextrinicus*, *Pediococcus cellicola*, *Pediococcus claussenii*, *Pediococcus ethanolidurans* e *Pediococcus stilesii* (KUMAR et al., 2011). Dentre essas espécies, o *Pediococcus pentosaceus* e o *Pediococcus acidilactici* são comumente utilizados na fermentação de vegetais e carnes, e o *Pediococcus damnosus* na fermentação de cervejas (HUTKINS, 2006).

Pediococcus não é considerado um gênero que apresente bactérias patogênicas para plantas e animais, porém já foram relatados em casos de bacteremia, septicemia e abscessos hepáticos em pacientes imunossuprimidos (GOLLEDGE et al., 1990; MASTRO et al., 1990; SIRE et al., 1992; BARROS et al., 2001; BARTON; RIDER; COEN, 2001). O gene de resistência à vancomicina foi reconhecido pela primeira vez, na década de 1980, em amostras clínicas contendo os gêneros *Pediococcus* e *Leuconostoc* (RUOFF, 2011).

2.6 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Devido ao aumento da casuística de resistência a antimicrobianos em humanos e animais, esse assunto recebeu bastante atenção (LESNEY, 1999). A avaliação crítica para a prescrição de um antibiótico na clínica foi reavaliada e isso implicou em reconsiderar as dosagens apropriadas, o uso empírico de drogas, as culturas bacterianas e os antibiogramas (OROSZ et al., 2000).

A penicilina foi desenvolvida em 1920 para o tratamento de infecções humanas, e a partir disso, centenas de outras drogas com efeitos antimicrobianos foram sintetizadas. As penicilinas são um grupo de antibióticos naturais e semi-sintéticos que são constituídos por um anel fundido de β -lactamase e thiazolidina (YAO; MOELLERING; 2011). Em meados de 1948, cepas de *Staphylococcus pyogenes* começaram a apresentar resistência às penicilinas, devido a produção de lactamases por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Pelo menos 170 diferentes tipos de β -lactâmicos já foram identificados até o momento, e os genes que codificam essas enzimas podem ser localizados tanto no cromossoma quanto no plasmídeo da célula bacteriana (KNOWLES, 1985; MEDEIROS, 1997). Como alternativa para superar estes mecanismos de resistência aos antimicrobianos, novos antibióticos β -lactâmicos, estáveis na presença dessas enzimas, foram desenvolvidos (BRODGEN et al., 1981; OROSZ et al., 2000).

Muitas bactérias ácido lácticas (BAL) apresentam resistência a diferentes antibióticos. Essa resistência aos antimicrobianos geralmente não é transmissível, ou seja, o gene de resistência está codificado naturalmente no cromossomo da bactéria (SALMINEN et al., 1998). Entretanto, autores já descreveram cepas de *Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum* e *L. reuteri* como sendo potencialmente carreadoras de genes de resistência aos antimicrobianos codificada no plasmídeo transmissível (ISHIWA; IWATA, 1980; AHN et al., 1992; TANNOCK et al., 1994; FONS et al., 1997). Nos últimos anos, as bactérias responsáveis pela fermentação de alimentos, como os *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp. e *Pediococcus* sp. receberam especial atenção por serem potenciais disseminadores de genes de resistência aos antimicrobianos. As BAL apresentam resistência as tetraciclinas, estreptomicinas e ampicilinas (TEUBER et al., 1999; DANIELSEN; WIND, 2003; WALTHER et al., 2008; HLEBA et al., 2012) .

A maioria das espécies do gênero *Enterococcus* apresentam resistência aos antimicrobianos, no entanto o *Enterococcus faecium* e o *Enterococcus faecalis* são as duas espécies mais relatadas na literatura. *Enterococcus* também apresentam resistência aos antimicrobianos não transmissível. Os dois grupos de drogas que os *Enterococcus* mais apresentam resistência são aos aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina) e aos β -lactâmicos (penicilinas, ampicilinas e vancomicinas) (YAO; MOELLERING; 2011).

Pode-se avaliar a susceptibilidade aos antimicrobianos através de diferentes métodos, sendo estes, o teste de caldo de microdiluição ou concentração inibitória mínima (*minimal inhibitory concentration* - MIC), o teste de disco de difusão em agar e os equipamentos automatizados. A utilização do MIC e técnicas automatizadas é uma tendência, devido à rapidez e facilidade destes testes. No entanto, o teste de disco de difusão em agar ainda continua sendo um teste válido, em decorrência da flexibilidade de seleção de drogas quando comparado com as demais técnicas, assim como seu baixo custo (TURNIDGE; FERRARO; JORGENSEN, 2011). Alguns estudos descreveram a incapacidade dos testes automatizados em detectar alguns mecanismos de resistência induzidos ou sutis, podendo assim gerar resultados imprecisos (TENOVER, 1993; KATSANIS et al., 1994; TENOVER, 1995; JETT; FREE; SAHM, 1996; TURNIDGE; FERRARO; JORGENSEN, 2011).

2.7 PROVAS BIOQUÍMICAS E MOLECULARES PARA A DETERMINAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS

Cada vez mais novos gêneros e espécies bacterianas estão sendo descritos e caracterizados através de uma variedade de métodos manuais e automatizados. A identificação de bactérias, principalmente de cocos Gram-positivos, através basicamente das características fenotípicas, torna-se cada vez mais difícil. No entanto, a identificação de bactérias utilizando a associação de provas bioquímicas e moleculares aumenta a eficácia da identificação (KIM et al., 2008; RUOFF, 2011).

2.7.1 Provas Bioquímicas Convencionais

As bactérias foram por muitos anos, identificadas através de provas bioquímicas tradicionais, as quais podem levar até mais de 20 horas para se obter o resultado. Algumas cepas não são muito bem identificadas pelo método tradicional, ou podem ser identificadas erroneamente. No entanto, há autores relatando bons resultados com essa metodologia comparada com os métodos automatizados (ZANGENAH et al., 2013).

2.7.2 Provas Bioquímicas Automatizadas

Diversos sistemas de identificação fenotípica automatizados estão disponíveis no mercado, como por exemplo, o sistema Vitek 2 (BioMérieux, São Paulo, Brasil). Com base no perfil bioquímico e atividade metabólica, esses sistemas permitem identificar espécies de bactérias a partir de colônias puras com rapidez e acurácia. Esses equipamentos possuem um banco de dados de diferentes bactérias nos quais se baseiam para a identificação das colônias. O sistema Vitek 2 realiza 43 testes bioquímicos e um teste de controle negativo em um cartão, e a identificação de cada amostra demora em torno de oito (08) horas ou menos. O valor qualitativo, ou seja, o valor que se refere a probabilidade do resultado da identificação ser igual ao dos organismos padrões daquela espécie bacteriana, é calculado e reportado junto com o resultado (BIOMERIEUX, 2010). Entretanto, alguns autores relataram problemas relacionados com este sistema, como: diferentes cepas de uma mesma espécie talvez não apresentem as mesmas características específicas, isolados de culturas antigas podem não apresentar o mesmo perfil bioquímico, amostras coletadas de pacientes que foram submetidos a tratamentos com antimicrobianos podem ter seu perfil alterado, a mesma amostra pode não ter a mesma repetibilidade bioquimicamente, o banco de dados tem um limite de número de dados de espécies, a variação fenotípica pode interferir na precisão de identificação de espécies bacterianas, e esses sistemas sugerem geralmente duas ou mais cepas como sendo

compatíveis fenotipicamente (BECKER et al., 2004; BOSSHARD et al., 2004; CLARRIDGE; 2004; KIM et al.; 2008; BECKER; EIFF, 2011).

2.7.3 Provas Moleculares

Proposto por Woese e Fox (1977), a classificação do gene RNA ribossomal tem sido a técnica padrão durante décadas para a classificação taxonômica molecular. O gene 16S ribossomal em particular foi amplamente utilizado para se estudar e caracterizar as composições das comunidades bacterianas de diversos nichos ecológicos, e o mesmo foi relatado desde então em vários estudos (PACE, 1997; HACKL et al., 2004; COSTELLO et al., 2009; ARUMUGAM et al., 2011; MIZRAHI-MAN; DAVENPORT; GILAD; 2013). Este gene está presente em todos os procariotas, e ainda inclui tanto as regiões conservadas, as quais exercem a função de iniciadores de amplificação, como também incluem nove regiões hipervariáveis (V1-V9), que podem auxiliar na distinção entre os táxons (WOESE, 1987; CLARRIDGE, 2004).

Os estudos iniciais de comunidades bacterianas sequenciavam o gene 16S rRNA, porém a extensão do sequenciamento era limitada para a identificação da diversidade microbiana. Com o avanço da tecnologia para a realização do sequenciamento de DNA, a extensão dos segmentos melhoraram, tornando-se assim uma ótima técnica para a identificação de microbiota (TRINGE; HUGENHOLTZ, 2008; CLAEISSON et al., 2010; CAPORASO et al., 2011; MIZRAHI-MAN; DAVENPORT; GILAD; 2013).

2.7.4 Árvore Filogenética

Filogenética é o estudo das relações evolutivas. Filo deriva do latim e significa “tribo”, “raça”, e genética significa “origem”, “nascimento”. A análise filogenética por sua vez, significa inferir ou estimar essas relações por meio de sequenciamento de dados moleculares e matrizes de dados morfológicos. O resultado dos estudos filogenéticos é a história evolutiva dos grupos taxonômicos, ou seja, sua filogenia. Taxonomia é a classificação, identificação e designação dos organismos. A mesma é baseada em informações da filogenia. A filogenia é composta por diferentes métodos, sendo um deles denominado claudística, onde um grupo de descendentes de um mesmo antecessor é derivado de um ramo comum. A história evolutiva inferida a partir da análise filogenética é representada geralmente em ramificações, diagramas de árvores que representam uma estimada linhagem da relação herdada entre organismos, espécies e populações. Essa análise é realizada a fim de comparar características múltiplas ou únicas, como características fenotípicas, análise de sequência de pares de base e aminoácidos (BRINKMAN; LEIPE, 2004).

Nas últimas décadas, para se determinar a taxonomia bacteriana, era considerada a informação do genoma completo. O número de sequências do genoma completo tem aumentado rapidamente e permitido a avaliação da variação do genoma dentro e entre as espécies. Essas novas abordagens permitiram, por exemplo, a análise de adição ou substituição de nucleotídeos, perda e duplicação de genes, transferência genética horizontal e rearranjos cromossômicos. Essas novas ferramentas também permitiram fundamentar a ideia de que espécies bacterianas analisadas através do gene 16S rRNA representavam coerentes entidades biológicas, apesar de não serem discriminatórias a nível de relações intraespécies (COHAN; 2002; COENYE et al., 2005; KOTETISHVILI et al., 2005; FRASER et al., 2009).

Uma das contribuições na análise de sequências gênicas é a possibilidade de estimar as relações entre as sequências analisadas. Isto só é possível, porque sequências homólogas possuem similaridades, e consequentemente estão mais próximas evolutivamente. Um dos objetivos de gerar uma árvore filogenética a partir de sequências de ácidos nucleicos é observar a relação entre as sequências analisadas (CAVALLI-SFORZA; EDWARDS; 1967).

O *Neighbor-joining* (NJ) é um dos métodos de agrupamento para a inferência filogenética que utiliza como base matrizes de distância (CAVALLI-SFORZA; EDWARDS; 1967). Segundo Felsenstein (1997), o NJ calcula a distância entre todos os possíveis pares de táxons, para em seguida selecionar o par que possui a menor distância. Para cada táxon restante, são selecionados os que possuem a menor distância entre os táxons já adicionados na árvore. Este processo é repetido até que todos os táxons da matriz de distância sejam adicionados à árvore.

3 OBJETIVOS

Os objetivos seguem discriminados abaixo.

- Identificar as espécies de bactérias ácido lácticas isoladas da microbiota fecal de papagaios-verdadeiros;
- Caracterizar fenotipicamente estas cepas bacterianas, pelos testes bioquímicos convencionais e pelo sistema Vitek 2;
- Caracterizar genotipicamente estas cepas bacterianas, pelo sequenciamento completo do gene 16S rRNA;
- Comparar os três diferentes métodos de identificação bacteriana, ou seja, por provas bioquímicas convencionais, automatizadas (Sistema Vitek 2) e o sequenciamento completo do gene 16S rRNA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos realizados para a obtenção dos resultados serão descritos abaixo.

4.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS DE PAPAGAIO-VERDADEIRO (*Amazona aestiva*)

As amostras bacterianas utilizadas neste estudo foram previamente isoladas a partir da microbiota fecal de 52 papagaios-verdadeiros, sendo 26 de vida livre e 26 de cativeiro. Essas aves foram provenientes dos seguintes locais:

- Vinte aves (20) de vida livre e seis (06) do centro de reabilitação de animais silvestres (CRAS) provenientes da região do Pantanal do Mato Grosso do Sul com o auxílio do Projeto Papagaio-verdadeiro, supervisionado e coordenado pela Dra. Gláucia Helena Fernandes Seixas.
- Dezesete (17) aves provenientes do criadouro comercial Amazona Zotech, localizado no município de Caucaia do Alto no Estado de São Paulo, registrado no IBAMA sob o número 207282, e;
- Nove (09) aves do criadouro comercial Asas do Brasil, localizado em Novo Hamburgo - RS, registrado no IBAMA sob o número 97371.

4.2.1 Amostras bacterianas

As 80 amostras bacterianas foram selecionadas neste estudo para a caracterização fenotípica e genotípica, de acordo com os seguintes critérios, devido as seguintes informações preliminares: a) a identificação de gênero positiva por PCR, b) a inconsistência nos resultados de isolamento e, c) a identificação bioquímica positiva posterior a reação de PCR positiva.

Ao total foram estudadas 80 amostras bacterianas, sendo estas identificadas previamente como sete (07) colônias pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, 59 colônias do gênero *Enterococcus*, três (03) colônias do gênero *Pediococcus* e 11 colônias do gênero *Lactococcus*. Dentre estas 80 amostras bacterianas estudadas, 31 eram provenientes de papagaios-verdadeiro de vida livre e 49 eram de papagaio-verdadeiro de cativeiro.

As amostras foram retiradas do estoque e cultivadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, Difco®) por 24 horas a 37°C para a multiplicação bacteriana. Em seguida, as amostras foram semeadas em ágar BHI por 24 horas a 37°C. Verificou-se que todas as amostras apresentavam-se como cultura puras.

Após esse procedimento, todas as provas bioquímicas foram refeitas com os mesmos substratos realizados anteriormente.

Extrações bacterianas também foram realizadas, seguindo o protocolo de Boom et al. (1990).

4.2.2 Extração do DNA bacteriano

O protocolo de extração de DNA bacteriano foi realizado segundo a metodologia descrita por Boom et al. (1990). As colônias previamente selecionadas para cada um dos gêneros bacterianos estudados foram cultivadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, Difco®) a 37°C por 24 horas, esta foi utilizada como a suspensão bacteriana inicial para a extração do DNA bacteriano.

4.2.3 Reagentes de extração

Os reagentes utilizados neste método de extração foram os seguintes:

Tampão de Lise:

- Isotiocianato de guanidina – 120 g

- Triton X-100 – 1ml
- EDTA 0,5 M (pH 8,0) – 8,8 ml
- Tris-HCl 0,1 M (pH 6,4) – 111,2 ml

Tampão de Lavagem:

- Isotiocianato de guanidina – 120 g
- Tris-HCl 0,1 M (pH 6,4) – 100 ml

Solução Carreadora:

- Sílica – 1g
- Água destilada – 5 ml
- HCl 37% - 50 μ L

Tampão de Eluição:

- Tris-HCl 10 mM (pH 7,5)
- EDTA 1 mM

4.2.4 Protocolo de extração

Ao microtubo que continha 200 μ l da suspensão bacteriana foi adicionado 1ml do tampão de lise e 40 μ L de suspensão carreadora.

