

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

***Seleção de Bactérias Lácticas com Potencial
Probiótico para Uso como Veículos Vacinais Orais
Contra a Leptospirose Canina***

ORIENTADO: Bruno Campos Silva


ORIENTADOR: Prof. Dr. Álvaro Cantini Nunes

BELO HORIZONTE

Março - 2011

BRUNO CAMPOS SILVA

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS COM POTENCIAL
PROBIÓTICO PARA USO COMO VEÍCULOS VACINAIS ORAIS
CONTRA A LEPTOSPIROSE CANINA**



Dissertação apresentada ao Departamento de
Biologia Geral do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito para obtenção do grau
de mestre em Genética.

ORIENTADOR: ÁLVARO CANTINI NUNES

Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Geral
Belo Horizonte, MG

2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente ao meu orientador, Professor Álvaro Cantini Nunes por ter-me aberto as portas do laboratório, me proporcionando esta valiosa oportunidade de aprendizado, experiência e trabalho, pelos seus ensinamentos, pela confiança e o apoio durante a minha caminhada no mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética. Aos professores pertencentes à Genética que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Aos Professores do departamento de Microbiologia, Professor Jacques Nicoli, Professoras Elizabeth Neumann e Regina Nardi Drummond, aos demais colegas do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos (LEFM) pela paciência e colaboração em meus experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular (LGMPP) de Protozoários Parasitas, pessoas que colaboraram para que este trabalho fosse realizado, me passando muitos ensinamentos e experiências.

À minha família e amigos pelo apoio durante os meus estudos e durante esta jornada e por terem sido importantes para minha formação como pessoa e como estudante.

Ao CNPq pela bolsa de estudos e financiamento.

Enfim, á Deus a quem dedico todas as minhas conquistas e que sempre me dá forças para superar as dificuldades da minha vida.

Obrigado!

“Conhecimento é a chama que o vento não apaga, o tempo guarda, a humanidade usa e a natureza agradece.”

Antônio Gomes Lacerda

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. PROBIÓTICOS	3
1.2. MECANISMOS DE AÇÃO DE UM PROBIÓTICO	4
1.3. BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS (BAL) E LACTOBACILOS	7
1.4. ENTEROCOCCUS COMO PROBIÓTICOS	9
1.5. O MERCADO DOS PROBIÓTICOS	10
1.6. PATÓGENOS CANINOS	10
1.7. LEPTOSPIROSE EM CÃES	11
2. OBJETIVOS	14
2.1. OBJETIVO GERAL	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. AMOSTRAGEM	15
3.2. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA PRESUNTIVA DAS BACTÉRIAS LÁTICAS – COLORAÇÃO DE GRAM E TESTE DE CATALASE.....	15
3.3. MANUTENÇÃO DOS MICROORGANISMOS	15
3.4. OBTENÇÃO DO DNA GENÔMICO	15
3.5. IDENTIFICAÇÃO DOS LACTOBACILOS	16
3.6. CARACTERIZAÇÃO PROBIÓTICA.....	17
3.6.1. Resistência ao Suco Gástrico Artificial.....	17
3.6.2. Tolerância aos Sais Biliares.....	17
3.6.3 Hidrofobicidade da Superfície Celular.....	17
3.6.4. Antagonismo <i>in vitro</i>	18
3.6.5. Produção de Peróxido de Hidrogênio.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. CARACTERIZAÇÃO MORFOTINTORIAL E IDENTIFICAÇÃO.....	20
4.2. CARACTERIZAÇÃO PROBIÓTICA.....	22
4.2.1. Resistência ao Suco Gástrico Artificial.....	22
4.2.2. Resistência a Sais Biliares.....	24
4.2.3. Hidrofobicidade da Superfície Celular.....	27
4.2.4. Antagonismo <i>in vitro</i> e síntese de peróxido.....	29
4.3. PROBIÓTICOS EM POTENCIAL.....	33
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXOS E APÊNDICES	46

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E GRÁFICOS

FIGURA 1: Principais efeitos dos probióticos.....	4
FIGURA 2: Principais vias de imunomodulação promovida por um probiótico.....	6
FIGURA 3: Abundância de espécies isoladas.....	21
FIGURA 4: Antagonismo para <i>E. coli</i>	30
FIGURA 5: Perfis de produção de Peróxido de Hidrogênio para os isolados de fezes caninas.....	32
QUADRO 1: Espécies isoladas de fezes de cães lactentes.....	21
QUADRO 2: Taxa de inibição de crescimento dos isolados em presença do Suco Gástrico Artificial.....	24
QUADRO 3: Taxa de inibição de crescimento dos isolados em presença de Oxgall 0,3%.....	27
QUADRO 4: Porcentagem de associação dos isolados em Solvente Orgânico apolar.....	28
QUADRO 5: Teste de antagonismo <i>in vitro</i>	31
QUADRO 6: Avaliação Qualitativa dos perfis de produção de Peróxido de Hidrogênio.....	33
QUADRO 7: Síntese dos resultados de caracterização probiótica dos lactobacilos.....	34
ANEXO I: Perfis de digestão esperado para a determinação de espécies de Lactobacilos.....	46
APÊNDICE I: Curvas de Crescimento obtidas para os isolados de Lactobacilos em presença de Suco Gástrico Artificial.....	47
APÊNDICE II: Curvas de Crescimento obtidas para os isolados de Lactobacilos em presença de Oxgall 0,3%.....	57
APÊNDICE III: Teste de antagonismo <i>in vitro</i>	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A_{SB} – Absorbância do isolado desafiado

A_{CT} – Absorbância do isolado controle

BAL – Bactérias Ácidas Láticas

BHI – “Brain Heart Infusion” - Infusão Cérebro-Coração

CO_2 – Dióxido de Carbono

DNA – ácido desoxirribonucléico

DC-SIGN – sinal de célula dendrítica

EDTA – “Ethylenediamine tetraacetic acid” - ácido etilendiamino tetra-acético

EMJH - Ellinghausen – McCulloch – Johnson – Harris

FAO/WHO – “Food and Agriculture Organization/ World Health Organization” –
Organização da Alimentação e Agricultura/ Organização Mundial da Saúde

H_2O_2 – Peróxido de Hidrogênio

HIV – “Human immunodeficiency vírus” – Vírus da Imunodeficiência Humana

HRP – “horseradish peroxidase”

IFN- γ – Interferon gama

IL-6 – Interleucina 6

IL-12 – Interleucina 12

IMEVE – Indústria de Medicamentos Veterinários

INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial

ITS I – Espaçador Interno Transcrito I

KCl – Cloreto de potássio

KH_2PO_4 – Bifosfato de Potássio

LAB – Bactérias Ácidas Láticas

LiCl – Cloreto de Lítio

LPSN – “List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature” – Lista de Nomes de Procariotos com nomenclatura definida