Este microtubo foi agitado por 1 minuto e mantido em temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida o microtubo foi centrifugado por 2 minutos a 12800 rpm, com o rotor Ch. 006021 (Heraeus, Sorvall®, USA). O sobrenadante obtido foi descartado e ao *pellet* formado adicionado 1ml do tampão de lavagem. O microtubo foi agitado por 15 segundos e centrifugado 2 minutos a 12800 rpm, com o rotor Ch. 006021 (Heraeus, Sorvall®, USA).

O sobrenadante obtido foi descartado e o sedimento (*pellet*) novamente submetido a este procedimento. O *pellet* obtido após esta etapa foi submetido a duas lavagens com etanol 70% e uma lavagem com acetona 100%. Os microtubos contendo o *pellet* tratado com acetona 100% foram mantidos em estufa a 37°C por

30 minutos. Após a completa secagem do *pellet* foi adicionado 150µl de tampão de eluição ao microtubo e este foi agitado por 1 minuto e mantido a 56°C por 10 minutos. Passado este período o microtubo foi centrifugado por 5 minutos a 12800 rpm, com o rotor Ch. 006021 (Heraeus, Sorvall®, USA) e o sobrenadante contendo o DNA foi mantido a menos 20°C até a sua utilização na reação em cadeia pela polimerase (PCR). Em todas as análises foram utilizados controles positivos e negativos.

Em sequencia ao procedimento de extração do DNA bacteriano realizaram-se as provas da PCR.

4.2.5 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

O *primer* e a reação de amplificação da região 16S rRNA que foram utilizadas para as bactérias pesquisadas neste estudo foi adaptado do protocolo descrito por Xenoulis et al. (2008) e Xenoulis et al. (2010). Na tabela 1 consta o volume de cada reagente usado na reação de PCR. A amplificação do gene completo 16S rRNA foi conduzida separadamente para cada amostra usando o par de *primers* bacterianos universal Univ-27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e Univ-1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), que amplifica um produto de 1750 pares de bases. A reação de PCR foi realizada da seguinte forma: desnaturação a 95°C por 3 minutos e 15 segundos, 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 54°C por 45 segundos, 72°C por 3 minutos e 30 segundos, e extensão final de 72°C por 30 minutos.

Tabela 1 - Reação utilizada para a amplificação individual do gene 16S rRNA das amostras bacterianas

Reagente	Volume
Água ultrapura	13,5 µl
Tampão de PCR	2,5 µl
MgCl ₂	0,75 µl
dNTP mix	4,0 µl
<i>Primer A</i> (senso)	1,25 µl
<i>Primer B</i> (anti-senso)	1,25 µl
Taq DNA polimerase	0,5 µl
DNA (amostra)	1,0 µl
Volume final	25 µl

Fonte: XENOULIS et al., 2008.

4.2.6 Detecção do Produto Amplificado

O sistema de análise dos fragmentos amplificados foi conduzido através de eletroforese em cuba horizontal, em gel de agarose a 1,5% imerso em tampão Tris-Borato-EDTA (Tris-Borato 0,045 M, EDTA 1mM) e a uma voltagem adequada às dimensões do gel (10 V/ 1 cm de gel) (MORENO, 1999). A visualização dos fragmentos amplificados foram feitas com a adição do corante *SyberSafe®* (Invitrogen) junto ao gel de agarose 1,5% através de transiluminação do gel em luz ultravioleta.

4.2.7 Sequenciamento do DNA bacteriano

Os fragmentos correspondentes a região 16S rRNA das bactérias foram purificados dos géis de agarose 1,5% com o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit®* (GE Healthcare), quantificado visualmente com o *ladder High Mass DNA®* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante, e submetidos ao sequenciamento de DNA no sequenciador automático ABI-377 (Applied Biosystems™) (YOON et al., 1999; BALCÁZAR et al., 2006).

A reação de sequenciamento consistiu em 4 µl de BigDye 3.1 (Applied Biosystems™), 4 µl de 5x *Sequencing buffer* (Applied Biosystems™), 4 pmol de cada *primer* senso e antisenso referente a cada gene em reações separadas e 3-10 ng do DNA alvo para uma reação final de 20µl, levando-se ao termociclador T3 Thermocycles (Biometra®) para 35 ciclos de 96°C por 30 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos, com rampa de 0,7°C por segundo entre cada temperatura (VILLANUEVA, 2005).

A seguir, o produto desta reação foi precipitado à temperatura ambiente com 80 µl de isopropanol 75%, incubando-se a reação durante 20 minutos. A reação foi centrifugada a 12.000 x g por 25 minutos. O sobrenadante foi removido e se adicionou 250µl de etanol 70%. A reação foi centrifugada a 12.000 x g por cinco minutos e o precipitado foi seco a 90°C (VILLANUEVA, 2005).

Os cromatogramas gerados para cada uma das sequencias senso e antisenso de cada amostra foram conferidos manualmente com o programa Chromas v. 2.23 (© 1998-2002 Technelysium Pty LTD) para a análise por erros de interpretação e discrepâncias entre cada uma das fitas sequenciada (VILLANUEVA, 2005).

A sequencia consenso final de cada amostra foi obtida a partir das sequencias senso e o reverso-complemento das anti-senso de cada amostra alinhadas com o programa Bioedit v. 7.1.3.0 (© 1997-2011 Tom Hall), sendo a mesma submetida ao BLASTn para a comparação do resultado do sequenciamento com as demais amostras publicadas (VILLANUEVA, 2005).

As sequencias geradas foram utilizadas para a geração da árvore filogenética, juntamente com as sequencias homólogas recuperadas do *GenBank*, utilizando-se o critério de otimização de distância, como algoritmo *Neighbor-Joining* e modelo de substituição Kimurn-2 parâmetros e 1000 repetições de *bootstrap* com o programa *Clustal W*.

4.2.8 Caracterização Bioquímica das Amostras Bacterianas

Após os resultados dos sequenciamentos, provas bioquímicas foram realizadas com o intuito de caracterizar bioquimicamente as amostras bacterianas. As provas bioquímicas foram realizadas tanto através do sistema Vitek 2, (BioMérieux, Brasil), quanto por provas bioquímicas convencionais.

4.2.8.1 Caracterização Bioquímica Convencional

Os seguintes substratos foram utilizados para o gênero *Enterococcus*: motilidade, arginina, pirrolidonil arilamidase (PYR) e oxidação-fermentação de manitol, sorbitol, arabinose, rafinose, melibiose e sorbose. Para o gênero *Pediococcus* spp. se utilizou: o crescimento em BHI à 35°C, 40°C, 50°C, pH 4,2 e pH 8,5. Para o gênero *Lactococcus* spp. as reações de: motilidade, arginina e oxidação-fermentação de lactose, manitol e rafinose. Para o gênero *Lactobacillus* spp. as provas de: motilidade, arginina, oxidação-fermentação de lactose, manitol, rafinose, sacarose, amidalina, salicina, manose, melizitose, frutose, ramnose, arabinose, sorbitol, glicose, melibiose, esculina, xilose e trealose. As amostras foram submetidas duas vezes aos mesmos testes bioquímicos para se verificar o método e a confirmação dos resultados.

4.2.8.2 Caracterização Bioquímica Automatizada

Foram utilizados o cartão GP (Gram-positivo) do sistema *Vitek 2* para a análise dos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Pediococcus*, e o cartão CBC (Corinebactéria) para a identificação do gênero *Lactobacillus* (vide Apêndice A e B). Os seguintes substratos foram analisados no cartão GP: D-amidalina, fosfatidilinositol fosfolipase C, D-xilose, arginina dihidrolase, beta-galactosidase, alfa-glucosidase, Ala-Fe-Pro arilamidase, ciclodextrina, L-aspartato arilamidase, beta galactopiranosidase, alfa-manosidase, fosfatase, Leucina arilamidase, L-prolina arilamidase, Beta-glucoronidase, alfa-galactosidase, L-pirrolidonil arilamidase, beta-glucuronidase, alanina arilamidase, tirosina arilamidase, D-sorbitol, urease, resistência a polimixina B, D-galactose, D- ribose, alcalinização do L-lactato, lactose, N-acetil-D-glucosamina, D-maltose, resistência à bacitracina, resistência à novobiocina, crescimento em NaCl 6,5%, D-manitol, D-manose, Metil-B-D-glucopiranosídeo, pululano, D-rafinose, resistência O-129, salicina, sacarose, D-trealose, arginina dihidrolase 2 e resistência à optoquina.

No cartão CBC os substratos analisados foram: Ala-Fe-Pro arilamidase, D-galactose, ornitina descarboxilase, fenilalanina arilamidase, arginina GP, piruvato, beta-galactosidase, L-pirrolidonil arilamidase, alcalinização succinato, tirosina arilamidase, D-glucose, Beta-glucosidase, D-maltose, D-manitol, beta-xilosidase, resistência O-129, L-prolina arilamidase, lipase, alfa-manosidase, D-melezitose, urease, sacarose, D-trealose, citrato (sódio), 5-Bromo-4-Cloro-3-indoxil-beta-glucuronidase, alcalinização do L-lactato, alfa-glusidase, D-sorbitol, alfa-galactosidase, glicina arilamidase, D-malato, D-ribose, maltotriose, L-glutamina, fenilfosfonato, Beta-D-fucosidase, cumarato, 2-ceto-D-gluconato, hidrólise de esculina, ellman e D-xilose.

4.2.9 Perfil de Susceptibilidade a Antimicrobianos das Amostras Bacterianas Estudadas

O teste de susceptibilidade a medicamentos antimicrobianos foi realizado em todas as 80 amostras estudadas. O método empregado foi através dos cartões de antibiograma para bactérias Gram-positivas do sistema Vitek 2 (BioMérieux, Brasil). Esse método mensurou quantitativamente a atividade *in vitro* do agente antimicrobiano contra a amostra bacteriana isolada. Cada cartão continha as seguintes drogas: penicilina, benzilpenicilina, cefoxitina, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, ácido fusídico, gentamicina, gentamicina de “high level”, indução de resistência à clindamicina, linezolid, moxifloxacina, norfloxacina, oxacilina, rifampicina, estreptomicina de “high level”, teicoplanina, tigeciclina, sulfametoxazol – trimetoprim e vancomicina.

4.2.10 Árvore filogenética

A análise filogenética foi inferida usando o método de máxima semelhança baseado no modelo Nei (1978). A árvore inicial foi obtida automaticamente baseada no coeficiente de *Neighbor-Join* (NJ) e do algoritmo BioNJ, a partir de uma matriz de distâncias estimadas por pares usando o coeficiente de máxima semelhança (CMS). A análise envolveu 80 sequências de nucleotídeos, e todas as posições que continham lacunas e dados nulos foram eliminadas. Houve um total de 1.185 posições no conjunto de dados final. As análises foram realizadas utilizando o software MEGA6.

4.2.11 Análise dos resultados

4.2.11.1 Organização dos resultados

Os resultados foram divididos em tópicos e organizados em tabelas apresentados da seguinte forma:

-
- Identificação bacteriana pelo método de análise bioquímica automatizada;
 - Identificação bacteriana pelo método de análise bioquímica convencional;
 - Identificação bacteriana pelo método de sequenciamento completo do gene 16S rRNA;
 - Análise das espécies identificadas pelos métodos de análise bioquímica automatizada pelo sistema Vitek 2, de análise bioquímica convencional e de sequenciamento completo do gene 16S rRNA das amostras bacterianas;
 - Análise comparativa entre os resultados e os substratos das provas bioquímicas obtidos pelos métodos de análise bioquímica automatizada pelo sistema Vitek 2 e de análise bioquímica convencional das amostras bacterianas;
 - Análise do perfil de susceptibilidade a medicamentos antimicrobianos das amostras bacterianas realizada pelo sistema Vitek 2;
 - Análise da árvore filogenética.

4.2.11.2. Análise para a classificação e identificação da espécie

As comparações da identificação de espécie consideraram os seguintes parâmetros:

- Identificação bioquímica das amostras realizada pelos testes bioquímicos convencionais.
- Identificação bioquímica das amostras realizada pelo sistema Vitek 2.
- Identificação obtida no sequenciamento de DNA das amostras.

Critérios estabelecidos para se confirmar a identificação da espécie das amostras avaliadas:

Após a análise dos resultados, foi feita uma comparação dos resultados bioquímicos e a correspondência entre o método bioquímico convencional, o método

bioquímico automatizado (Vitek 2), e a identificação obtida no sequenciamento de DNA mediante a comparação dos resultados no BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Realizada essa análise, a espécie foi confirmada quando pelo menos dois dos resultados dos testes realizados apontaram a mesma espécie; classificou-se como não definida quando somente um teste identificou a espécie; e considerou-se não identificada quando todos os testes indicaram espécies diferentes ou quando nenhum teste definiu a espécie, tal como se especifica no quadro 1.

Quadro 1- Critérios para a classificação das espécies

Classificação da espécie	Resultados Bioquímico Convencional	Resultados Vitek 2	Resultados Sequenciamento	Critérios de Avaliação final
Espécie confirmada	X	X	X	Três testes confirmaram a mesma espécie
	X	X	-	Dois testes apontaram a mesma espécie
	-	X	X	
	X	-	X	
Espécie não definida	X	-	-	Somente um teste identificou a espécie ou todos os testes indicaram uma espécie diferente
	-	X	-	
	-	-	X	
Espécie não identificada	-	-	-	Nenhum teste definiu alguma espécie

5 RESULTADOS

Os resultados foram organizados em tabelas e gráficos.

5.1 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA PELO MÉTODO DE ANÁLISE BIOQUÍMICA AUTOMATIZADA (Vitek 2)

De 80 amostras bacterianas provenientes da microbiota fecal de Papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*), 24 foram identificadas como *Enterococcus hirae*, 16 como *Enterococcus faecalis*, oito (08) como organismo não identificado, sete (07) como *Enterococcus faecium*, seis (06) como *Kocuria rosea*, três (03) como *Enterococcus avium*, duas (02) como *Enterococcus durans*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus hominis* ou *Staphylococcus warneri* e uma (01) como *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus raffinosus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus paracasei* ou *Kocuria kristinae*. Estes resultados se encontram nas tabelas 6 e 7. As provas bioquímicas, assim como os resultados estão descritas detalhadamente no apêndice.

5.2 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA PELO MÉTODO DE ANÁLISE BIOQUÍMICA CONVENCIONAL

De 80 amostras bacterianas provenientes da microbiota fecal de Papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*), sessenta (60) foram identificadas como *Enterococcus*, sendo que 26 foram identificadas como *Enterococcus* sp., 16 como *Enterococcus raffinosus*, seis (06) como *Enterococcus ratti/ villorum*, cinco (05) como *Enterococcus faecalis*, duas (02) como *Enterococcus faecium* e *Enterococcus hirae*, e uma (01) como *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus avium* ou, *Enterococcus italicus*. A tabela 2 mostra estes resultados. De 13 amostras identificadas como

Pediococcus , três (03) foram caracterizadas como *Pediococcus* sp.. Estes resultados se encontram na tabela 3. De 11 amostras classificadas no gênero *Lactococcus*, seis (06) foram identificadas como *Lactococcus* sp., quatro (04) como *Lactococcus lactis* e uma (01) como *Lactococcus plantarum*. A tabela 4 mostra estes resultados. De sete (07) amostras de *Lactobacillus* seis (06) foram caracterizadas como *Lactobacillus* sp. Estes resultados se encontram na tabela 5.