MATS – Adesão microbiana à solventes

mL - mililitros

MRS – De Man Rogosa e Sharpe

NaCl – Cloreto de Sódio

Na₂HPO₄ - Di-hidrogenofosfato de Sódio

NO – Óxido Nítrico

ng - nanogramas

nm - nanômetros

OD – Optical Density – Densidade ótica

PB – Bactérias Probióticas

PCR – Reação em cadeia da polimerase

OMS – Organização Mundial da Saúde

SIBO – “Small Intestinal Bacteria Overgrowth” - Crescimento Exagerado de Pequenas Bactérias Intestinais

TES - Tris-HCl, EDTA e Sacarose

TGI – Trato gastrointestinal

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

pH – Potencial Hidrogeniônico

TMB - 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidina

TSB – Caldo Soja Triptona

UFC – unidades formadores de colônias

μ l – microlitros

RESUMO

Os lactobacilos são bactérias Gram-positivo, catalase negativo, fermentadoras de glicose e outros açúcares cujo produto final principal é o ácido lático. Devem apresentar várias características que façam delas candidatas em potencial a veículos de antígenos em processos de vacinação oral e bons probióticos. Neste estudo foram isoladas 79 bactérias de fezes de filhotes de cães de Crista Chinês e Yorkshire Terrier com cerca de 20 dias de vida, as quais foram submetidas à identificação molecular ao nível de gênero. Destas, 37 foram identificadas ao nível de espécie como lactobacilos e submetidas à caracterização probiótica. A fim de avaliar a viabilidade dos isolados perante os desafios do trato gastrintestinal, as bactérias foram testadas quanto a susceptibilidade ao baixo pH estomacal e aos sais biliares intestinais. A maior parte das bactérias foi resistente ao pH ácido do estômago e a maioria dos isolados apresentou inibição de crescimento leve ou moderada aos sais biliares. O potencial de adesão à superfície hidrofóbica do epitélio intestinal foi avaliado indiretamente pela capacidade dos isolados de se associarem a solventes orgânicos apolares, destacando-se sete isolados com superfície celular de alta hidrofobicidade. Quase todos os isolados apresentaram forte atividade antagonista contra os sete patógenos bacterianos testados. Porém, os isolados testados contra *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae não apresentaram halo de inibição ao crescimento do patógeno. A grande maioria dos isolados (34/37) mostrou-se produtora de peróxido de hidrogênio, substância antimicrobiana associada à colonização da mucosa vaginal. Por meio de todos os resultados obtidos foi possível selecionar sete isolados de lactobacilos como potenciais probióticos que podem vir a ser usados como veículos vacinais orais.

Palavras-chaves: lactobacilos, probióticos, veículos vacinais orais, antagonismo bacteriano, peróxido de hidrogênio.

ABSTRACT

Lactobacilos are Gram-positive bacteria, catalase negative, capable of fermenting glucose and other sugars with its final major product been lactic acid. They must have several characteristics to make them potentially good candidates as antigenic vehicles for oral vaccines and as good probiotics. Seventy nine bacteria were isolated from the feces of Chinese Crested and Yorkshire Terrier puppies, around 20 days old, and were submitted to molecular identification at the genus level. Of these, 37 were identified at the species level as *Lactobacillus*, and submitted to probiotic characterization. In order to evaluate the ability of the lactobacilli isolates to overcome gastrointestinal challenges, the bacteria were tested for susceptibility to the acidic pH 2.5 found in the stomach and bile salts found in the small intestine; most of the bacteria were resistant to acidic pH and showed slight to moderate growth inhibition by bile salts. The potential for adhesion to the hydrophobic surfaces of intestinal epithelia was indirectly evaluated by the capacity of the isolate to be associated with organic solvents, highlighting 7 isolates with highly hydrophobic cellular surfaces. Most of the isolates showed strongly antagonistic activity against the seven bacterial pathogens tested; however, the isolates tested against *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae showed no zone of inhibition to pathogen growth. The vast majority of the isolates (34/37) tested showed themselves to be producers of hydrogen peroxide, an antimicrobial substance associated with vaginal colonization. Through all of the results obtained, it was possible to select 7 lactobacilli isolates as potential probiotics that could be used as vehicles for oral vaccinations.

Key-words: Lactobacilos, probiotics, oral vaccines vehicles, bacterial antagonism, hydrogen peroxide.

1. INTRODUÇÃO

1.1. PROBIÓTICOS

Em 1908, Elie Metchnikoff, trabalhando no Instituto Pasteur na França, observou o surpreendente número de pessoas na Bulgária que viviam mais de 100 anos. Esta longevidade não podia ser atribuída às condições de saúde àquela época pois a Bulgária era um dos países mais pobres da Europa e a medicina não apresentava grandes avanços. O Dr. Metchnikoff também observou que os camponeses búlgaros consumiam muito iogurte. Ele isolou as bactérias do iogurte e descobriu que elas conferiam grandes benefícios à saúde dos indivíduos (Metchnikoff, 1908).

O termo probiótico quer dizer pró-vida ou a favor da vida e tem sido utilizado para descrever microrganismos benéficos à saúde. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a definição de bactérias probióticas é a de microrganismos vivos que quando administrados na quantidade adequada, conferem algum benefício à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001).

As bactérias probióticas (PB) têm sido utilizadas em uma variedade de alimentos, como laticínios, carnes e vegetais e para tratamento de infecções de superfície da mucosa tanto do trato gastrointestinal (TGI) como da vagina (Gillor *et al.* 2008). Uma grande variedade de probióticos tem sido usada como potenciais agentes terapêuticos, como por exemplo, as bactérias ácido-láticas (LAB; Carr *et al.* 2002), bifidobactérias (Picard *et al.* 2005), enterobactérias (Sartor, 2003) e a levedura *Saccharomyces* (Czerucka *et al.* 2007). De acordo com Susana Marta Isay Saad (2006) apresentamos o esquema abaixo com os principais efeitos dos probióticos no hospedeiro (**Figura 1**).

Estas bactérias podem estimular a imunidade do hospedeiro como mostrado na figura 1, pela produção de anticorpos e recrutamento de fagócitos, mas também pela modulação da resposta imune local e sistêmica do hospedeiro, através da produção de citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12 e óxido nítrico (NO) (Fuller, 1997).

Substâncias antimicrobianas são produzidas pelas PB e são importantes para a exclusão competitiva ou inibição da invasão por outras bactérias (Carr *et al.*; 2002). Estas substâncias podem ser ácidos graxos curtos (Carr *et al.* 2002), peróxido de hidrogênio, que é característico de lactobacilos (Eschenbach *et al.* 1989), toxinas de espectro restrito ou amplo sintetizadas nos ribossomos, chamadas bacteriocinas, ou ainda pode ser por bacteriófagos que são altamente específicos (Smith *et al.* 2007; Tagg e Dierksen, 2003).

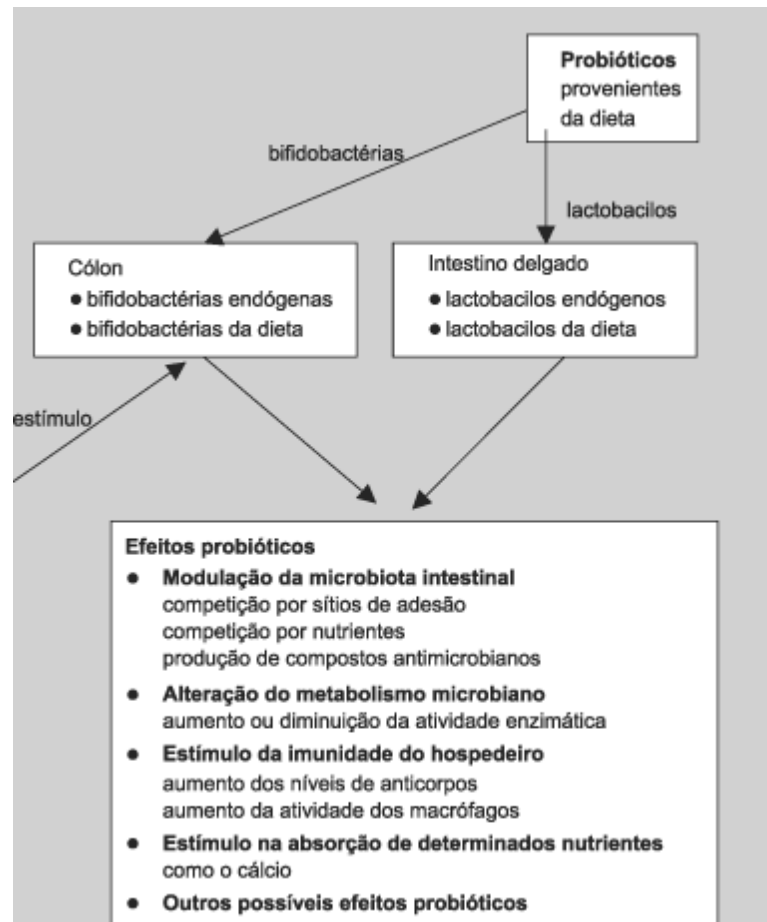


Figura 1: Principais efeitos dos probióticos (representados por lactobacilos e bifidobactérias) no hospedeiro. Fonte: Saad, 2006.

1.2. MECANISMOS DE AÇÃO DE UM PROBIÓTICO

Um probiótico deve se enquadrar em pelo menos uma das seguintes categorias: (I) inibição da proliferação de patógenos e restauração da homeostase da microbiota através de interações micróbio-micróbio; (II) promoção da função de barreira epitelial; ou (III) modulação da resposta imune do hospedeiro (Lebeer *et al.* 2008). As características probióticas são linhagem-dependentes (Mangoni, 2009; Jacobsen, 1999).

A capacidade dos lactobacilos em inibir patógenos é bem conhecida por estes serem usados há séculos na conservação de alimentos. A atividade antagonista acontece de três diferentes maneiras: competição por nutrientes, produção de antimicrobianos e exclusão competitiva.

A atividade antimicrobiana se dá pela produção de ácido láctico e outros ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas. Segundo De Keersmaecker *et al.* (2006) a síntese de ácido láctico pela linhagem GG de *L. rhamnosus* apresenta grande atividade

antimicrobiana contra *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium atuando no crescimento do patógeno bem como sobre os fatores de virulência deste patógeno. A maioria das bacteriocinas produzidas por lactobacilos pertencem à Classe II (pequeno tamanho, termoestável e com alto ponto isoelétrico) sendo capazes de combater infecções provocadas por *Listeria monocytogenes* (Corr *et al.* 2007). A produção de peróxido de hidrogênio é também um mecanismo antimicrobiano importante, especialmente no trato vaginal de mulheres saudáveis (Branco *et al.* 2010). Recentemente Pridmore *et al.* (2008) observaram que a atividade anti-*Salmonella* apresentada por *L. johnsonii* NCC533 deve-se à produção de peróxido de hidrogênio.

A atividade antagonista pode ser ainda por exclusão competitiva ou pela promoção da função de barreira epitelial, ocorrendo basicamente pela competição entre as linhagens patogênicas e os probióticos pelos mesmos sítios de adesão na mucosa intestinal ou por nutrientes. Desta forma, linhagens de lactobacilos mais competitivas apresentam melhores chances de adesão ao epitélio do intestino em detrimento de patógenos invasivos, promovendo a eliminação dos mesmos. Estudos existem avaliando os lactobacilos que possuem sítios de ligação em comum na mucosa intestinal com patógenos bacterianos como *E. coli* tipo 1 que se ligam a sítios receptores de oligossacarídeos (Lebeer *et al.* 2008). Vários fatores de exclusão competitiva putativos vêm sendo propostos, como a adesina específica à manose de *L. plantarum* (Pretzer *et al.* 2005), sendo que as bactérias mutantes para o gene demonstraram uma menor capacidade de adesão a células HT-29 e permitiram a aderência de *E. coli* enteropatogênica. Segundo Chen *et al.* (2007) extratos de proteínas da camada S de *L. crispatus* foram capazes de competir por sítios de adesão com *E. coli* enterohemorrágica e *Salmonella enterica*. Além da competição molecular, foi demonstrado que certas linhagens de lactobacilos são capazes de induzir a produção de mucinas (Mack *et al.* 2003), estimular a adesão célula a célula (Seth *et al.* 2008) e prevenir a apoptose pelas células intestinais (Yan *et al.* 2007), contribuindo e promovendo a manutenção da barreira epitelial.

A imunomodulação se dá principalmente pela indução de células dendríticas regulatórias e células T. O contato entre as superfícies externas das células dendríticas intestinais via receptores *Toll-like* e *DC-SIGN* (sinal da célula dendrítica) e dos probióticos (Moléculas de Associação) induz a produção de citocinas que promovem a apresentação de antígenos do complexo de histocompatibilidade e moléculas co-estimulatórias que polarizam células T em células T regulatórias e auxiliares do tipo 1 e 2 (Leeber, 2010) (**Figura 2**). Essa regulação é muito interessante, já que a associação de vacinas convencionais e probióticos pode gerar tanto uma resposta imune quanto uma proteção humoral mais eficiente (Mac Donald e Bell, 2010).