5.3 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA PELO MÉTODO DE SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO GENE 16S rRNA

De 80 amostras bacterianas provenientes da microbiota fecal de Papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*), 25 foram identificadas como *Enterococcus faecalis*, 19 como *Enterococcus hirae*, 10 como *Enterococcus faecium*, nove (09) como *Enterococcus avium*, quatro (04) como *Pediococcus pentosaceus*, três (03) como *Staphylococcus warneri*, duas (02) como *Staphylococcus epidermis*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactococcus lactis*, uma (01) como *Pediococcus* sp., *Leuconostoc mesenteroides*, *Weissella helenica* e *Lactobacillus brevis*. As tabelas 6 e 7 mostram estes resultados.

Tabela 2 - Espécies de *Enterococcus* identificadas pelos métodos bioquímicos convencionais

Espécies Identificadas	Número de colônias	Identificação bioquímica		10°C	45°C	NaCl 6,5%	Bile	Mot	Arg	PY	Oxidação-Fermentação					
		Vida livre (colônias)	Cativeiro (colônias)								Man	Sor	Ara	Raf	Mel	Sbl
<i>Enterococcus faecium</i>	2	1	1	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	V	-	V
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	1	4	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>Enterococcus hirae</i>	2	2	0	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
<i>Enterococcus raffinosus</i>	16	11	5	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus ratti/villorum</i>	6	1	5	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus gallinarum</i>	1	0	1	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-
<i>Enterococcus avium</i>	1	1	0	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
<i>Enterococcus italicus</i>	1	1	0	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>Enterococcus</i> sp	26	9	17	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-

Bile = bile esculina, Mot = motilidade, Arg = arginina, PY = piruvato, Man = manitol, Sor = sorbose, Ara = arabinose, Raf = rafinose, Mel = melibiose, Sbl = sorbitol

Tabela 3 - Espécies de *Pediococcus* identificadas pelos métodos convencionais

Espécies identificadas	Número de colônias	Identificação bioquímica		Mot	Arg	NaCl 6,5%	Bile 40%	35°C	40°C	50°C	pH4,2	pH8,5
		Vida livre (colônias)	Cativeiro (colônias)									
<i>Pediococcus sp</i>	3	0	3	-	+	-	+	+	+	+	+	+

Mot = motilidade, Arg = arginina

Tabela 4 - Espécies de *Lactococcus* identificadas pelos métodos bioquímicos convencionais

Espécies identificadas	Número de colônias	Identificação bioquímica		Mot	Arg	10°C	45°C	NaCl 6,5%	Bile	Lac	Man	Raf
		Vida livre (colônias)	Cativeiro (colônias)									
<i>Lactococcus lactis</i>	4	1	3	-	+	+	-	-	+	+	-	+
<i>Lactococcus plantarum</i>	1	0	1	-	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>Lactococcus</i> sp.	6	1	5	-	-	+	-	-	+	+	-	+

Bile = bile esculina, Mot = motilidade, Arg = arginina, Lac = lactose, Man = manitol, Raf = rafinose

Tabela 5 - Espécies de *Lactobacillus* identificadas pelos métodos bioquímicos convencionais

Espécies identificadas	Identificação bioquímica		10°C	45°C	NaCl 6,5%	Bile	Mot	Arg	Lac	Man	Raf	Suc	Amy	Sal	Mann
	Vida livre (colônias)	Cativeiro (colônias)													
<i>Lactobacillus</i> sp.	2	4	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+

Bile = bile esculina, Mot = motilidade, Arg = arginina, Lact = lactose, Man = manitol, Raf = rafinose, Suc = sucrose, Amy = amigdalina, Sal = salicina, Mann = manose

5.4 ANÁLISE DAS ESPÉCIES IDENTIFICADAS PELOS MÉTODOS DE ANÁLISE BIOQUÍMICA AUTOMATIZADA PELO SISTEMA VITEK 2, DA ANÁLISE BIOQUÍMICA CONVENCIONAL E DO SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO GENE 16S rRNA DE AMOSTRAS BACTERIANAS ESTUDADAS

A comparação dos resultados foi realizada usando os critérios de classificação das espécies, sendo que de oitenta (80) amostras estudadas foi possível identificar quarenta (40) amostras que mostraram concordância da espécie em pelo menos dois dos testes realizados. A tabela 6 mostra este resultado. Nas outras quarenta (40) amostras estudadas não foi possível definir a espécie, como é mostrado na tabela 7.

De 40 amostras identificadas (50% do total de amostras estudadas), apenas nove (09) ou 22,5% foram identificadas pelos três métodos avaliados, bioquímico automatizado (BA), bioquímico convencional (BC) e sequenciamento de DNA (S) como mostra a figura 1, sendo estas uma (01) amostra de *Enterococcus faecium*, três (03) de *Enterococcus faecalis*, duas (02) de *Enterococcus hirae* e uma (01) de *Lactococcus lactis*. Foram identificadas em dois métodos trinta e uma (31) amostras (77,5%), sendo que apenas duas (02) amostras (5%), foram confirmadas pelo bioquímico convencional e sequenciamento de DNA, correspondendo a uma (01) amostra de *Enterococcus faecalis* e uma (01) amostra de *Lactococcus lactis*. A figura 1 mostra este resultado. Em contraste, pelo bioquímico automatizado e sequenciamento de DNA, foram identificadas 31 amostras ou 77,50% do total de amostras identificadas, correspondendo a duas (02) amostras de *Enterococcus avium*, três (03) amostras de *Enterococcus faecium*, onze (11) amostras de *Enterococcus faecalis*, treze (13) amostras de *Enterococcus hirae* e duas (02) amostras de *Staphylococcus warneri*. Estes resultados se encontram na figura 1.

Os três resultados mais observados pelo método de análise bioquímica automatizada foram *Enterococcus hirae*, *Enterococcus faecalis* e organismos não identificados. Enquanto pelo método de análise bioquímica convencional foram *Enterococcus* sp., *Enterococcus raffinosus* e *Enterococcus rattil villorum*, *Lactococcus* sp. e *Lactobacillus* sp. Pelo método de sequenciamento completo do

gene 16S rRNA foram *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae* e *Enterococcus faecium*.

Figura 1 – Espécies bacterianas identificadas pelo sequenciamento genético e pelos métodos bioquímicos convencional ou automatizado

Tabela 6 - Amostras de bactérias identificadas pelos métodos bioquímicos e molecular utilizados

Bioquímico automatizado	Bioquímico Convencional	Sequenciamento de DNA	Número de Amostras	Total de Amostras	Classificação da espécie
<i>Enterococcus avium</i>	<i>Enterococcus raffinosus</i>	<i>Enterococcus avium</i>	2	2	<i>Enterococcus avium</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	1	4	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Pediococcus</i> sp.	<i>Enterococcus faecium</i>	1		
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Enterococcus faecium</i>	2		
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	3	15	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1		
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus avium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1		
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus raffinosus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	4		
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Enterococcus faecalis</i>	5		
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	15	<i>Enterococcus hirae</i>
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Enterococcus hirae</i>	2		
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Enterococcus hirae</i>	9		
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus hirae</i>	1		
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Pediococcus</i> sp.	<i>Enterococcus hirae</i>	1		
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Enterococcus ratti/villorum</i>	<i>Enterococcus hirae</i>	2	2	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Enterococcus raffinosus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	1		
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	1	2	
<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Lactococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus warneri</i>	2	2	<i>Staphylococcus warneri</i>

Tabela 7 - Amostras de bactérias com espécies não definidas

(continua)

Bioquímico automatizado	Bioquímico Convencional	Sequenciamento de DNA	Número de Amostras	Total de Amostras
<i>Enterococcus avium</i>	<i>Enterococcus raffinosus</i>	<i>Enterococcus hirae</i>	1	1
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Pediococcus</i> sp.	1	
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	3
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Enterococcus hirae</i>	1	
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Enterococcus hirae</i>	1	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Lactococcus plantarum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1	
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Enterococcus raffinosus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Enterococcus ratti/villorum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	3	
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Enterococcus faecalis</i>	2	8
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Enterococcus avium</i>	1	
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Lactococcus cremoris</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1	
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Lactococcus</i> sp.	<i>Enterococcus faecium</i>	1	2
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus ratti/villorum</i>	<i>Enterococcus hirae</i>	1	
<i>Pediococcus acidilacti</i>	<i>Pediococcus</i> sp.	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1	
<i>Kocuria rósea</i>	<i>Enterococcus raffinosus</i>	<i>Enterococcus avium</i>	5	6
<i>Kocuria rósea</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Enterococcus faecium</i>	1	
<i>Kocuris kristinae</i>	<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	1
<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1	1
Organismo não identificado	<i>Enterococcus raffinosus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	2	
	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Enterococcus faecium</i>	1	
	<i>Enterococcus raffinosus</i>	<i>Enterococcus avium</i>	1	
	<i>Enterococcus italicus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	8
	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	
	<i>Lactococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus epidermis</i>	1	
	<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	

(continuação)

Bioquímico automatizado	Bioquímico Convencional	Sequenciamento de DNA	Número De Amostras	Total de Amostras
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Enterococcus faecium</i> / <i>Enterococcus faecalis</i>	1	2
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Weissella helênica</i>	1	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1	1
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	1
<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Lactococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus warneri</i>	1	2
<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Lactococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus epidermis</i>	1	
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Lactobacillus brevis</i>	1	1

5.5 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS RESULTADOS E OS SUBSTRATOS DAS PROVAS BIOQUÍMICAS OBTIDOS PELOS MÉTODOS DE ANÁLISE BIOQUÍMICA AUTOMATIZADA PELO SISTEMA VITEK 2 E DE ANÁLISE BIOQUÍMICA CONVENCIONAL DE AMOSTRAS BACTERIANAS ESTUDADAS

Puderam-se observar diferenças não somente na identificação bioquímica das amostras bacterianas entre os dois métodos, como também na utilização dos substratos. As seguintes situações foram observadas:

- a) identificação igual de amostras bacterianas pelos dois métodos, com a mesma utilização de substratos;
- b) identificação igual de amostras bacterianas pelos dois métodos, com diferenças na utilização de substratos;
- c) identificação diferente de amostras bacterianas pelos dois métodos, com a mesma utilização de substratos; e,
- d) identificação diferente de amostras bacterianas pelos dois métodos, com diferenças na utilização de substratos.

De nove (09) amostras que apresentaram identificação igual nos dois métodos, tanto na análise bioquímica automatizada pelo sistema Vitek 2 quanto na análise bioquímica convencional, quatro (04) apresentaram a mesma utilização de substratos, enquanto cinco (05) delas apresentaram diferenças na utilização de pelo menos um dos substratos. O mesmo ocorreu nas amostras em que as espécies identificadas pelos dois métodos foram diferentes (71 amostras), sendo que 13 apresentaram utilização igual de substratos, e 58 apresentaram diferenças na utilização de pelo menos um dos substratos. As tabelas 8 e 9 mostram estes resultados.

Considerando as 80 amostras estudadas, apenas 16 delas (20%) não apresentaram qualquer diferença entre os resultados no consumo de substratos. Trinta e oito (38) amostras apresentaram diferença nos resultados do substrato rafinose. O manitol também apresentou resultado diferente entre os dois métodos em trinta e duas (32) amostras. O substrato NaCl 6,5% apresentou diferença em vinte e duas (22) amostras, enquanto a arginina apresentou diferença em vinte (20) amostras, a sorbose em quinze (15) amostras, o sorbitol em doze (12) amostras e o

MGP (Metil-B-D-Glucopiranosídeo) e o lactato em apenas três (3) amostras cada. A urease, a APPA (Ala-Fe-Pro Arilamidase) e a AMY (Amigdalina) tiveram resultados diferentes entre os dois métodos em apenas uma (01) amostra cada. Os demais substratos ou não apresentaram diferença nos seus resultados em nenhuma das amostras, ou foram testados em apenas um dos dois métodos. Estes resultados se encontram na tabela 9.

Tabela 8 – Resultado comparativo de número de amostras identificadas pelos métodos bioquímicos, automatizado e convencional, com similaridade e diferenças da utilização de substratos

Amostras	Identificação igual de espécie bacteriana pelo método automatizado e convencional		Identificação diferente de espécies bacteriana pelo método automatizado e convencional	
	Utilização igual de substratos	Diferente utilização de substratos	Utilização igual de substratos	Diferente utilização de substratos
Espécies identificadas	4	5	4	27
Espécies não definidas	0	0	9	31
Total de amostras	4	5	13	58

Dentre as amostras que não foram identificadas e classificadas como “Não Definidas” por este estudo, nove (09) não apresentaram qualquer diferença entre os substratos como mostra a tabela 8. Dezenove amostras (19) apresentaram diferença nos resultados do substrato manitol. A rafinose também apresentou resultado diferente entre os dois métodos em dezoito (18) amostras. Tanto o substrato NaCl 6,5% quanto a arginina apresentaram diferença em dezessete 17 amostras. A sorbose em doze (12) amostras, o sorbitol em três (03) amostras e o MGP (Metil-B-D-Glucopiranosídeo) e o lactato em apenas três (03) amostras cada. A urease, a APPA (Ala-Fe-Pro Arilamidase) e a AMY (Amigdalina) tiveram resultados diferentes entre os dois métodos em apenas uma (01) amostra cada. Os demais substratos ou não apresentaram diferença nos seus resultados em nenhuma das amostras, ou foram testados em apenas um dos dois métodos. A tabela 9 apresenta estes resultados.

A tabela 9 mostra que entre as amostras consideradas como *Enterococcus faecalis* (15 amostras) por este estudo, cinco (05) não apresentaram qualquer diferença entre os substratos. Sete (07) amostras apresentaram diferença nos resultados do substrato rafinose. O manitol também apresentou resultado diferente entre os dois métodos em quatro (04) amostras. O sorbitol em três (03) amostras e a sorbose em apenas uma (01) amostra. Os demais substratos ou não apresentaram diferença nos seus resultados em nenhuma das amostras, ou foram testados em apenas um dos dois métodos. Não ocorreu qualquer diferença entre os substratos em apenas uma (01) amostra identificada como *Enterococcus hirae* entre as 15 amostras identificadas neste estudo. Dez (10) amostras apresentaram diferença nos resultados do substrato rafinose. A tabela 9 mostra que tanto o manitol quanto o sorbitol apresentaram resultado diferente entre os dois métodos em seis (06) das amostras; e o NaCl 6,5% e o MGP (Metil-B-D-Glucopiranosídeo) em apenas uma (01) amostra. Os demais substratos ou não apresentaram diferença nos seus resultados em nenhuma das amostras, ou foram testados em apenas um dos dois métodos. Dentre as 04 amostras identificadas como *Enterococcus faecium* neste estudo, apenas uma (01) amostra não apresentou qualquer diferença entre os substratos. Tanto o NaCl 6,5% como a sorbose apresentaram resultado diferente entre os dois métodos em duas (02) amostras. Os demais substratos ou não apresentaram diferença nos seus resultados em nenhuma das amostras, ou foram testados em apenas um dos dois métodos. Estes resultados se apresentam na tabela 9.

A tabela 9 mostra que de duas (02) amostras identificadas como *Enterococcus avium* por este estudo, ambas apresentaram resultado diferente entre os dois métodos nos substratos NaCl 6,5% e rafinose. Os demais substratos ou não apresentaram diferença nos seus resultados em nenhuma das amostras, ou foram testados em apenas um dos dois métodos.

Neste estudo foram identificadas duas (02) amostras como *Lactococcus lactis*, em uma (01) delas ocorreu diferença no resultado do manitol, arginina, rafinose e lactato. Este resultado se encontra na tabela 9. Os demais substratos ou não apresentaram diferença nos seus resultados em nenhuma das amostras, ou foram testados em apenas um dos dois métodos.

De duas (02) amostras identificadas como *Staphylococcus warneri* por este estudo, ambas apresentaram resultado diferente entre os dois métodos nos substratos manitol e arginina. Os demais substratos ou não apresentaram diferença nos seus resultados em nenhuma das amostras, ou foram testados em apenas um dos dois métodos. A tabela 9 mostra estes resultados.

Tabela 9 – Resultado das diferenças na utilização de substratos nas amostras identificadas e não definidas

Espécie	n	Sem diferenças	NaCl 6,5%	Man	Sbl	Arg	Sorb	Raf	MGP	APPA	Lac	Ureia	Amy
<i>E. faecalis</i>	15	5	0	4	3	0	1	7	0	0	0	0	0
<i>E. hirae</i>	15	1	1	6	6	0	0	10	1	0	0	0	0
<i>E. faecium</i>	4	1	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
<i>E. avium</i>	2	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
<i>L. lactis</i>	2	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0
<i>S. warneri</i>	2	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Não definida	40	9	17	19	3	17	12	18	2	1	2	1	1
TOTAL	80	16	22	32	12	20	15	38	3	1	3	1	1

E. faecalis = *Enterococcus faecalis*, *E. hirae* = *Enterococcus hirae*, *E. faecium* = *Enterococcus faecium*, *E. avium* = *Enterococcus avium*, *L. lactis* = *Lactococcus lactis*, *S. warneri* = *Staphylococcus warneri*, Man = manitol, Sbl = sorbitol, Arg = arginina, Sorb = sorbose, Raf = rafinose, MGP = Metil-B-D-Glucopiranosídeo, APPA = Ala-Fe-Pro Arilamidase, Lac = Lactose, Amy = Amigdalina

5.6 ANÁLISE DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS MEDICAMENTOS ANTIMICROBIANOS DE AMOSTRAS BACTERIANAS ESTUDADAS REALIZADA PELO APARELHO VITEK 2

Todas as amostras foram analisadas quanto ao perfil de susceptibilidade aos medicamentos antimicrobianos, porém 16 amostras classificadas como “não definida” não conseguiram ser avaliadas pelo sistema Vitek 2, apresentando um resultado inconclusivo. Dessa forma, foram analisadas 64 amostras ou 80% das amostras estudadas, sendo que destas 62,5% (n=40) eram de amostras com a espécie identificada e 37,5% (n=24) eram de amostras sem a identificação da espécie. Verificou-se que 34 amostras (53,13%) se apresentaram resistentes ou com resistência intermediária a pelo menos um dos antimicrobianos analisados, enquanto 30 amostras (46,88%) se mostraram suscetíveis a estes. As amostras que o sistema Vitek 2 não conseguiu analisar foram identificadas pelo equipamento da seguinte forma: Amostra não identificada, *Kocuria rosea* e *Kocuria kristinae*.

Dentre as drogas avaliadas, a benzilpenicilina foi a que apresentou o maior índice de resistência pelas amostras bacterianas estudadas (07 amostras), seguida da eritromicina (04 amostras), gentamicina de alto nível (02 amostras), estreptomicina de alto nível (01 amostra), teicoplanina (01 amostra) e vancomicina (01 amostra). O gênero *Enterococcus* apresentou onze amostras (17,19%) com resistência a três (03) medicamentos antimicrobianos, ou seja, eritromicina, estreptomicina e gentamicina.

Quatro (04) amostras de *Enterococcus hirae* e três (03) amostras não definidas apresentaram resistência a benzilpenicilina.

Em relação à resistência ao antimicrobiano eritromicina, o *Enterococcus faecalis* e o *Enterococcus faecium* apresentaram duas (02) amostras resistentes cada um e ocorreu resistência intermediária em seis (06) amostras de *Enterococcus faecalis*.

Duas (02) amostras de *Enterococcus faecalis* apresentaram resistência a gentamicina de alto nível.

Detectou-se resistência a estreptomicina de alto nível em uma (01) amostra de *Enterococcus faecium*.

Uma (01) amostra não definida foi resistente a teicoplanina e a vancomicina.

Duas (02) amostras (3,13%) classificadas como não definidas mostraram um perfil beta-lactamase positivo.

Ocorreu resistência a norfloxacin em uma (01) amostra não definida e em quatro (04) amostras de *Enterococcus faecalis* e duas (02) amostras não definidas ocorreram resistência intermediária a este medicamento.

Duas (02) amostras não definidas foram resistentes a ciprofloxacina.

Houve resistência intermediária a linezolida em duas (02) amostras de *Enterococcus faecalis* e em uma (01) amostra não definida.

A tabela 10 mostra estes resultados.

Tabela 10 – Resultados do teste de suscetibilidade aos medicamentos antimicrobianos pelo sistema automatizado (Vitek 2)

Antimicrobiano \ Espécies	<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Enterococcus hirae</i>		<i>Enterococcus faecium</i>		<i>Enterococcus avium</i>		<i>Lactococcus lactis</i>		<i>Staphylococcus warneri</i>		Não definida	
	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I
Benzilpenicilina	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
Ampicilina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gentamicina	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Estreptomicina	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ciprofloxacina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Norfloxacina	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
Eritromicina	2	6	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Linezolide	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Teicoplanina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Vancomicina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
TOTAL	4	12	4	0	3	0	0	0	0	0	0	0	6	5
Porcentagem	6,25	18,75	6,25	0	4,69	0	0	0	0	0	0	0	9,38	7,81

R = Resistente, I = Intermediário

5.7 ANÁLISE DA ÁRVORE FILOGENÉTICA

O dendograma construído baseado no coeficiente de *Neighbor-Join* ilustrou o agrupamento das amostras bacterianas, confirmando que as mesmas espécies bacterianas encontram-se mais próximas umas das outras, e que a microbiota fecal de bactérias ácido lácticas de papagaios de vida livre e cativeiro não diferem muito. No entanto, observou-se uma tendência de agrupamento bacteriano de acordo com o local de onde as aves eram provenientes.

Figura 2 – Agrupamento de 80 amostras bacterianas provenientes da microbiota fecal de papagaios-verdadeiros de vida-livre (em preto) e cativo (em vermelho). Dendograma baseado no coeficiente de *Neighbor-Join*

D: amostras bacterianas definidas; ND: amostras bacterianas não-definidas.

6 DISCUSSÃO

O papagaio-verdadeiro é umas das aves brasileiras mais procuradas por apresentar caráter sociável e capacidade de vocalização de diferentes sons (LARA, 2006). Embora existam diferentes estudos de seu comportamento e fisiologia, pouco se sabe sobre a composição da microbiota intestinal desses animais, sendo que a mesma exerce um papel fundamental na saúde e na doença dessas aves (XENOULIS et al., 2010). É descrito que o trato intestinal das aves é composto por diferentes espécies bacterianas, dentre elas, a grande maioria são bactérias Gram-positivas, como exemplo se podem citar os gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Pediococcus* (SALMINEN; WRIGHT; OUWEHAND, 2004; BRISBIN et al., 2008). Acredita-se que elas promovam efeitos benéficos na microbiota intestinal dos animais, como a inibição da colonização e invasão do trato gastrointestinal por bactérias patogênicas, estimulação do sistema imune local, e o auxílio da digestão e absorção de nutrientes e de vitaminas essenciais. Essas características permitem que estas bactérias individualmente ou em conjunto possam ser classificadas como probióticas (SALMINEN; WRIGHT, 1998; FIORAMONT; THRODORU; BUENO, 2003).

A microbiota gastrointestinal varia bastante entre uma espécie e outra, e é altamente conservada dentre a mesma espécie. No entanto, uma variação significativa entre indivíduos da mesma espécie pode existir, dificultando ainda mais a caracterização da microbiota bacteriana (STEVENS; HUME, 1998; SUCHODOLSKI et al., 2004). Esforços foram realizados para tentar caracterizar a microbiota intestinal tanto de humanos quanto de animais (LESER et al., 2002; SUCHODOLSKI et al., 2004; ECKBURG et al., 2005; RITCHIE; STEINER; SUCHODOLSKI, 2008; SUCHODOLSKI et al., 2008). Entretanto, não há na literatura informações bioquímicas e moleculares suficientes sobre a composição da microbiota intestinal de papagaios, refletindo assim na acurácia da identificação bacteriana nesta espécie.

Na identificação de cepas bacterianas foram utilizadas durante muitos anos métodos convencionais envolvendo a morfologia, a coloração de Gram e o perfil bioquímico (HOLT et al., 1994). Devido ao fato de que muitas bactérias são de difícil

identificação, porque exibem características fenotípicas atípicas (DEASY et al., 2000), outras metodologias foram desenvolvidas, como os métodos bioquímicos automatizados (KIM et al.; 2008), os padrões de resistência aos medicamentos antimicrobianos (TURNIDGE; FERRARO; JORGENSEN, 2011) e os métodos moleculares incluindo o sequenciamento de DNA (MIZRAHI-MAN; DAVENPORT; GILAD; 2013).

A identificação morfológica e as provas bioquímicas convencionais foram, por muitos anos, utilizadas como um único método de identificação bacteriana, assim como a utilização de *kits* contendo substratos bioquímicos e enzimáticos para a identificação bacteriana (DUGGAL et al., 2012). Estas técnicas são ainda utilizadas, mas existem dados mostrando inconsistências nos resultados dos *kits* na identificação bacteriana (HUDSON et al., 2003), e relatos indicando que as técnicas bioquímicas além de serem demoradas, podem identificar erroneamente as bactérias (ZANGENAH et al., 2013). Corroborando estas afirmações, neste estudo observou-se que as provas bioquímicas tradicionais mostraram resultados inconsistentes quando foram comparados com o sistema automatizado e o sequenciamento de DNA, e levaram um tempo consideravelmente maior do que as provas bioquímicas automatizadas para se obter o resultado. Os resultados das provas bioquímicas convencionais neste estudo identificaram oito (08) espécies de *Enterococcus* e duas (02) espécies de *Lactococcus*, sendo que somente duas delas (uma amostra de *Enterococcus faecalis* e uma amostra de *Lactococcus lactis*) foram confirmadas pelo sequenciamento genético. Dessa forma, os resultados encontrados permitem afirmar que as espécies podem ser identificadas erroneamente utilizando este método, sugerindo-se que a prova bioquímica convencional não deve ser utilizada como método de identificação de espécies para bactérias ácido lácticas em papagaios. Os resultados inconsistentes gerados por provas bioquímicas convencionais podem estar relacionados a fatores associados a erros de manejo operacional, como por exemplo, diferenças na interpretação dos resultados, inoculação de concentração bacteriana diferente, variação no preparo dos meios de culturas, tempo de crescimento bacteriano diferente entre uma cepa e outra, ou ainda, a existência de algumas cepas não cultiváveis (ALBERTSEN et al., 2013). Contrariamente aos resultados mostrados neste estudo, Zangenah et al. (2013) relataram que as provas bioquímicas convencionais apresentaram uma

melhor eficácia na identificação de *Pasteurella* que as provas bioquímicas automatizadas, provavelmente por ser tratar de cepas patogênicas onde o perfil bioquímico é bem definido e características fenotípicas sem resultados atípicos.

Cada vez mais um número maior de laboratórios estão usando as provas bioquímicas automatizadas, por analisarem uma grande quantidade de substratos de uma única vez, e identificar uma amostra mais rapidamente do que o método convencional. Por ser um método automatizado, a probabilidade de erros operacionais diminui bastante quando comparado com o método convencional. No entanto, 50% (40/80) das amostras bacterianas identificadas neste estudo pelas provas bioquímicas convencionais ou automatizadas não foram confirmadas pelo sequenciamento genético, gerando dúvidas sobre a confiabilidade dos resultados de ambas as técnicas. Alguns autores já relataram dificuldades com a análise bacteriana através de provas bioquímicas automatizadas, como, a não repetibilidade dos resultados de uma mesma amostra, isolados de culturas antigas não apresentarem as mesmas características fenotípicas e que a variação fenotípica dentre uma mesma espécie pode interferir na precisão da identificação (BECKER et al., 2004; CLARRIDGE; 2004; BOSSHARD et al., 2006; EIFF; BECKER; 2006; KIM et al.; 2008).

Das amostras que foram estudadas e submetidas ao bioquímico automatizado (n=80), somente 36,35% (29/80) foi confirmado pelo sequenciamento genético, o que permite mostrar uma discordância com os relatos feitos por outros autores, que conferiram uma precisão de mais de 70% aos métodos bioquímicos automatizados (GAVIN et al., 2002; WALLET et al., 2005) e uma concordância com o trabalho de Blagden (2008) que afirma que o sistema bioquímico automatizado Vitek 2 é inconclusivo e falha em proporcionar informação confiável e reproduzível. Estas divergências nos resultados provavelmente estão relacionadas ao fato de que o sistema bioquímico automatizado (Vitek 2) foi desenvolvido para a identificação de bactérias isoladas de humanos, e também por este sistema considerar a identificação confiável somente de bactérias das quais foram realizadas as avaliações e validação dos substratos contidos nos cartões de teste, o que não existe para bactérias ácido lácticas procedentes de aves silvestres.

Em relação ao sequenciamento completo do gene 16S rRNA, este é um método que tem auxiliado na identificação de uma grande quantidade de bactérias, e

com uma boa confiabilidade do resultado. Diversos autores tem adotado esta técnica como padrão ouro para a identificação de bactérias da microbiota (TRINGE; HUGENHOLTZ, 2008; CLAEISSON et al., 2010; XENOULIS et al., 2010; CAPORASO et al., 2011; MIZRAHI-MAN; DAVENPORT; GILAD; 2013). Neste estudo utilizou-se o critério de classificação baseado em pelo menos dois métodos positivos, ou seja, a espécie foi definida quando pelo menos dois métodos apresentaram a mesma identificação bacteriana. Pode-se observar que apenas 11,25% (9/80) das amostras apresentaram resultados iguais nas três técnicas analisadas. Os resultados encontrados no sequenciamento de DNA permitiu uma identificação precisa de quarenta (40) amostras (Tabela 6), uma vez que estes resultados permitiram a confirmação de resultados obtidos na identificação da espécie pelas provas bioquímicas convencionais ou automatizadas. As provas bioquímicas automatizadas apresentaram concordância de resultado com o sequenciamento de DNA em trinta e oito (38) amostras. Estes resultados sugerem que para a identificação de bactérias ácido lácticas em papagaios, a técnica de sequenciamento de DNA deve ser utilizada como de eleição, tal como recomenda a literatura para outras espécies animais (BEASLEY, 2004; BEN AMOR et al., 2007; REGINENSE et al., 2013). Como afirmado por Herbel et al. (2013) no futuro, apenas o sequenciamento do genoma completo ou o PCR em tempo real permitirão uma melhor identificação, estudo e análise rápida das bactérias. Os mesmos poderão ser aplicados e utilizados no estudo de bactérias. Estas técnicas poderão ser aplicadas e utilizadas no estudo de bactérias que compõem a microbiota de papagaios.

Outro aspecto relevante é a utilização ou não do substrato pela bactéria, pois isto interfere na identificação da mesma pelas provas bioquímicas, como foi descrito na Tabela 8. Baseado nas técnicas utilizadas esperava-se que a mesma amostra consumisse o substrato de forma igual, independente do método utilizado, convencional ou automatizado. Porém, como mostram os resultados das tabelas 8 e 9 se observaram diferenças no consumo de substratos, concordante com os dados publicados na literatura (BLAGDEN, 2004; DUGALL et al., 2012). Isto pode ter ocorrido, devido que a base de dados utilizada pelo dois métodos para a identificação bacteriana tenha sido diferente. A quantidade de base de dados utilizada pelo aparelho bioquímico automatizado foi maior em comparação a utilizada pelo bioquímico convencional, uma vez que se sabe que o sistema Vitek 2 baseia-se

em uma compilação de dados de diferentes autores da literatura para a identificação bacteriana (BIOMERIEUX, 2010). Outro ponto importante é que no teste bioquímico convencional aceitou-se uma variabilidade de no máximo dois (02) substratos diferentes da base de dados de referencia, e no teste bioquímico automatizado ocorreu uma aceitação da quantidade de variabilidade de substratos maior (BIOMERIEUX, 2010). Em relação às amostras onde ocorreu uma identificação bacteriana diferente em ambos os testes bioquímicos, 16,25% (n=13) destas apresentaram o consumo de substratos iguais. Este fato também pode estar correlacionado com a utilização de base de dados diferentes para a identificação bacteriana, e porque não foram testados os mesmos substratos em ambas as técnicas.