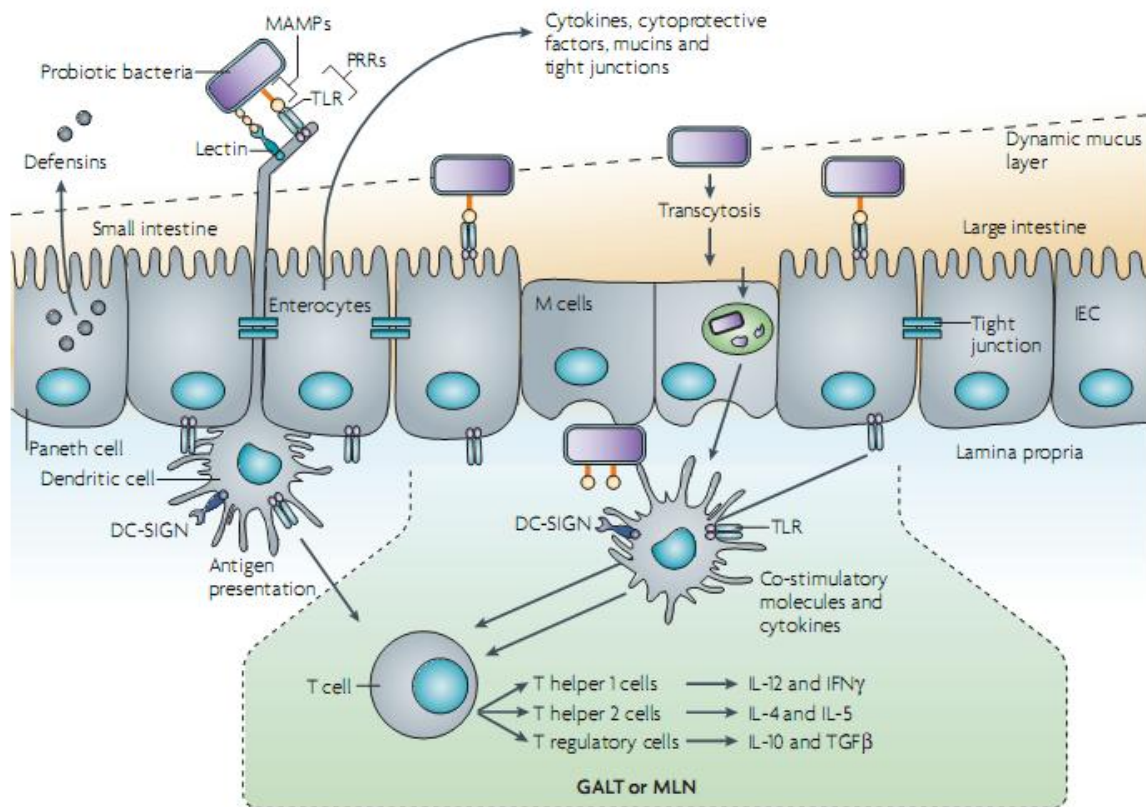


Figura 2: Principais vias de imunomodulação por um probiótico.

Um probiótico é capaz de interagir com as células dendríticas na lâmina própria através de suas prolongações entre as Células Epiteliais Intestinais e pela transcitose mediada pelas células M. O tipo de interação é capaz de induzir a produção de citocinas que podem atuar como adjuvante imune. (Leeber et al. 2010)

Entretanto, para funcionarem verdadeiramente como probióticos, as bactérias selecionadas devem ser capazes de resistir às condições adversas impostas pelo organismo do hospedeiro como as variações de pH ao longo do trato gastrintestinal, presença de sais biliares, enzimas gástricas, além de serem capazes de aderir à mucosa intestinal (Hoyos, 1997). Segundo Lan-Souz Chou e Bart-Weimer (1999) a bactéria probiótica deve resistir por no mínimo 90 minutos em pH ácido, que é o tempo de trânsito gástrico humano. É importante ainda considerar que um microrganismo probiótico não pode ter efeito no ambiente intestinal se sua população não atingir uma quantidade mínima de bactérias que varie entre 10^6 e 10^8 UFC no intestino humano (Charteris *et al.* 1998). Tais microrganismos não devem ter potencial patogênico, devem apresentar características que permitam a sua produção em larga escala, como uma fácil proliferação *in vitro*. Deste modo, testes indiretos *in vitro* baseados nos mecanismos de ação probiótica dos lactobacilos podem direcionar a seleção de isolados com características de interesse.

Os efeitos dos probióticos nos animais têm sido estudados, mas os resultados são algumas vezes contraditórios (Jin *et al.* 1997). Alguns estudos mostram que os probióticos são benéficos aos animais como promotores de crescimento (Fuller, 1989), enquanto outros dizem que estas bactérias não promovem efeito algum (Watkins e Kratzer, 1983; 1984). As variações nos resultados podem ser devidas as diferenças nas linhagens dos microrganismos ou ainda na variação do número de bactérias ingeridas na dieta.

Um dos aspectos mais importantes do uso de probiótico nos animais é com o objetivo de melhorar a resistência e a resposta imune aos agentes infecciosos (Greetham *et al.* 2002). Bactérias patogênicas estão frequentemente associadas às anormalidades do trato gastrintestinal dos cães, principalmente à desidratação e diarreia (Delles *et al.* 1994; Rutgers *et al.* 1995). Tem-se observado que probióticos previamente selecionados podem reduzir a diarreia em humanos e animais (Dunne *et al.* 1999; Fooks *et al.* 1999; Jin *et al.* 1998). Bactérias ácido-láticas constituem o maior grupo de probióticos para animais (Biourge *et al.* 1998; Dunne *et al.* 1999). Um grupo de pesquisadores do Japão mostrou a existência de lactobacilos na microbiota fecal canina (Mitusoka *et al.* 1976). Os lactobacilos fazem parte da microbiota natural de cães saudáveis e são encontrados em todo trato gastrintestinal, crescendo em quantidade desde o estômago até o cólon (de log 5 até log 11 ufc). Cães mais novos tendem a possuir maior quantidade de lactobacilos em relação aos cães mais velhos. Além de habitarem o trato gastrintestinal, também podem ser encontrados nos cães em locais como a cavidade oral, nasal e auditiva (Zink *et al.* 2008).

Apesar de estudos já terem demonstrado uma eficácia de alguns probióticos em mais de uma espécie de hospedeiro, como no caso de *L. rhamnosus* GG (Kailasapathy e Chin, 2000), as características probióticas de cada bactéria tendem a estar intimamente relacionadas ao hospedeiro de origem (Dunne *et al.* 1999; Ouwehand *et al.* 2002).

1.3. BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS (BAL) E LACTOBACILOS

Com o surgimento de patógenos emergentes e o reaparecimento de patógenos re-emergentes antigos e o desenvolvimento de linhagens resistentes à antibióticos, tem crescido o interesse na pesquisa e seleção de linhagens de LAB como probióticos, que possam ser usados para combater infecções bacterianas (McCoy e Gilliland, 2007). São bactérias que fazem parte da microbiota intestinal dos mamíferos e fermentam uma variedade de nutrientes em ácido lático como principal produto. Temos como principais gêneros pertencentes a esta classe, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactosphaera* e *Oenococcus* (Carr *et al.*; 2002).

Os lactobacilos são bactérias Gram-positivas, em forma de bastonetes ou cocobacilos, geralmente imóveis, não formadoras de esporos, anaeróbias aerotolerantes e catalase negativas. Taxonomicamente o gênero lactobacilos pertence ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales, família Lactobacillaceae. Os lactobacilos são nutricionalmente fastidiosos, precisando de um meio rico em nutrientes contendo carboidratos, aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos, sais, derivados de ácidos nucleicos e vitaminas para crescer (Carr *et al.* 2002). De acordo com J. P. Euzéby (LPSN, 2011) o gênero lactobacilos possui cerca de 171 espécies. Estão presentes também em muitos tipos de alimentos como cereais, bebidas fermentadas, queijos e produtos lácteos, carnes e derivados, dentre outros (Hammes e Hertel, 2003). São fermentadores de glicose, majoritariamente homofermentativos, em que o produto final é o ácido lático, mas há representantes heterofermentativos que produzem lactato, CO₂ e etanol em quantidades equimolares. Tem-se demonstrado que os lactobacilos exercem efeitos benéficos à saúde, principalmente no tratamento de infecções entéricas, como diarreias agudas, síndromes relacionadas ao uso de antibióticos (Sazawal *et al.* 2006) e infecções do trato urogenital, como vaginose em mulheres (Falagas *et al.* 2007).

Algumas linhagens de lactobacilos apresentam várias características que fazem deles potenciais candidatos a veículos de antígenos em processos de vacinação oral e bons probióticos. Entre elas, resistência a ácidos e sais biliares, persistência no trato gastrointestinal e modulação imunológica intrínseca pela produção de citocinas tipo interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 12 (IL-12) (Christensen *et al.*; 2002.; Mohamadzadeh *et al.*; 2005), além da capacidade de inibir patógenos. Essa capacidade de persistência no trato gastrointestinal é importante para um bom vetor vacinal, pois as vacinas orais requerem uma dose maior do que a necessária para vacinas veiculadas por via parenteral (Ryan, 2001). O contato íntimo com a mucosa permite, em princípio, a indução de uma resposta imune local contra o antígeno carregado pelo lactobacilo e a modulação imunológica elicitada pelo próprio veículo vacinal (Pouwels, 1996; 1998).

A segurança é um fator muito importante que deve ser levado em conta quando se trabalha com vetores vacinais vivos. Apesar do uso de vetores como *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, vírus *Vaccinia*, entre outros, os lactobacilos não apresentam patogenicidade residual (Atkins *et al.* 2006). Além de não comprometerem a segurança da vacina, principalmente se considerarmos indivíduos imunocomprometidos, vetores vacinais potencialmente patogênicos podem reduzir a eficácia da vacina, uma vez que estimulam respostas imunes contra si próprios.

Os lactobacilos têm sido empregados como vetores vacinais para toxinas tetânicas (Granette *et al.* 2001), antígenos protetores de *Bacillus anthracis* (Zegers *et al.* 1999), de *Clostridium* (Cho *et al.* 2000) e *Salmonella* (Kajikawa *et al.* 2007), glicoproteínas de

coronavírus (Ho *et al.* 2005), determinantes antigênicos do vírus influenza (Pouwels, 1996), urease de *Helicobacter pylori* (Corthèsy *et al.* 2005), antígenos pneumocócicos (Oliveira *et al.* 2003, 2006), receptores para o vírus HIV (Chang *et al.* 2003) e outros determinantes antigênicos virais (Lee *et al.* 2006). Em todos estes trabalhos, os lactobacilos provaram ser veículos vacinais eficientes, induzindo respostas imunes locais e sistêmicas contra os antígenos carreados.

Conhecimentos sobre a genética destes microrganismos ainda permanecem limitados, mas tem aumentado bastante, principalmente nos últimos anos, após o sequenciamento do genoma de *Lactobacillus plantarum* (Kleerebezem *et al.*; 2003), *Lactobacillus johnsonii* (Pridmore *et al.*; 2004), *Lactobacillus acidophilus* (Altermann *et al.*; 2005), *Lactobacillus sakei* (Chaillou *et al.*; 2005) e *Lactobacillus salivarius* (Claesson *et al.*; 2006). Contudo, já foram desenvolvidos vários sistemas de expressão de proteínas heterólogas para os lactobacilos, de expressão constitutiva e regulada, com diferentes formas de endereçamento celular do produto protéico, isto é, intracelular, extracelular ou associado à parede celular bacteriana. Nestes últimos, a proteína S, formadora da camada S, presente em diversas espécies de lactobacilos, é muito usada para a ancoragem de antígenos à superfície celular destas bactérias (Savijoki *et al.*; 1997; Jakava-Viljanen *et al.*; 2002).

1.4. ENTEROCOCOS COMO PROBIÓTICOS

O gênero enterococos caracteriza-se por ser constituído de microrganismos colonizadores transitórios do trato gastrointestinal, utilizados no tratamento das diarreias, principalmente devido à invasão por rotavírus. Em geral, são bactérias capazes de reduzir o LDL colesterol pela ativação do sistema enzimático hepático (Nadia, 2008). Além disso, *Enterococcus* sp. tem sido usadas no tratamento de colibacilose em animais e gastroenterites humanas. Também foi demonstrado que bactérias do gênero são capazes de produzir bacteriocinas capazes de inibir o crescimento de patógenos intestinais (Du toit *et al.* 2000).

Os enterococos possuem algumas características que os tornam bons candidatos a probióticos, como um crescimento muito rápido, habilidade de adesão e produção de ácido láctico e enterocinas estáveis (Strompfová, 2004). Em comparação aos lactobacilos, os enterococos possuem um tempo de reprodução três vezes mais rápido, o que os tornariam mais efetivos no combate a microrganismos patogênicos; são mais resistente ao pH ácido do estômago, sendo menos inibidos quando veiculados por via oral, com consequente ligação mais rápida nas paredes intestinais (Nadia, 2008). A principal espécie utilizada em produtos comerciais é o *E. faecium*, no entanto, ultimamente mais atenção tem sido dada ao *E. faecalis* como probiótico (Strompfová, 2004). Algumas linhagens de *E. faecalis* e *E.*

faecium são usadas em preparações comerciais probióticas de grande sucesso. Entretanto, como algumas linhagens de enterococos estão associadas a infecções humanas como endocardites, principalmente em pacientes imunocomprometidos no ambiente hospitalar, elas devem ser avaliadas quanto à presença de fatores de virulência antes do uso probiótico (Du toit *et al.* 2000).

1.5. O MERCADO DOS PROBIÓTICOS

Segundo um estudo da *Probiotics Market* (2009-2014) desenvolvido pela empresa de consultoria *Markets and Markets*, o mercado de probióticos alcançou ganhos de 15,9 bilhões de dólares no ano de 2008 e tende a alcançar 32 bilhões de dólares até 2014, oferecendo oportunidades para o desenvolvimento de alimentos funcionais para humanos e animais, terapias e prevenção de doenças. As principais empresas que trabalham com bactérias probióticas na atualidade são a Danisco, a Morinaga e a BioGaia que fornecem produtos para várias outras grandes companhias alimentícias como a Nestlé. O grande crescimento no mercado se dará pelos mercados europeu e asiático. No Brasil, a tendência é semelhante, a Danone e a Actmel deverão ter um crescimento anual em torno de 8,7% em três anos, superando a Nestlé, com 5,9% e a Unilever, com 4,2% (INPI, 2011).