Em 58 amostras estudadas (72,5%) ocorreu tanto identificação bacteriana diferente em ambos os testes bioquímicos, como também consumo de substratos diferentes. O resultado de identificação bacteriana diferente é esperado, pois as bactérias apresentam diferenças em seu metabolismo e podem consumir substratos diferentes, nos casos onde o consumo dos substratos também é diferente (KONEMAN et al., 2005). Uma das hipóteses para essa alta porcentagem observada pode ser devido a erros de interpretação dos resultados obtidos nos testes bioquímicos convencionais. Estes erros podem ter sido gerados porque a bactéria não consumia totalmente o substrato, ou o consumia parcialmente, portanto não modificava a coloração do meio completamente, dificultando assim a interpretação do resultado. Outro ponto relevante é que as bactérias Gram-positivas são difíceis de serem identificadas bioquimicamente, por necessitarem de uma quantidade grande de substratos para a sua identificação (ATLAS; SNYDER, 2011). Duggal et al. (2012) compararam a identificação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas através de testes bioquímicos convencionais e automatizados, e relataram que houveram diferenças de identificação entre os dois métodos, principalmente nas bactérias Gram-positivas. Há relatos de que os testes bioquímicos automatizados também são susceptíveis a erros por não apresentarem uma boa repetibilidade de resultados (BECKER et al., 2004; CLARRIDGE III; 2004; BOSSHARD et al., 2006; KIM et al., 2008; BECKER; EIFF, 2011). No entanto, Duggal et al. (2012) e Zangenah et al. (2013) relataram uma melhor proporção de identificação do método

automatizado do que pelo método convencional, diferentemente do observado nesse estudo.

Há poucos relatos na literatura descrevendo sobre a resistência aos medicamentos antimicrobianos em papagaios (OROZS et al., 2000). Neste estudo foi avaliado o perfil de resistência aos antimicrobianos de 80 amostras pesquisadas com o intuito de contribuir para um melhor conhecimento da microbiota gastrointestinal da espécie. No entanto, o sistema automatizado Vitek 2 não conseguiu determinar a análise do perfil de resistência antimicrobiana de 16 amostras, o que está previsto no manual do equipamento onde se menciona que pode apresentar limitações quanto a combinação de alguns antibióticos e organismos (BIOMERIEUX, 2010). Estes resultados inconclusivos, já foram reportados por Ben-Ami et al. (2005) e Boudewijns; Vandeven e Verhaegen (2005), que indicaram erros de identificação do equipamento Vitek 2 relacionados com a bactéria *Kocuria*, similar aos achados deste estudo. Dessa forma, foi estudado o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de 64 amostras. Verificou-se que *Enterococcus* foi resistente a três antimicrobianos (eritromicina, estreptomicina e gentamicina) em onze amostras (17,19%) e 18,75% (n=12) mostraram resistência intermediária a um dos antimicrobianos analisados. Houve resistência a um dos antimicrobianos estudados em 53,13% das amostras (n=34), e 46,88% (n=30) destas amostras apresentaram suscetibilidade a estes medicamentos. Estes resultados mostram a relevância do conhecimento da microbiota destas aves. Salminen et al. (1998) relataram que as bactérias ácido lácticas, como os *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Pediococcus* apresentaram resistência a diferentes antimicrobianos.

Diversos autores já relataram as bactérias ácido lácticas como potenciais disseminadores de resistência aos antimicrobianos (TEUBER et al., 1999; DANIELSEN; WIND, 2003; WALTHER et al., 2008; HLEBA et al., 2012), similar aos resultados deste estudo. Geralmente os *Enterococcus* apresentam uma frequência maior resistência às penicilinas, a teicoplanina e a vancomicina (KAPLAN; GILLIGAN; FACKLAM, 1988; FACKLAM; CARVALHO; TEIXEIRA, 2002; KRAMER; SCHWEBKE; KAMPF, 2006; TEIXEIRA et al., 2011). No entanto, também tem sido demonstrada a resistência aos aminoglicosídeos (CHOW, 2000) e ao grupo dos macrolídeos (PORTILLO et al., 2000), como foi evidenciado nos resultados do presente estudo em 11 amostras originárias de papagaios-verdadeiros (*Amazona*

aestiva). Duas amostras não identificadas de papagaios de cativeiro, porém provavelmente pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, uma vez que tanto no bioquímico automatizado quanto no sequenciamento genético foram identificadas como pertencentes a este gênero, apresentaram resistência a β -lactamase. Este gênero é comumente descrito por apresentar cepas resistentes aos β -lactâmicos, causando sérios problemas de saúde pública. Bactérias resistentes aos β -lactâmicos tendem a ser multiresistentes em humanos (GAZIN et al., 2012). Observou-se também uma amostra não identificada de papagaio de vida-livre resistente a teicoplanina. A resistência a teicoplanina é frequentemente relatada, mostrando proporções epidêmicas, em cepas de *Enterococcus faecium* e *E. faecalis* (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000). Não há trabalhos descrevendo bactérias resistentes a teicoplanina em papagaios de vida-livre. Essas amostras que apresentaram resistência a β -lactamase e a teicoplanina provavelmente são de origem humana. Este fato é preocupante, pois além destas aves estarem em contato com cepas resistentes, as mesmas podem se tornarem disseminadoras de cepas multiresistentes. Neste estudo não foi possível demonstrar a resistência a vancomicina de nenhuma das 11 amostras de *Enterococcus* identificadas como resistentes a outros antimicrobianos, similar ao relatado por Devriese et al. (1996) em papagaios. A resistência a linezolida, um novo agente antimicrobiano para o tratamento de bactérias Gram-positivas, é considerado incomum em *Enterococcus* sp. (ROSSOLINI et al., 2010), no entanto esta foi detectada em uma amostra de *Enterococcus* sp. e em duas (02) amostras de bactéria com espécie não definida.

Os resultados obtidos neste estudo, confirmam as informações relatadas por Santos et al. (2013), que afirmam que os determinantes de resistência aos antimicrobianos em populações de aves silvestres não é muito conhecida e a prevalência desconhecida. Neste sentido, é necessário ressaltar que as 11 cepas de *Enterococcus* resistentes pertenceram a amostras provenientes de 10 papagaios-verdadeiros de cativeiro e um (01) de vida-livre, indicando que as aves de cativeiro estão expostas podem ter sido medicadas e podem apresentar bactérias resistentes, disseminando-as assim entre animais da mesma e de outras espécies, inclusive o homem. Estudos experimentais demonstraram que a exposição de bactéria a concentrações sub terapêuticas de antimicrobiano seleciona bactérias com perfil de resistência a este antimicrobiano (HUGHES; ANDERSSON, 2012), isto pode ter

ocorrido com as aves em cativeiro. Neste contexto, seria recomendável que estudos complementares fossem realizados nas regiões do Brasil onde estas aves habitam, e que uma pesquisa sobre o perfil de resistência nos criadouros de aves do país fosse realizada, com o intuito de se conhecer a situação de resistência aos antimicrobianos da microbiota normal destas aves, estudar a origem desta resistência, especialmente, em papagaios de vida livre, e conhecer as implicações da dinâmica de transmissão de resistência e a evolução das populações de bactérias nesta espécie animal.

Em relação às bactérias que foram identificadas neste estudo, duas amostras tiveram uma identificação não esperada, como *Staphylococcus warneri*. Esta bactéria pode ser encontrada em alimentos e no meio ambiente (MARINO et al., 2010), faz parte da microbiota normal da cavidade nasal e conjuntiva ocular de frangos de corte saudáveis (SILVANOSE et al., 2001), e também pode estar presente em aves com problemas de pele (SCANLAN; HARGIS, 1989). Por se tratar do primeiro relato desta bactéria em papagaios, estudos complementares devem ser realizados para se conhecer a presença desta bactéria na microbiota fecal das aves, sua implicação e papel na microbiota fecal desta espécie animal.

Os resultados do dendograma indicaram que houve um agrupamento entre as mesmas espécies de bactérias ácido lácticas e que houve uma tendência baseada no local de origem da ave. No entanto, Xenoulis et al. (2010) também observou uma relação entre o agrupamento das amostras bacterianas de acordo com o local de origem da ave, porém relatou diferenças evidentes na composição da microbiota das aves de vida livre e cativeiro, diferenciando do resultado deste estudo.

Existem poucas informações sobre a composição da microbiota intestinal dos papagaios até o momento. A padronização e a utilização de técnicas moleculares, provas bioquímicas e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos são importantes ferramentas para auxiliar no conhecimento da mesma. Contudo, o conhecimento da microbiota intestinal dos papagaios é essencial para se determinar quais bactérias predominam no microambiente de aves saudáveis, bactérias com potencial patogênico e que apresentem perfil de resistência aos antimicrobianos e ainda a provável origem de algumas espécies bacterianas. Estas informações permitem um manejo adequado dessas aves em cativeiro e contribuem indiretamente para a preservação dessas aves em vida-livre.

7 CONCLUSÕES

O estudo permitiu identificar 40 das 80 amostras bacterianas, sendo estas compostas pelas seguintes espécies: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae* e *Lactococcus lactis*; e as outras 40 amostras bacterianas não puderam ser identificadas sendo que estas apresentaram perfil de bactérias ácido lácticas;

A prova bioquímica automatizada apresentou um melhor resultado de identificação quando comparada com o bioquímico convencional; e uma maior concordância de resultados com o sequenciamento genético do que a prova bioquímica convencional;

A prova bioquímica automatizada conjuntamente com o sequenciamento genético é um bom método para identificação de bactérias ácido-láticas;

Não houve confirmação do sequenciamento genético em 50% das amostras bacterianas identificadas pelas provas bioquímicas convencionais ou;

A prova bioquímica convencional é mais susceptível a erros operacionais e de interpretação do que a prova bioquímica automatizada; embora ambas as metodologias apresentassem diferenças no consumo de substratos;

As espécies identificadas de *Enterococcus* apresentaram resistência a eritromicina, estreptomicina e gentamicina; sendo que 90% dessas amostras eram provenientes de papagaios-verdadeiros mantidos em cativeiro;

Identificaram-se duas amostras de *Staphylococcus warneri*;

O sequenciamento do gene 16S rRNA é um método preciso de identificação bacteriana;

A árvore filogenética agrupou as espécies bacterianas evidenciando o seu local de origem.

REFERÊNCIAS

AGERHOLM – LARSEN, L.; RABEN, A.; HAULRIK, N.; HANSEN, A. S.; MANDERS, M.; ASTRUP, A. Effect of 8 week intake of probiotic milk products on milk factors for cardiovascular diseases. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 54, n. 4, p. 288-297, 2000.

AHN, C.; THOMPSON, D. C.; DUNCAN, C.; STILES, M. E. Mobilization and location of the genetic determinant of chloramphenicol resistance from *Lactobacillus plantarum* ca TC2R. **Plasmid**, v. 27, p. 169-176, 1992.

ALBERTSEN, M.; HUGENHOLTZ, P.; SKARSHEWSKI, A.; NIELSEN, K. L.; TYSON, G. W.; NIELSEN, P. H. Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, n. 6, p. 533-538, 2013.

ANGELIS, M. D.; GOBBETTI, M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review. **Proteomics**, v. 4, n. 1, p. 106-122, 2004.

ANTOLIN, J.; CIGUENZA, R.; SALUENA, I.; VAZQUEZ, E.; HERNANDEZ, J.; ESPINOS, D. Liver abscess caused by *Lactococcus lactis cremoris*: a new pathogen. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, London, v. 36, n. 6-7, p. 490-491, 2004.

ARUMUGAM, M.; RAES, J.; PELLETIER, E.; LE PASLIER, D.; YAMADA, T.; MENDE, D. R.; FERNANDES, G. R.; TAP, J.; BRULS, T.; BATTO, J. M.; BERTALAN, M.; BORRUEL, N.; CASELLAS, F.; FERNANDEZ, L.; GAUTIER, L.; HANSEN, T.; HATTORI, M.; HAYASHI, T.; KLEEREBEZEM, M.; KUROKAWA, K.; LECLERC, M.; LEVENEZ, F.; MANICHANH, C.; NIELSEN, H. B.; NIELSEN, T.; PONS, N.; POULIN, J.; QIN, J.; SICHERLITZ-PONTEN, T.; TIMS, S.; TORRENTS, D.; UGARTE, E.; ZOETENDAI, E. G.; WANG, J.; GUARNER, F.; PEDERSEN, O.; DE VOS, W. M.; BRUNAK, S.; DORE, J.; METAHIT CONSORTIUM, ANTOLIN, M.; ARTIGUENAVE, F.; BLOTTIERE, H. M.; ALMEIDA, M.; BRECHOT, C.; CARA, C.; CHERVAUX, C.; CULTRONE, A.; DELORME, C.; DENARIAZ, G.; DERVYN, R.; FOERSTNER, K. U.; FRISS, C.; VAN DE GUCHTE, M.; GUEDON, E.; HAIMET, F.; HUBER, W.; VAN HYLCKAMA-VLIEG, J.; JAMET, A.; JUSTE, C.; KACI, G.; KNOL, J.; LAKDARI, O.; LAYEC, S.; LE ROUX, K.; MAGUIN, E.; MERIEUX, A.; MELO MINARDI, R.; M'RINI, C.; MULLER, J.; OOZEER, R.; PARKHILL, J.; RENAULT, P.; RESCIGNO, M.; SANCHEZ, N.; SUNAGAWA, S.; TORREJON, K.; VANDEMEULEBROUCK, G.; VARELA, E.; WINOGRADKY, Y.; ZELLER, G.; WEISSENBAACH, J.; EHRILICH, S. D.; BORK, P. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, Basingstoke, v. 473, n. 7346, p. 174–180, 2011.

ATLAS, R. M.; SNYDER, J. W. Reagents, stains, and media: bacteriology. In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K. C.; JORGENSEN, J. H.; FUNKE, G.; LANDRY, M. L.; WARNOCK, D. W. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 10. ed. Washington: ASM Press, 2011. cap. 17, p. 272-303.

BALCÁZAR, J. L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; VENDRELL, D.; GIRONÉS, O.; MUZQUIZ, J. L. Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, Zaragoza, v. 30, n. 2, p. 11-118, 2006.

BARRANGOU, R.; LAHTINEN, S. J.; IBRAHIN, F.; OUWEHAND, A. C. Genus *Lactobacillus*. In: WRIGHT, A. V. (Ed.). **Lactic acid bacteria: microbiological and function aspects**. 4. ed. New York: CRC Press, 2011. cap. 5, p. 77-92.

BARROS, R. R.; CARVALHO, M. G. S.; PERALTA, J. M.; FACKLAM, R. R.; TEIXEIRA, L. M. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Pediococcus* Strains Isolated from Human Clinical Sources. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 4, p. 1241-1246, 2001.

BARTON, L. L.; RIDER, E. D.; COEN, R. W. Bacteremic infection with *Pediococcus*: vancomycin-resistant opportunist. **Pediatrics**, Springfield, v. 107, n. 4, p. 775-776, 2001.

BEASLEY, S. **Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota**. 2004. 57 f. Dissertação (Degree of Doctor of Microbiology Veterinary) - Faculty of Agriculture and Forestry Sciences of the University of Helsinki, Helsinki, 2004.

BECKER, K.; EIFF, C. V. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other Catalase-Positive Cocci. In: : VERSALOVIC, J.; CARROLL, K. C.; JORGENSEN, J. H.; FUNKE, G.; LANDRY, M. L.; WARNOCK, D. W. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 10. ed. Washington: ASM Press, 2011. cap. 19, p. 308-330.

BECKER, K.; HARMSSEN, D.; MELLMANN, A.; MEIER, C.; SCHUMANN, P.; PETERS, G.; von EIFF, C. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 11, p. 4988-4995, 2004.

- BECKER, K. G.; BARNES, K. C.; BRIGHT, T. J.; WANG, A. The genetic association database. **Nature Genetics**, New York, v. 36, n. 5, p. 431-432, 2004.
- BELLOMO, G.; MANGIAGLE, A.; NICASTTO, L.; FRIGERIO, O. A controlled double blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhoea in pediatrics. **Current Therapeutic Research**, v. 70, p. 1717-1720, 1980.
- BEN-AMI, R.; NAVON-VENEZIA, S.; SCHWARTZ, D.; SCHLEZINGER, Y.; MEKUZAS, Y.; CARMELI, Y. Erroneous reporting of coagulase-negative staphylococci as *Kocuria* spp. by the Vitek 2 system. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, p. 448-450, 2005.
- BEN AMOR, K.; VAUGHAN, E. E.; DE VOS, W. M. Advanced Molecular Tools for the Identification of Lactic Acid Bacteria. **The Journal of Nutrition**, Netherlands, v. 137, n. 3, p. 741S-747S, 2007.
- BIOMERIEUX. **Informação de produtos dos sistemas vitek 2 Systems**. Duham: bioMérieux, 2010.
- BOSSHARD, P. P.; ABELS, S.; ALTWEGG, M.; BOTTGER, E. C.; ZBINDEN, R. Comparison of conventional and molecular methods for identification of aerobic catalase-negative gram-positive cocci in the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 5, p. 2065-2073, 2004.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E.; NOORDAA, J. V. D. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 3, p. 495-503, 1990.
- BOUDEWIJNS, M.; VANDEVEN, J.; VERHAEGEN, J. Vitek 2 Automated Identification System and *Kocuria kristinae*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n.11, p. 5832, 2005.
- BRINKMAN, F. S. L.; LEIPE, D. D. Phylogenetic analysis. In: BAXEVANIS, A. D.; OUELLETTE, B. F. F. (Ed.). **Bioinformatics: A practical guild to the analysis of genes and proteins**. 3. ed. New York: Wiley-Interscience, 2004. cap. 14, p. 365-392.
- BRISBIN, J. T.; GONG, J.; SHARIF, S. Interactions between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken. **Animal Health Reviews**, v. 9, n. 1, p. 101-110, 2008.

BROGDEN, R. N.; CARMINE, A.; HEEL, R. C.; MORLEY, P. A.; SPEIGHT, T. M.; AVERY, G. S. Amoxicillin-clavulanic acid: a review of its antibacterial activity, pharmacokinetics, and therapeutic use. **Drugs**, New York, v. 22, n. 5, p. 337–362, 1981.

BRUNO, F.; FRIGERIO, G. A new therapeutic alternative for the treatment of enteritis - controlled double-blind tests with the strain SF 68. **Schweizerische Rundschau fur Medizin Praxis**, Suíça, v. 70, n. 39, p. 1717–1720, 1981.

CAVALLI-SFORZA, L. L.; EDWARDS, A. W. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. **American Journal of Human Genetics**, v. 19, n. 3, p. 233–257, 1967.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C. A.; TURNBAUGH, P. J.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Redwood, v. 108, n. 1, p. 14516–4522, 2011.

CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, n. 4, p. 686, 2000.

CHOW, J. W. Aminoglycoside Resistance in Enterococci. **Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, Michigan, v. 31, n. 2, p. 586-589, 2000.

CLAESSON, M. J.; WANG, Q.; O'SULLIVAN, O.; GREENE-DINIZ, R.; COLE, J. R.; ROSS, R. P.; O'TOOLE, P. W. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. **Nucleic Acids Research**, London, v. 38, n. 22, p. e200, 2010.

CLARRIDGE III, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, n. 4, p. 840, 2004.

COENYE, T.; GEVERS, D.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; SWINGS, J. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 147–167, 2005.

COHAN, F.M. What are bacterial species?. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 56, p. 457–487, 2002.

COLLAR, N.J. Family *Psittacidae* (parrots). In: DEL HOYO, J.; ELLIOTT, A.; SARGATAL, J.; CABOT, J. (Ed.). **Handbook of the birds of the world**. Barcelona: Lynx, 1997. v. 4, p. 280-447.

COSTELLO, E. K.; LAUBER, C. L.; HAMADY, M.; FIERER, N.; GORDON, J. L.; KNIGHT, R. Bacterial community variations in human body habitats across space and time. **Science**, v. 326, p. 1694-1697, 2009.

COURVALIN, P.; VOSS, W.; RUBENS, C. E. Genetic of *Streptococci*, *Enterococci*, and *Lactococci*. **ASM News**, v. 64, p. 501-504, 1998.

DANIELSEN, M.; WIND, A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 1, p. 1-11, 2003.

D'APUZZO, V.; SALZBERG, R. The treatment of acute diarrhoea in paediatrics using *Streptococcus faecium*: results of a double blind trial. **Therapeutische Umschau**, Suiça, v. 39, p. 1033-1035, 1982.

DEASY, B. M.; REA, M. C.; FITZGERALD, G. F.; COGAN, T. M.; BERESFORD, T. P. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 23, p. 510-522, 2000.

DEVRIESE, L. A.; LEVEN, M.; GOOSEENS, H.; VANDAMME, P.; POT, B.; HOMMEZ, J.; HAESEBROUCK, F. Presence of vancomycin-resistant enterococci in farm and pet animals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 10, p. 2285-2287, 1996.

DONELEY, B. (Ed.). **Avian medicine and surgery in practice**: Companion and aviary birds. London: Manson Publishing, 2010. 336 p.

DONGEN, W. F. D.; WHITE, J.; BRANDL, H. B.; MOODLEY, Y.; MERKLING, T.; LECLAIRE, S.; BLANCHARD, P.; DANCHIN, E.; HATCH, S. A.; WAGNER, R. H. Age-related differences in the cloacal microbiota of a wild bird species. **BMC Ecology**, London, v. 13, n. 11, 2013.

DUGGAL, S.; GAIND, R.; TANDON, N.; DEB, M.; CHUGH, T. D. Comparison of an automated system with conventional identification and antimicrobial susceptibility testing. **International Scholarly Research Network Microbiology**, New York, v. 2012, p. 1-4, 2012.

ECKBURG, P. B.; BILK, M. E.; BERNSTEIN, N. C.; PURDOM, E.; DETHLEFSEN, L.; SARGENT, M.; GILL, R. S.; NELSON, E. N.; RELMAN, D. A. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. **Science**, New York, v. 308, n. 5728, p. 1635-1638, 2005.

ELLIOTT, J. A.; FACKLAM, R. R. Antimicrobial susceptibilities of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* and a proposed method to discriminate between them. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 5, p. 1296-1298, 1996.

EUZÉBY, J. P. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet (*List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*). **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v. 47, n. 1, p. 590-592, 1997.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic names with standing in nomenclature-Genus *Lactobacillus***. [2013?]. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/l/lactobacillus.html>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

FACKLAM, R. R.; CARVALHO, M. G. S.; TEIXEIRA, L. M. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In: GILMORE, M. S.; CLEWELL, D. B.; COURVALIN, P.; DUNNY, G. M.; MURRAY, B. E.; RICE, L. B. (Ed.). **The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance**. 1. ed. Washington: ASM Press, 2002. cap. 1, p. 1-54.

FELSENSTEIN, J. An alternating least squarers approach to inferring phylogenies from pairwise distances. **Systematic Biology**, London, v. 46, n. 1, p. 101–111, 1997.

FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 132-146.

FIHMAN, V.; RASKINE, L.; BARROU, Z.; KIFFEL, C.; RIAHI, J.; BERCOT, B.; SANSON LE PORS, M. J. *Lactococcus garvieae* endocarditis: identification by 16S rRNA and *sodA* sequence analysis. **Journal of Infection**, London, v. 52, n. 1, p. e3-6, 2006.

FISHER K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology Reading**, v. 155, p. 1749-1757, 2009.

FONS, M.; HEGE, T.; LADIRE, M.; RAIBAUD, P.; DUCLUZEAU, R.; MAGUIN, E. Isolation and characterization of a plasmid from *Lactobacillus fermentum* conferring erythromycin resistance. **Plasmid**, v. 37, p. 199– 203, 1997.

FRANZ, C. M.; STILES, M. E.; SCHLEIFER, K. H.; HOLZAPFEL, W. H. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 88, n. 2-3, p.105-122, 2003.

FRASER, C.; ALM, J. E.; POLZ, M. F.; SPRATT, B. G.; HANAGE, W. P. The Bacterial species challenge: Making sense of genetic and ecological diversity. **Science**, New York, v. 323, n. 5915, p. 741-746, 2009.

FRIEND, M.; FRANSON, J. C. **Field manual of wild diseases:** general field procedures and diseases of birds. Survey, USA: US Department of the Interior, US Geological, 1999.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.

FURLAN, R. L. Anatomia – Fisiologia. In: BERCHIERI – JR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 15-28.

GAGGIA, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 141, n. 1, p. S15-S28, 2010.

GAVIN, A. C.; BOSCHE, M.; KRAUSE, R.; GRANDI, P.; MARZIOCH, M.; BAUER, A.; SCHULTZ, J.; RICK, J. M.; MICHON, A. M.; CRUCIAT, C. M.; REMOR, M.; HOFERT, C.; SCHEIDER, M.; BRAJENOVIC, M.; RUFFINER, H.; MERINO, A.; KLEIN, K.; HUDAK, M.; DICKSON, D.; RUDI, T.; GNAU, V.; BAUCH, A.; BASTUCK, S.; HUHSE, B.; LEUTWEIN, C.; HEURTIER, M. A.; COPLEY, R. R.; EDELMANN, A.; QUERFUTH, E.; RYBIN, V.; DREWES, G.; RAIDA, M.; BOUWMEESTER, T.; BORK, P.; SEARAPHIN, B.; KUSTER, B.; NEUBAUER, G.; SUPERTI-FUGA, G. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. **Nature**, London, v. 415, n. 6868, p. 141-147, 2002.

GAZIN, M.; PAASCH, F.; GOOSSENS, H.; MALHOTRA-KUMAR, S. Current trends in culture-based and molecular detection of extended-spectrum- β -Lactamase-harboring and carbapenem-resistant enterobacteriaceae. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, n. 4, p. 1140, 2012.

GOLLEDGE, C. L.; STINGEMORE, N.; ARAVENA, M.; JOSKE, D. Septicemia caused by vancomycin-resistant *Pediococcus acidilactici*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, n. 7, p. 1678-1679, 1990.

GONG, J.; SYU, H.; LIU, T.; GILL, J. J.; CHAMBERS, J. R.; WHEATCROFT, R.; SABOUR, P. M. Effects of zinc bacitracin, bird age, and access to range on bacterial microbiota in the ileum and caeca of broiler chickens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 1-3, p. 318-322, 2008.

GONZALEZ-BRAOJOS, S.; VELA, A. L.; RUIZ-DE-CASTANEDA, R.; BRIONES, V.; MORENO, J. Age-related changes in abundance of enterococci and Enterobacteriaceae in Pied Flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) nestlings and their association with growth. **Journal of Ornithology**, Heidelberg, v. 153, p. 135-143, 2012.

GREGERSEN, R. H.; CHRISTENSEN, H.; EWERES, C.; BISGAARD, M. Impact of *Escherichia coli* vaccine on parent stock mortality, first week mortality of broilers, and population diversity of *E. coli* in caviated flocks. **Avian Pathology**, Houghton, v. 39, n. 4, p. 287-295, 2010.

GUZ, G.; COLAK, B.; HIZEL, K.; SUYANI, E.; SINDEL, S. Peritonitis due to *Lactococcus lactis* in a CAPD patient. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, London, v. 38, n. 8, p. 698-699, 2006.

HAAKENSEN, M.; VICKERS, D. M.; ZIOLA, B. Susceptibility of *Pediococcus* isolates to antimicrobial compounds in relation to hop-resistance and beer-spoilage. **BMC Microbiology**, London, v. 9, p. 190, 2009.

HAAKENSEN, M.; DOBSON, C. M.; HILL, J. E.; ZIOLA, B. Reclassification of *Pediococcus dextrinicus* (Coster and White 1964) Back 1978 (Approved Lists 1980) as *Lactobacillus dextrinicus* comb. nov., and emended description of the genus *Lactobacillus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 59, n. 3, p. 615-621, 2009.

HACKL, E.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S.; BODROSSY, L.; SESSITSCH, A. Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 5057–5065, 2004.

HEALTH PROTECTION AGENCY. **Enterococcus spa. and Glycopeptide-Resistant Enterococci (GRE)**. 2005. Disponível em <<http://www.hpa.org.uk>>. Acesso em: 11 jan. 2014.

HERBEL, S. R.; VAHJEN, W.; WIELER, L. H.; GUENTHER, S. Timely approaches to identify probiotic species of the genus *Lactobacillus*. **Gut Pathogens**, London, v. 5, n. 1, 2013.

HIDASI, H. W.; NETO, J. H.; MORAES, D. M. C.; LINHARES, G. F. C.; JAYME, V. S.; ANDRADE, M. A. Enterobacterial detection and *Escherichia coli* antimicrobial resistance in parrots seized from the illegal wildlife trade. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine: Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians**, Lawrence, v. 44, n. 1, p. 1-7, 2013.

HIRD, S. M. **Novel computational tools and utilization of the gut microbiota for phylogeographic inference**. 2013. 114 f. Dissertação (Degree of Doctor of Philosophy) - Louisiana State University and Agriculture and Mechanical College, Baton Rouge, 2013.

HLEBA, L.; KACANIOVA, M.; PAVELKOVA, A.; CUBON, J. Antibiotic resistance of lactovacilli strains isolated from milk and milk products from middle slovakia., **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, Nitra, v. 2, n. 1, p. 253-262, 2012.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; STANLEY, T. W. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994. 787 p.

HUDSON, C. R.; FEDORKA-CRAY, P. J.; JACKSON-HALL, M. C.; HROTT, L. M. Anomalies in species identification of enterococci from veterinary sources using a commercial biochemical identification system. **Letters in Applied Microbiology**, London, v. 36, n. 4, p. 245-250, 2003.

HUGHES, D.; ANDERSSON, D. I. Selection of resistance lethal and non-lethal antibiotic concentration. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, p. 555-560, 2012.

HUTKINS, R. W. **Microbiology and technology of fermented foods**. Oxford: Blackwell Publishing, 2006. 473 p.

UCN RED LIST CATEGORY. **Blue-fronte Amazon Parrot – Birdlife species factsheet**. 2009. Disponível em: <http://www.birdlife.org/datazone/species/index.html?action=SpcHTMDetails.asp&sid=1547>. Acesso: 10 jan 2014.

ISHIWA, H.; IWATA, S. Drug resistance plasmids in lactobacillus fermentum. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 26, p. 71-74, 1980.

ISOULARI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Microbial-gut interactions in health and disease. **Probiotics, Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, n. 2, p. 299-313, 2004.