A utilização de probióticos vem se tornando popular também na medicina veterinária. Entretanto, poucos são os produtos disponíveis no mercado para os cães (Strompfová *et al.* 2006). Dentre as empresas produtoras de probióticos para os cães destacam-se a Organnact Pet Probióticos, com produtos contendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae*; a IMEVE (Indústria de Medicamentos Veterinários), que possui produtos contendo bactérias do gênero *Bacillus* e produtos contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Enterococcus faecium*, e a Biocampo, que disponibiliza aditivos probióticos contendo BAL, dentre elas *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus*. Além destes, o produto probiótico comercial Vitacanis (Microbiol, Brasil) contendo *L. acidophilus*, *E. faecium* e *Saccharomyces cerevisiae*, desenvolvido para prevenir desarranjos intestinais em cachorros e gatos, mostrou proteção contra o desafio experimental realizado com *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (Maia *et al.* 2001).

1.6. PATÓGENOS CANINOS

A principal causa de desordens intestinais nos cães é o que se chama de SIBO (*small intestinal bactéria overgrowth*), ou seja, crescimento exagerado de pequenas bactérias intestinais. Isso envolve o crescimento de um grande número de diversos tipos de bactérias simultaneamente, geralmente incluindo espécies de *Enterobacteriaceae*, *Bacteróides* sp.,

Clostridium sp., enterococos e estafilococos. Destacam-se como patógenos entéricos caninos *Clostridium perfringens*, *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium e *Campylobacter jejuni*, sendo que os dois últimos apresentam potencial zoonótico. *Staphylococcus intermedius* é o patógeno cutâneo canino mais comum, podendo causar a piodermite estafilocócica canina e igualmente infectar a mucosa anal. A enterotoxina produzida pelo *C. perfringens* causa diarreia aguda e crônica intermitente (Rinkinen *et al.* 2003).

A *Escherichia coli* tem sido isolada a partir de amostras de solo, água e também do trato gastrointestinal de animais domésticos. Diversas cepas podem ser patogênicas e assumir, em algumas condições, caráter zoonótico. Devido a suas características microbiológicas, esse patógeno é utilizado como indicador de qualidade higiênico-sanitária de produtos industrializados. A importância deste achado está associada à ocorrência de osteomielite em cães e gastroenterite humana em indivíduos suscetíveis (Pereira *et al.* 2009).

As leptospirosas são espiroquetas móveis, flexíveis e filamentosas distribuídas em aproximadamente 160 hospedeiros mamíferos, dentre eles, destacam-se os cães. Os casos de leptospirose canina estão associados à espécie *Leptospira interrogans sensu lato* (Greene *et al.* 1998). Os sintomas da doença variam de diarreia a comprometimento renal e hepático, o patógeno possui potencial zoonótico de transmissão.

1.7. LEPTOSPIROSE EM CÃES

A transmissão da leptospirose para os seres humanos requer a circulação do patógeno entre os animais reservatórios. Os sorovares apresentam uma preferência, mas não exclusividade, por certos hospedeiros, nos quais não causam a doença na forma grave. Por exemplo, o cão é considerado o hospedeiro natural do sorovar Canicola e o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*) o hospedeiro natural do sorovar Icterohaemorrhagiae. Animais domésticos, principalmente os bovinos, suínos e cães são importantes na cadeia epidemiológica e podem ser portadores de determinados sorovares por períodos prolongados. Nos portadores naturais a infecção é crônica com colonização da bactéria nos túbulos renais e eliminação intermitente através da urina, sem evidências de alterações patológicas. A bactéria penetra na pele lesada ou por membranas mucosas. As bactérias após penetrarem, alcançam o sistema circulatório, migram para o líquido cefalorraquidiano, pois são altamente móveis, produzindo hialuronidases, multiplicando-se rápida e intensamente, atingindo vários órgãos, principalmente o fígado, rins, coração e músculo esquelético, sendo responsáveis pelo rompimento de pequenos vasos, causando as principais manifestações da leptospirose (vasculite). Os microrganismos no estágio inicial da doença são normalmente encontrados no sangue e líquido cefalorraquidiano (fase

leptospirêmica) e em fases mais avançadas na urina (fase imune ou leptospúrica) (Murray et al. 2000; Plank e Dean, 2000; Bharti *et al.* 2003; Wagenaar *et al.* 2007).

Os cães podem adquirir a infecção pela convivência com outros cães contaminados, bem como ratos que urinam em áreas em comum. Esses animais são considerados a principal fonte da leptospirose humana em áreas urbanas, pois vivem em estreito contato com o homem e podem eliminar leptospiras vivas através da urina durante vários meses, mesmo sem apresentar nenhum sinal clínico característico (Jouglard & Brod, 2000). Os sorovares mais comumente associados a leptospirose canina clássica são os sorovares Icterohaemorrhagiae e Canicola (Brihuega & Hutter, 1994). Entretanto casos associados com outros sorovares patogênicos como Pomona, Grippotyphosa e Bratislava foram relatados (Ross & Rentko, 2000).

As manifestações clínicas dependem de muitos fatores como a virulência e a dose do organismo infectante, assim como a idade e a imunidade do hospedeiro. Muitas manifestações clínicas têm sido encontradas na leptospirose canina, apesar dos cães poderem não exibir sinais clínicos desta. Infecções pelo sorovar Icterohaemorrhagiae têm sido associadas à grave comprometimento hepático e renal. A evolução é aguda, culminando com o óbito em poucos dias. O sintoma clínico mais evidente é a icterícia (Greene *et al.* 1998; Whol, 1996), mas também pode apresentar febre, mialgia, prostração e com a evolução do processo, o cão pode apresentar anúria, oligúria ou poliúria, indicando diferentes graus de comprometimento renal (Masuzawa *et al.* 1991). A doença causada pelo sorovar Canicola foi denominada de Moléstia de Stuttgart, por ter sido descrita inicialmente naquele local. A manifestação clínica da infecção se relaciona ao comprometimento renal, sem haver sintomas de comprometimento hepático (Greene *et al.* 1998). A icterícia não é observada nesses casos e a evolução é mais lenta. Os sintomas predominantes são aqueles relacionados com insuficiência renal progressiva e uremia como a perda de peso, poliúria, desidratação, emese, diarreia (nem sempre), ulcerações na cavidade oral e necrose da língua, nos casos mais avançados. A infecção pode não ser aparente.

O tratamento da leptospirose se dá por antibioticoterapia, as penicilinas e seus derivados são os antibióticos de primeira escolha no tratamento reduzindo em poucas horas a febre e a multiplicação do microrganismo, entretanto não são capazes de eliminar o estado de carreador de leptospira (Greene *et al.* 1998). Para isto, posteriormente, devem-se administrar antibióticos como tetraciclina, eritromicina, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas.

A imunidade na leptospirose canina é basicamente do tipo humoral. A imunidade é sorovar-específica e em menor extensão, pode ser específica do sorogrupo. As vacinas contra leptospirose são constituídas por leptospiras mortas (bacterinas) ou por antígenos protéicos da membrana externa dos sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae. Deste modo, infecções com os sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae têm diminuído desde os

anos 80, enquanto que as infecções por outros sorovares têm aumentado (Wohl, 1996). Novas vacinas (Duramune Max 5/4L and LeptoVax 4, Fort Dodge Animal Health) que incluem os sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Grippotyphosa tornaram-se disponíveis. Entretanto, estudos que dizem a respeito a eficácia destas vacinas contra uma infecção natural ou experimental com os sorovares Pomona ou Grippotyphosa ainda não foram encontrados na literatura (Paul *et al.* 2003). A vacina protege contra o desenvolvimento da doença clínica, mas nem sempre previne contra instalação das leptospiros no rim (Broughton e Scarnell, 1985). O cão torna-se um portador, condição essa que somente pode ser resolvida com o uso de antibióticos.

Por serem os cães sugeridos como reservatórios de bactérias patogênicas ao homem, como a *Salmonella* (Fukata *et al.* 2002) e *Leptospira* (Brod *et al.* 2005), representando um risco potencial a saúde pública; ainda por serem poucos os produtos probióticos comerciais de origem canina e, muitos deles conterem *Enterococcus faecium*, bactérias questionadas quanto à sua segurança ao hospedeiro (Franz *et al.* 1999, Rinkinen *et al.* 2003); e pela necessidade de obtermos bactérias probióticas para uso como vetores vacinais, foram isoladas novas linhagens de lactobacilos de fezes caninas, que foram identificadas molecularmente ao nível de espécie e caracterizadas quanto ao seu potencial probiótico.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Os lactobacilos mostram-se excelentes candidatos para veiculação de vacinas orais geneticamente construídas, podendo ser usados como carreadores de vacinas para doenças como a Leptospirose. Deste modo, o objetivo deste trabalho é isolar e selecionar novas linhagens de bactérias lácticas que sejam adaptadas ao ecossistema gastrointestinal dos cães, que apresentem características probióticas, e que possam ser usadas numa futura etapa de vacinação.

Objetivos Específicos

1. Isolar bactérias do gênero lactobacilos do trato gastrointestinal de cães lactentes.
2. Selecionar as linhagens com as seguintes propriedades probióticas *in vitro*:
 - 2.1- tolerância ao suco gástrico artificial e aos sais biliares;
 - 2.2- alta hidrofobicidade da superfície celular;
 - 2.3- capacidade antagonista contra patógenos;
 - 2.4- produção de peróxido de hidrogênio.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAGEM E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS LÁTICAS

Foram realizadas duas coletas de fezes de cães lactentes, sendo a primeira de dois filhotes com 20 dias de idade de cães da raça Crista Chinês e a segunda de quatro filhotes de Yorkshire Terrier de 21 dias de idade. Nenhum dos cães havia sido vacinado ou submetido a tratamento com antibióticos. Obtiveram-se duas amostras de fezes na primeira coleta e quatro amostras na segunda coleta, que foram mantidas a 4°C durante o transporte até o processamento imediato em laboratório. Em seguida, estas foram tituladas em salina tamponada (5,61g NaCl, 1,0g KH₂PO₄, Na₂HPO₄, 0,11g KCl por litro), plaqueadas pour plate em ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Merck) e incubadas em câmara de anaerobiose (Forma Scientific Company, Marrietta, USA) por 24 - 48 horas a 37°C. As colônias foram contadas e cada morfotipo diferente foi isolado com auxílio de uma alça de platina e plaqueado por estriamento em ágar MRS (Difco) nas mesmas condições anteriores. Deste isolado, apenas uma colônia foi inoculada em 5 mL de caldo MRS.

3.2. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA PRESUNTIVA DAS BACTÉRIAS LÁTICAS – COLORAÇÃO DE GRAM E TESTE DE CATALASE

A caracterização morfológica se deu pelo método de Gram e as bactérias Gram positivo e com formato bacilar foram submetidas ao teste de catalase. Aquelas que se apresentaram como catalase negativo foram selecionadas.

3.3. MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Os microrganismos selecionados foram inoculados em 5 mL de caldo MRS (Merck) e incubados em anaerobiose, à 37°C por 24 horas. Após o crescimento, uma alíquota de 1 mL de cada tubo foi transferida para microtubo *Eppendorf* e adicionado glicerol esterilizado para 20% v/v, sendo em seguida mantidos em *deep freezer* (Bio Freezer, Forma Scientific, Marieta, Ohio) a -80°C, para posterior utilização, quando necessário.

3.4. OBTENÇÃO DO DNA GENÔMICO

Os isolados foram crescidos a 37°C por 18 horas em 10 mL de caldo MRS. As amostras foram centrifugadas por 1 min a 12.000 xg, lavadas com 1mL de LiCl 5M e

mantidas sob agitação durante uma hora. Em seguida, foram novamente centrifugadas, o pellet foi lavado com 1mL de água deionizada, ressuspenso em tampão TES (50mM de Tris-HCl pH 8.0, 10mM de EDTA e 25mM de Sacarose) com lisozima 10mg/mL e mantido a 37°C durante uma hora. A amostra foi mais uma vez centrifugada e o DNA genômico foi obtido utilizando-se o kit NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.5. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS LACTOBACIOS

O método de identificação baseou-se na análise de restrição do DNA entre os genes 16S e 23S do RNA ribossômico amplificado por PCR de acordo com Moreira *et al.* (2005). O espaçador Interno Transcrito I (ITS I) foi amplificado utilizando 10 pmols de cada um dos iniciadores 16-1A (5' GAATCGCTAGTAATCG 3') e 23-1B (5' GGGTTCCCCATTCGGA 3') como descrito por Tilsala *et al.* (1997), PCR Master Mix (Promega) na concentração de uma vez e 100 ng de DNA genômico. A amplificação se deu ao longo de 35 ciclos (95°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) após a desnaturação inicial (95°C por 2 minutos) e finalizada pela extensão final (72°C por 5 minutos). Os amplicons obtidos foram submetidos à restrição utilizando 12 enzimas (*SphI*, *NcoI*, *NheI*, *SspI*, *Csp45I*, *EcoRV*, *DraI*, *VspI*, *HincII*, *EcoRI*, *HindIII* e *AvrII*) de acordo com as especificações do fabricante e incubados por 2 horas a 37° C.