JAMES, P. R.; HARDMAN, S. M.; PATTERSON, D. L. Osteomyelitis and possible endocarditis secondary to *Lactococcus garvieae*: a first case report. **Postgraduate Medical Journal**, London, v. 76, n. 895, p. 301-303, 2000.

JETT, B.; FREE, L.; SAHM, D. F. Factors influencing the vitek gram-positive susceptibility system's detection of vanB-encoded vancomycin resistance among. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 3, p. 701-706, 1996.

KAPLAN, A. H.; GILLIGAN, P. H.; FACKLAM, R. R. Recovery of resistant enterococci during vancomycin prophylaxis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 26, n. 6, p. 1216-1218, 1988.

KATSANIS, P. G.; SPARGO, J.; FERRARO, M. J.; SUTTON, L.; JACOBY, G. Detection of *Klebsiella pneumonia* and *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β -lactamases. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 3, p. 691-696, 1994.

KIM, M.; HEO, S. R.; CHOI, S. H.; KWON, H.; PARK, J. S.; SEONG, M. W.; LEE, D. H.; PARK, K. U.; SONG, J.; KIM, E. C. Comparison of the MicroScan, VITEK 2 and Crystal GP with 16S rRNA sequencing and MicroSeq 500 v2.0 analysis for coagulase-negative staphylococci. **BMC Microbiology**, London, v. 23, n. 8, p. 233, 2008.

KNOWLES, J. M. Penicillin resistance: the chemistry of β -lactamase inhibition. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 18, p. 97-104, 1985.

KONEMAN, E. W.; WINN JR, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; PROCOP, G.; SCHRENBARGER, P.; WOODS, G. (Ed.). **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 6. ed. Lippincott: Williams and Wilkins, 2005, 1736 p.

KOTETISHVILI, M.; KREGE, A. S.; WAUTERS, G.; MORRIS, J. G.; SULAKVELIDZE, A.; STINE, O. C. Multilocus sequence typing for studying intra- and interspecies relationships among *Yersinia* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 6, p. 2674-2684, 2005.

KRAMER, A.; SCHWEBKE, I.; KAMPF, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, p.130, 2006.

KUMAR, B.; BALGIR, P. P.; KAUR, B.; GARG, N. Cloning and expression of bacteriocins of *Pediococcus* spp.: a review. **Archives of Clinical Microbiology**, Oviedo, v. 2, n. 3-4, p. 1-18, 2011.

LANGLOIS, I. The anatomy, physiology, and diseases of the avian proventriculus and ventriculus. **The Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, Philadelphia, v. 6, n. 1, p. 85-111, 2003.

LESER, T. D.; AMENUVOR, J. Z.; JENSEN, T. K.; LINDECRONA, R. H.; BOYE, M.; MOLLER, K. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 2, p. 673–690, 2002.

LESNEY, M. S. The garden of Dr. Moreau: plant biotechnology as a chemical enterprise. Genetically modified foods are the fore-runners of designer chemical plants. **Today's Chemist at Work**, v. 6, n. 8, p. 28-33, 1999.

LEWENSTEIN, A.; FRIGERIO, G.; MORONI, M. Biological properties of SF68, a new approach for the treatment of diarrhoeal diseases. **Current Therapeutic Research**, v. 26, p.967-981, 1979.

LOMBARDO, M. P. On the evolution of sexually transmitted diseases in birds. **Journal of Avian Biology**, v. 29, p. 314-321, 1998.

LOMBARDO, M. P.; THORPE, P. A.; CICHEWICZ, R.; HENSHAW, M.; MILLARD, C.; STEEN, C.; ZELLER, T. K. Communities of cloacal bacteria in tree swallow families. **Condor**, v. 98, n. 1, p. 167-172, 1996.

LOMBARDO, M. P.; THORPE, P. A.; POWER, H. W. The beneficial sexually transmitted microbe hypothesis of avian copulation. **Behavior Ecology**, New York, v. 10, p. 333-337, 1999.

LUMEJI, J. T. Gastroenterology. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian Medicine: principles and application**. Lake Worth (FL): Wingers Publishing Inc.; 1994. p. 482–521.

LUND, B.; EDLUND, C.; BARKHOLT, L.; NORD, C. E.; TVEDE, M.; POULSEN, R. L. Impact on human intestinal micro-flora of an *Enterococcus faecium* probiotic and vancomycin. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, London, v. 32, n. 6, p. 627-632, 2000.

MACWHIRTER, P. Basic anatomy, physiology and nutrition. In: TULLY, T. N.; LAWTON, M. P. C.; DORRESTEIN, G. M. **Avian medicine**. Edinburgh: Butterworth-Heinemann, 2003. p. 1-25.

MARINO, M.; FRIGO, F.; BARTOLOMEOLI, I.; MAIFRENI, M. Safety-related properties of *Staphylococci* isolated from food and food environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 2, p. 550-561, 2011.

MASTRO, T. D.; SPIKA, J. S.; LOZANO, P.; APPEL, J.; FACKLAM, R. R. Vancomycin-resistant *Pedococcus acidilactici*: nine cases of bacteremia. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 161, n. 5, p. 956-960, 1990.

MCLELLAND, J. Digestive system. In: MCLELLAND, J. **A color atlas of avian anatomy**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1991. p. 47–65.

MEDEIROS, A. A. Evolution and dissemination of β -lactamase antibiotics. **Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, Chicago, v. 24, p. 519-545, 1997.

MILLS, T. K.; LOMBARDO, M. P.; THORPE, P. A. Microbial colonization of the cloacae of nestling tree swallows. **The Auk**, Washington, v. 116, p. 947-956, 1999.

MIZRAHI-MAN, O.; DAVENPORT, E. R.; GILAD, Y. Taxonomic classification of bacterial 16S rRNA genes using short sequencing reads: evaluation of effective study designs. **Plos One**, Chicago, v. 8, n. 1, p. e53608, 2013.

MORENO, A. M. **Enterite Proliferativa Suína: Aspectos Anatomopatológicos e Epidemiológicos**. 1999. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo, 1999.

MORRISEY, J. K. Diseases of the upper respiratory tract of companion birds. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 6, n. 4, p. 195-200, 1997.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Baltimore, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.

OROSZ, S. E.; JONES, M. P.; COX, S. K.; ZAGAYA, N. K.; FRAZIER, D. L. Pharmacokinetics of amoxicillin plus clavulanic acid in blue-fronted amazon parrots (*Amazona aestiva aestiva*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, Boca Raton, v. 14, n. 2, p. 107-122, 2000.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v. 276, p. 734-740, 1997.

PEDERSON, C. S. The genus *Pediococcus*. **Bacteriological Reviews**, Washington, v. 13, p. 225-232, 1949.

PORTILLO, A.; RUIZ-LARREA, F.; ZARAZAGA, M.; ALONSO, A.; MARTINEZ, J. L.; TORRES, C. Macrolide Resistance Genes in *Enterococcus* spp.. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 4, p. 967-971, 2000.

REGINENSE, S. M.; GONZÁLEZ, M. J.; BERMÚDEZ, J. Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from cow, ewe and goat dairy artisanal farmhouses. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 2, p. 427-430, 2013.

RITCHIE, L. E.; STEINER, J. M.; SUCHODOLSKI, J. S. Assessment of microbial diversity along the feline intestinal tract using 16S rRNA gene analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 66, n. 3, p. 590-598, 2008.

ROSSOLINI, G. M.; MANTENGOLI, E.; MONTAGNANI, F.; POLLINI, S. Epidemiology and clinical relevance of microbial resistance determinants versus anti-Gram-positive agents. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 582-588, 2010.

RUOFF, K. L. The “new” catalase-negative, gram-positive cocci. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 18, p. 153-156, 1994.

RUOFF, K. L. *Aerococcus*, *Abiotrophia*, and other aerobic catalase-negative, gram-positive cocci. In: VERALOVIC, J.; CARROL, K. C.; JORGENSEN, J. H.; FUNKE, G.; LANDRY, M. L.; WARNOCK, D. W. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 10. ed. Washington: ASM Press, 2011. cap. 22, p. 365-376.

SALMINEN, S.; WRIGHT, A. **Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects**. 2. ed. Nova York: Marcel Dekker, 1998. 633 p.

SALMINEN, S.; WRIGHT, A. V.; MORELLI, L.; MARTEAU, P.; BRASSART, D.; M DE VOS, W.; FONDÉN, R.; SAXELIN, M.; COLLINS, K.; MOGENSEN, G.; BIRKELAND, S.; MATTILA-SANDHOLM, S. Demonstration of safety of probiotics — a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 44, n. 1-2, p. 93–106, 1998.

SALMINEN, S.; WRIGHT, A. V.; OUWEHAND, A. C. **Latic acid bacteria: microbiology and functional aspects**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 2004. 656 p.

SANDERS, M. E. Lactic acid bacteria as promoters of human health. In: GOLDBERG, I. **Functional foods: designer foods, pharmafoods, nutraceuticals**. New York: Springer, 1994. 571 p.

SANTOS, T.; SILVA, N.; IGREJAS, G.; RODRIGUES, P.; MICAEL, J.; RODRIGUES, T.; RESENDES, R.; GONÇALVES, A.; MARINHO, C.; GONÇALVES, D.; CUNHA, R.; POETA, P. Dissemination of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* from wild birds of Azores Archipelago. **Anaerobe**, San Diego, v. 24, p. 25-31, 2013.

SCANLAN, C. M.; HARGIS, B. M. A bacteriologic study of scabby-hip lesions from broiler chickens in Texas. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians**, Columbia, v. 1, n. 2, p. 170-173, 1989.

SAVAGE, D. C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract., **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 31, p. 107-133, 1977.

SHELDON, B. C. Sexually transmitted disease in birds: occurrence and evolutionary significance. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, London, v. 339, n. 1290, p. 491-497, 1993.

SCHIFFRIN, E. J.; BLUM, S. Food processing: probiotic microorganisms for beneficial foods. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 12, n. 5, p. 499-502, 2001.

SCHMIDT, R. E. Pathology of gastrointestinal diseases of psittacine birds. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 8, n. 2, p. 75-82, 1999.

SCHMIDT, R. E.; REAVILL, D. R.; PHALEN, D. N. **Pathology of pet and aviary birds**. Iowa: Iowa State Press, 2008. 234 p.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. 912 p.

SILVANOSE, C. D.; BAILEY, T. A.; NALDO, J. L.; HOWLETT, J. C. Bacterial flora of the conjunctiva and nasal cavity in normal and diseased captive bustards. **Avian Diseases**, New York, v. 45, n. 2, p. 447-451, 2001.

SIRE, J. M.; DONNIO, P. Y.; MENSARD, R.; POUEDRAS, P.; AVRIL, J. L. Septicemia and hepatic abscess caused by *Pediococcus acidilactici*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlim, v. 11, n. 7, p. 623-625, 1992.

SMITH, J. L.; PALUMBO, S. A. Use of starter cultures in meats. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 46, p. 997-1006, 1983.

STEVENS, C. E.; HUME, I. D. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. **Physiological Reviews**, Washington, v. 78, n. 2, p. 393-427, 1998.

SUCHODOLSKI, J. S.; RUAUX, C. G.; STEINER, J. M.; FETZ, K.; WILLIAMS, D. A. Application of molecular fingerprinting for qualitative assessment of small-intestinal bacterial diversity in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 2, p. 4702-4708, 2004.

SUCHODOLSKI, J. S.; CAMACHO, J.; STEINER, J. M. Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 66, n. 3, p. 567-578, 2008.

TANNOCK, G. W.; LUCHANSKY, J. B.; MILLER, L.; CONNELL, H.; THODE-ANDERSEN, S.; MERCER, A. A.; KLAENHAMMER, T. R. Molecular characterization of a plasmid-borne (pGT633) erythromycin resistance determinant (ermGT) from *Lactobacillus reuteri* 100-63. **Plasmid**, v. 31, p. 60–71, 1994.

TEIXEIRA, L. M.; MERQUIOR, V. L. C.; VIANNI, M. C. E.; CARVALHO, M. G. S.; FRACALANZZA, S. E. L.; STEIGERWALT, A. G.; BRENNER, D. J.; FACKLAM, R. R. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 664-668, 1996.

TEIXEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. S.; SHEWMARKER, L.; FACKLAM, R. R. *Enterococcus*. In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K. C.; JORGENSEN, J. H.; FUNKE, G.; LANDRY, M. L.; WARNOCK, D. W. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 10. ed. Washington: ASM Press, 2011. cap. 21, p. 350-364.

TENOVER, F. C.; TOKARS, J.; SWENSON, J.; PAUL, S.; SPITALNY, K.; JARVIS, W. Ability of clinical laboratories to detect antimicrobial agent - resistant enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 7, p. 1695-1699, 1993.

TEUBER, M.; GEIS, A.; NEVE, H. The genus *Lactococcus*. In: BALOWS, A.; TRUBER, H. G.; DWORKIN, W.; HARDER, M.; SCHLEIFER, K. H. (Ed.). **The prokaryotes**. 2. ed. New York: Springer Verlag, 1995. p. 1482-1501.

TEUBER, M.; MEILE, L.; SCHWARZ, F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 76, p. 115–137, 1999.

TRINGE, S. G.; HUGENHOLTZ, P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 11, n. 5, p. 442–446, 2008.

TURNIDGE, J. D.; FERRARO, M. J.; JORGENSEN, J. H. Susceptibility test methods: general considerations. In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K. C.; JORGENSEN, J. H.; FUNKE, G.; LANDRY, M. L.; WARNOCK, D. W. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 10. ed. Washington: ASM Press, 2011. cap. 67, p. 1115-1121.

VILLERS, L. M.; JANG, S. S.; LENT, C. L.; LEWIN-KOH, S. C.; NOROSOARINAIVO, J. A. Survey and comparison of major intestinal flora in captive and wild ring-tailed lemur (*Lemur catta*) populations. **American Journal of Primatology**, New York, v. 70, n. 2, p. 175-184, 2008.

VILLANUEVA, J. L. C. **Vírus da laringotraqueíte infecciosa: detecção e caracterização molecular, isolamento, diagnóstico diferencial e epidemiologia de um surto em granjas de poedeiras comerciais na região de Bastos, Estado de São Paulo**. 2005. 115 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

WALLET, F.; LOIEZ, C.; RENAUX, E.; LEMAITRE, N.; COURCOL, R. J. Performances of Vitek 2 colorimetric cards for identification of gram-positive and gram-negative bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 9, p. 4402-4406, 2005.

WALTHER, C.; ROSSANO, A.; THORMANN, A.; PERRETEN, V. Antibiotic resistance in *Lactococcus species* from bovine milk: presence of a mutated multidrug transporte mdt(A) gene in susceptible *Lactococcus garvieae* strains. **Veterinary Microbiology**, Ames, v. 131, n. 3-4, p. 348-357, 2008.

WANG, C. Y. C.; SHIE, H. S.; CHEN, S. C.; CHEN, J. P.; HUANG, J. P.; HSIEH, I. C.; WEN, M. S.; LIN, F. C.; WU, D. *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible associations with aquaculture outbreaks. **International Journal of Clinical Practice**, New York, v. 61, n. 1, p. 68-73, 2007.

WAGES, D. P. Streptococcosis. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MCDOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. (Ed.). **Diseases of poultry**. 11. ed. Ames: Iowa State Press, 2003. cap. 24, p. 805-808.

WHITE, J.; MIRLEAU, P.; DANCHIN, E.; MULARD, H.; HATCH, S. A.; HEEB, P.; WAGNER, R. H. Sexually transmitted bacteria affect female cloacal assemblages in a wild bird. **Ecology Letters**, Oxford, v. 13, n. 12, p. 1515-1524, 2010.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiology Reviews**, v. 51, p. 221-271, 1987.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, p. 5088-5090, 1977.

YOON, J. H.; YIM, D. K.; GOODFELLOW, M.; PARK, Y. H. Sequence analysis of 16S rRNA genes amplified from two ribosomal RNA gene clusters of *Bifidobacterium bifidum*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Netherlands, v. 75, n. 4, p. 329-333, 1999.

XENOULIS, P. G.; GRAY, P. L.; BRIGHTSMITH, D.; PALCULICT, B.; HOPPES, S.; STEINER, J. M.; SUCHODOLSKI, J. S. Molecular chacterizarion of the clocal microbiota of wild and captive parrots. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 146, n. 3-4, p. 320-325, 2010.

XENOULIS, P. G.; PALCULICT, B.; ALLENSPACH, K.; STEINER, J. M.; VAN HOUSE, A. M.; SUCHODOLSKI, J. S. Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, n. 3, p. 579–589, 2008.

YAO, J. D. C.; MOELLERING JR, R. C.; Antibacterial agents. In: MURRAY, P. R. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. ASM Press: Washington DC, 1999. p. 1474-1504.

ZANGENAH, S.; GULERYUZ, G.; BORANG, S.; ULLBERG, M.; BERGMAN, P.; OZENCI, V. Identification of clinical *Pasteurella* isolates by MALDI-TOF - a comparison with VITEK 2 and conventional microbiological methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 77, n. 2, p. 96-98, 2013.

APÊNDICE

Espécies identificadas (Número da Amostra)	Testes										
	NaCl	MAN	SORB	ARG	RAF	SUC	MGP	AMY	APPA	LeuA	AlaA
<i>E. avium</i> (15)	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>E. avium</i> (182)	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>E. avium</i> (237)	-	+	+	-	-	-	+	(+)	+	-	-
<i>E. raffinosus</i> (411)	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>E. faecium</i> (89)	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>E. faecium</i> (224)	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>E. faecium</i> (233)	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>E. faecium</i> (236)	-	-	-	+	+	+	+	(-)	-	-	-
<i>E. faecium</i> (274)	-	-	-	+	+	+	+	(-)	-	-	-
<i>E. faecium</i> (279)	-	-	-	+	+	+	+	(-)	-	-	-
<i>E. faecium</i> (324)	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> (25)	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (26)	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (32)	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (59)	+	+	+	+	-	+	+	+	-	(+)	+
<i>E. faecalis</i> (63)	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>E. faecalis</i> (133)	+	+	+	+	-	+	(-)	+	-	-	-
<i>E. faecalis</i> (137)	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (178)	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (243)	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (253)	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>E. faecalis</i> (254)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (266)	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (268)	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> (277)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (297)	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (354)	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+

Espécies identificadas (Número da Amostra)	Testes										
	dRIB	NOVO	OPTO	PIPLC	CDEX	ProA	TyrA	ILATk	O129R	dXYL	AspA
<i>E. avium</i> (15)	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>E. avium</i> (182)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. avium</i> (237)	+	+	+	-	-	-	(+)	-	-	-	-
<i>E. raffinosus</i> (411)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecium</i> (89)	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>E. faecium</i> (224)	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>E. faecium</i> (233)	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>E. faecium</i> (236)	+	+	+	-	+	-	(+)	-	+	-	-
<i>E. faecium</i> (274)	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>E. faecium</i> (279)	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>E. faecium</i> (324)	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>E. faecalis</i> (25)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E. faecalis</i> (26)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (32)	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (59)	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (63)	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>E. faecalis</i> (133)	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>E. faecalis</i> (137)	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>E. faecalis</i> (178)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E. faecalis</i> (243)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E. faecalis</i> (253)	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>E. faecalis</i> (254)	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>E. faecalis</i> (266)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E. faecalis</i> (268)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E. faecalis</i> (277)	+	+	+	-	+	-	(+)	-	+	-	+
<i>E. faecalis</i> (297)	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>E. faecalis</i> (354)	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+

Espécies identificadas (Número da Amostra)	Testes										
	BGURr	LAC	SAL	BGAR	AGAL	URE	NAG	dMNE	BGAL	AMAN	PyrA
<i>E. avium</i> (15)	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>E. avium</i> (182)	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	(-)
<i>E. avium</i> (237)	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>E. raffinosus</i> (411)	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+
<i>E. faecium</i> (89)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. faecium</i> (224)	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
<i>E. faecium</i> (233)	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. faecium</i> (236)	-	+	+	-	+	-	+	+	(+)	-	+
<i>E. faecium</i> (274)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. faecium</i> (279)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. faecium</i> (324)	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (25)	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (26)	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (32)	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (59)	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (63)	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (133)	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (137)	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (178)	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (243)	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (253)	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (254)	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (266)	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (268)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. faecalis</i> (277)	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (297)	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> (354)	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+

Espécies identificadas (Número da Amostra)	Testes								
	POLYB	dMAL	dTRE	AGLU	PHOS	BGUR	dGAL	BACI	PUL
<i>E. avium</i> (15)	-	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>E. avium</i> (182)	-	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. avium</i> (237)	-	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>E. raffinosus</i> (411)	-	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. faecium</i> (89)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. faecium</i> (224)	+	+	-	-	-	-	+	(-)	-
<i>E. faecium</i> (233)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. faecium</i> (236)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. faecium</i> (274)	+	+	+	-	-	-	+	-	-
<i>E. faecium</i> (279)	+	+	+	-	-	-	+	-	-
<i>E. faecium</i> (324)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i> (25)	+	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>E. faecalis</i> (26)	+	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>E. faecalis</i> (32)	+	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>E. faecalis</i> (59)	+	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>E. faecalis</i> (63)	+	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>E. faecalis</i> (133)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i> (137)	+	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>E. faecalis</i> (178)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i> (243)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i> (253)	+	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>E. faecalis</i> (254)	+	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>E. faecalis</i> (266)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i> (268)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i> (277)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i> (297)	+	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>E. faecalis</i> (354)	+	+	+	-	-	-	-	+	-

Espécies identificadas (Número da Amostra)	Testes										
	NaCl	MAN	SORB	ARG	RAF	SUC	MGP	AMY	APPA	LeuA	AlaA
<i>E. hirae</i> (23)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>E. hirae</i> (24)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>E. hirae</i> (42)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>E. hirae</i> (45)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>E. hirae</i> (46)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>E. hirae</i> (47)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>E. hirae</i> (48)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>E. hirae</i> (53)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>E. hirae</i> (61)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>E. hirae</i> (66)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+
<i>E. hirae</i> (67)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	(-)
<i>E. hirae</i> (68)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>E. hirae</i> (69)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>E. hirae</i> (71)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>E. hirae</i> (74)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	(+)
<i>E. hirae</i> (82)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	(-)
<i>E. hirae</i> (83)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>E. hirae</i> (90)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+
<i>E. hirae</i> (156)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+
<i>E. hirae</i> (248)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>E. hirae</i> (294)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>E. hirae</i> (298)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>E. hirae</i> (316)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>E. hirae</i> (327)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>E. durans</i> (17)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>E. durans</i> (251)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>E. gallinarum</i> (144)	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+

Espécies identificadas (Número da Amostra)	Testes										
	dRIB	NOVO	OPTO	PIPLC	CDEX	ProA	TyrA	ILATk	O129R	dXYL	AspA
<i>E. hirae</i> (23)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E. hirae</i> (24)	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>E. hirae</i> (42)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E. hirae</i> (45)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E. hirae</i> (46)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E. hirae</i> (47)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E. hirae</i> (48)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E. hirae</i> (53)	+	+	+	-	+	-	(-)	-	+	-	+
<i>E. hirae</i> (61)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E. hirae</i> (66)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E. hirae</i> (67)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E. hirae</i> (68)	+	+	+	-	+	-	(+)	-	+	-	+
<i>E. hirae</i> (69)	+	+	+	-	+	-	(+)	-	+	-	+
<i>E. hirae</i> (71)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E. hirae</i> (74)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E. hirae</i> (82)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E. hirae</i> (83)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	(+)
<i>E. hirae</i> (90)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E. hirae</i> (156)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E. hirae</i> (248)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	(+)
<i>E. hirae</i> (294)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E. hirae</i> (298)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	(+)
<i>E. hirae</i> (316)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E. hirae</i> (327)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E. durans</i> (17)	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>E. durans</i> (251)	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	(-)
<i>E. gallinarum</i> (144)	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-

Espécies identificadas (Número da Amostra)	Testes										
	BGURr	LAC	SAL	BGAR	AGAL	URE	NAG	dMNE	BGAL	AMAN	PyrA
<i>E. hirae</i> (23)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. hirae</i> (24)	-	+	+	-	+	-	+	+	(+)	-	+
<i>E. hirae</i> (42)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. hirae</i> (45)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. hirae</i> (46)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. hirae</i> (47)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. hirae</i> (48)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. hirae</i> (53)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. hirae</i> (61)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. hirae</i> (66)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. hirae</i> (67)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. hirae</i> (68)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. hirae</i> (69)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. hirae</i> (71)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. hirae</i> (74)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. hirae</i> (82)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. hirae</i> (83)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. hirae</i> (90)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. hirae</i> (156)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. hirae</i> (248)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. hirae</i> (294)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. hirae</i> (298)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. hirae</i> (316)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. hirae</i> (327)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>E. durans</i> (17)	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
<i>E. durans</i> (251)	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>E. gallinarum</i> (144)	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+

Espécies identificadas (Número da Amostra)	Testes								
	POLYB	dMAL	dTRE	AGLU	PHOS	BGUR	dGAL	BACI	PUL
<i>E. hirae</i> (23)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. hirae</i> (24)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. hirae</i> (42)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. hirae</i> (45)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. hirae</i> (46)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. hirae</i> (47)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. hirae</i> (48)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. hirae</i> (53)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. hirae</i> (61)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. hirae</i> (66)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. hirae</i> (67)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. hirae</i> (68)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. hirae</i> (69)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. hirae</i> (71)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. hirae</i> (74)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. hirae</i> (82)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. hirae</i> (83)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. hirae</i> (90)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. hirae</i> (156)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. hirae</i> (248)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. hirae</i> (294)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. hirae</i> (298)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. hirae</i> (316)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. hirae</i> (327)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. durans</i> (17)	+	+	-	-	-	-	+	+	-
<i>E. durans</i> (251)	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. gallinarum</i> (144)	-	+	+	-	-	-	+	+	-

Espécies identificadas (Número da Amostra)	Testes										
	NaCl	MAN	SORB	ARG	RAF	SUC	MGP	AMY	APPA	LeuA	AlaA
<i>P. acidilactici</i> (85)	-	-	-	+	-	-	-	-	(-)	+	+
<i>P. pentosaceus</i> (444)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>Lactococcus lactis</i> (329)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Lactococcus lactis</i> (447)	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. warneri</i> (317)	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>S. warneri</i> (326)	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>S. hominis</i> (418)	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>S. hominis</i> (434)	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Kocuria rosea</i> (121)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Kocuria rosea</i> (136)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Kocuria rosea</i> (214)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Kocuria rosea</i> (215)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Kocuria rosea</i> (218)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Kocuria rosea</i> (228)	-	-	-	-	-	-	-	-	(-)	-	-
<i>Kocuria kristinae</i> (425)	(-)	-	-	-	-	(-)	+	-	-	-	+
Unidentified Organism (198)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Unidentified Organism (199)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Unidentified Organism (222)	-	+	-	-	+	+	(+)	-	-	-	-
Unidentified Organism (223)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Unidentified organism (263)	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
Unidentified organism (282)	-	-	-	+	+	+	+	(-)	-	-	-
Unidentified Organism (423)	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-

Espécies identificadas (Número da Amostra)	Testes										
	dRIB	NOVO	OPTO	PIPLC	CDEX	ProA	TyrA	ILATk	O129R	dXYL	AspA
<i>P. acidilactici</i> (85)	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i> (444)	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> (329)	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> (447)	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
<i>S. warneri</i> (317)	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. warneri</i> (326)	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. hominis</i> (418)	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. hominis</i> (434)	-	-	+	-	-	-	-	(-)	(-)	-	-
<i>Kocuria rosea</i> (121)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Kocuria rosea</i> (136)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Kocuria rosea</i> (214)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Kocuria rosea</i> (215)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Kocuria rosea</i> (218)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Kocuria rosea</i> (228)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Kocuria kristinae</i> (425)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Unidentified Organism (198)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Unidentified Organism (199)	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Unidentified Organism (222)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Unidentified Organism (223)	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-
Unidentified organism (263)	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
Unidentified organism (282)	+	-	+	-	+	-	-	-	(-)	-	+
Unidentified Organism (423)	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Espécies identificadas (Número da Amostra)	Testes										
	BGURr	LAC	SAL	BGAR	AGAL	URE	NAG	dMNE	BGAL	AMAN	PyrA
<i>P. acidilactici</i> (85)	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i> (444)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> (329)	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> (447)	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>S. warneri</i> (317)	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>S. warneri</i> (326)	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>S. hominis</i> (418)	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>S. hominis</i> (434)	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Kocuria rosea</i> (121)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kocuria rosea</i> (136)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kocuria rosea</i> (214)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kocuria rosea</i> (215)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kocuria rosea</i> (218)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kocuria rosea</i> (228)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kocuria kristinae</i> (425)	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Unidentified Organism (198)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Unidentified Organism (199)	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
Unidentified Organism (222)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Unidentified Organism (223)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Unidentified organism (263)	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
Unidentified organism (282)	-	+	+	-	(+)	-	+	+	+	-	+
Unidentified Organism (423)	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-

Espécies identificadas (Número da Amostra)	Testes								
	POLYB	dMAL	dTRE	AGLU	PHOS	BGUR	dGAL	BACI	PUL
<i>P. acidilactici</i> (85)	-	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>P. pentosaceus</i> (444)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> (329)	-	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>Lactococcus lactis</i> (447)	+	+	+	-	-	-	+	-	-
<i>S. warneri</i> (317)	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. warneri</i> (326)	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. hominis</i> (418)	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. hominis</i> (434)	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Kocuria rosea</i> (121)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kocuria rosea</i> (136)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kocuria rosea</i> (214)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kocuria rosea</i> (215)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kocuria rosea</i> (218)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kocuria rosea</i> (228)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kocuria kristinae</i> (425)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Unidentified Organism (198)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Unidentified Organism (199)	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Unidentified Organism (222)	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Unidentified Organism (223)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Unidentified organism (263)	+	+	+	-	-	-	-	+	-
Unidentified organism (282)	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Unidentified Organism (423)	-	+	-	-	-	-	-	+	-

Espécies identificadas (Número da Amostra)	Testes														
	MAN	SORB	ARG	SUC	PYU	APPA	BGAL	dMAL	AMAN	BGURi	dMLT	CMT	dGAL	PYRA	dMLZ
Unidentified Organism (87)	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>L. plantarum</i> (246)	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+
<i>L. paracasei</i> (278)	+	+	+	+	N	-	(+)	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>L. plantarum</i> (414)	-	-	-	+	N	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-

Espécies identificadas (Número da Amostra)	Testes														
	ILATk	dRIB	2KG	ODC	SUCT	BXYL	URE	AGU	MTE	ESC	PheA	TryA	O/129R	SAC	dSOR
Unidentified Organism (87)	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. plantarum</i> (246)	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>L. paracasei</i> (278)	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	(+)	+	+	+
<i>L. plantarum</i> (414)	-	(+)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-

Espécies identificadas (Número da Amostra)	Testes													
	IGLM	ELLM	dGLU	ProA	dTRE	AGAL	OPS	dXYL	PVATE	BGLU	LIP	CIT	GlyA	BdFUC
Unidentified Organism (87)	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
<i>L. plantarum</i> (246)	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>L. paracasei</i> (278)	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>L. plantarum</i> (414)	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+