Os isolados que não apresentaram perfil compatível com o existente no **Anexo I**, foram submetidos à uma reação de PCR da região 16S do rDNA com 10 pmols dos iniciadores 1492R (59-GGTTACCTTGTTACGACTT- 39) e 27F (59-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-39) como descrito por Reysenbach *et al.* (2000). A amplificação se deu ao longo de 35 ciclos (95°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) após a desnaturação inicial (95°C por 2 minutos) e finalizada pela extensão final (72°C por 5 minutos). Os amplicons foram purificados com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, Madison, WI, USA) e enviados para o sequenciamento no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE), localizado no Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.6. CARACTERIZAÇÃO PROBIÓTICA

3.6.1. Resistência ao Suco Gástrico Artificial

O teste de resistência a ácidos baseado em Neumann *et al.* (1991) foi adaptado para microplacas. Culturas de lactobacilos em fase estacionária foram ressuspensas em 1 mL de solução salina 0,9% pH 7,0 e em 1 mL de suco gástrico artificial (NaCl 2g/L ajustado com HCl concentrado para pH 2,5) e incubadas a 37°C por 3h. Posteriormente, a solução salina 0,9% e o suco gástrico artificial foram desprezados e os pellets ressuspensos com 1 mL de caldo MRS. As culturas foram novamente inoculadas a 2% em caldo MRS em uma microplaca em triplicata que foi incubada em um *Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340* (Molecular Devices, CA, USA) a 37°C por 18 horas. A OD_{620nm} foi determinada a cada 30 minutos. A porcentagem de inibição foi calculada segundo a fórmula $1 - A_{SG}/A_{CT} \times 100$ após 6h de incubação, onde A_{SG} significa a absorbância da amostra desafiada com o suco gástrico artificial e A_{CT} significa a absorbância da amostra controle. Também foi realizado o cálculo da área sob a curva de cada gráfico pelo programa OriginPro 8.5 (OriginLab). Os resultados foram baseados no cálculo da média de três experimentos independentes.

3.6.2. Tolerância aos Sais Biliares

Foi avaliada de acordo com Walker e Gilliland (1993) adaptado para microplacas. Inicialmente os isolados de lactobacilos foram crescidos a uma OD_{620nm} de 0,6 e feito o inóculo de 2% em caldo MRS contendo ou não 0,3% de oxgall (Oxoid Co.) em uma microplaca. A OD_{620nm} foi determinada em intervalos de 30 minutos durante 18 horas de incubação a 37°C no *Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340*. A porcentagem de inibição foi calculada segundo a fórmula $1 - A_{SB}/A_{CT} \times 100$ após 6h de incubação, onde A_{SB} significa a absorbância da amostra desafiada com o oxgall e A_{CT} significa a absorbância da amostra controle. Também foi feito o cálculo da área sob a curva de cada gráfico pelo programa OriginPro 8.5 (OriginLab). Os resultados basearam-se na média de três experimentos independentes.

3.6.3. Hidrofobicidade da Superfície Celular

A hidrofobicidade da superfície celular bacteriana foi avaliada através da medida do MATS (microbial adhesion to solvents) conforme descrito em Pelletier *et al.* (1997) e Kos *et al.* (2003). Culturas de lactobacilos em fase estacionária foram lavadas duas vezes com

salina tamponada e ajustadas para uma OD_{600nm} de 0,6 com 0,1M de KNO₃, pH 6.2 (A₀). Um volume 0,2 mL de xileno foi adicionado a uma suspensão de 1,2 mL de células e após 10 minutos de pré-incubação a temperatura ambiente, as duas fases do sistema foram homogeneizadas em vortex por 2 minutos. A fase aquosa foi removida após 30 minutos e sua OD_{600nm} medida (A₁). A porcentagem de MATS foi calculada $(1-A_1/A_0) \times 100$. Os isolados foram classificados como de alta (66,67 a 100%), média (33,37 a 66,66%) e baixa hidrofobicidade (0 a 33,33%) segundo proposto em Nader-Macías *et al.* (2008). Os resultados obtidos basearam-se na média de três experimentos.

3.6.4. Antagonismo *in vitro* contra patógenos bacterianos

O procedimento se deu segundo metodologia de Branco *et al.* (2010). Placas contendo MRS ágar 1,5% foram preparadas e armazenadas 24 horas a 4°C e em seguida incubadas durante 12 horas a 37°C. Cinco µL dos isolados reativados foram inoculados em MRS ágar 1,5%, mantendo um spot definido e foram incubados por 18 horas em anaerobiose a 37°C. Em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Acumedia) seis bactérias patogênicas – *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli* ATCC 25723, *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 – foram ativadas com inóculo de 2% e crescidas a 37°C durante 18 horas, com dois repiques subsequentes realizados. Em caldo TSB (caldo soja triptona, Oxoid Co.) suplementado com extrato de levedura 0,5% (Acumedia) o patógeno *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 foi ativado com inóculo de 2% e crescido a 28-30°C durante 18 horas, com dois repiques subsequentes realizados. O patógeno *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae foi cultivado em meio EMJH (Ellinghausen – McCulloch–Johnson–Harris, Difco, BD Biosciences), preparado conforme o fabricante e suplementado com *Leptospira* Enrichment EMJH (Difco, BD Biosciences). Para o meio semi-sólido foi acrescido 0,2% de ágar (Bacto Agar, Difco), tornando o meio adequado para a manutenção de culturas. Uma amostra com bom crescimento, mostrando o anel típico sobre o ágar, foi inoculada (0,5 ml em 5 ml de meio = 10%) do meio semi-sólido para o meio líquido e incubada a 28-30°C por três a cinco dias, tempo suficiente para o crescimento bacteriano, observado pela turvação delicada e clara do meio após este período de tempo. Os seis patógenos ativados em caldo BHI foram inoculados a 0,5% em BHI semi-sólido (0,75% de ágar bacteriológico) e foram vertidos sobre as placas contendo os lactobacilos mortos com vapor de clorofórmio (2 ml em papel filtro), formando uma sobrecamada. Para a *Listeria monocytogenes* foi utilizado o meio TSB semi-sólido (0,75% de ágar bacteriológico), onde foram feito inóculos a 0,5% para formar a sobrecamada nas placas. A amostra de *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae foi inoculada a

10% em meio EMJH semi-sólido e vertida nas placas, formando a sobrecamada. A atividade antagonista foi avaliada medindo-se os halos de inibição, com um paquímetro, após incubação das placas. As placas contendo os seis patógenos inoculados no meio BHI foram incubadas a 37°C durante 24 horas em aerobiose, as demais placas contendo a *Listeria* e a *Leptospira* foram incubadas a 28-30°C durante 24 horas em aerobiose.

3.6.5. Produção de peróxido de hidrogênio

Os isolados produtores de peróxido de hidrogênio foram identificados segundo metodologia de Rabe & Hillier (2003). Inicialmente, 2 µL de culturas de *Lactobacillus*, em fase estacionária, foram inoculados em ágar TMB-Plus com 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e *horseradish peroxidase* (HRP), e incubado a 37°C por 18h em anaerobiose. Posteriormente, as placas foram expostas ao ar por 30 min, para o aparecimento do pigmento azul, caso houvesse produção de H₂O₂. A intensidade da coloração foi definida como +++ para azuis intensos (quase marrom), ++ para azul, + para coloração azul fraca ou somente nas bordas e – ausência de cor.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOTINTORIAL E IDENTIFICAÇÃO

Das amostras de fezes dos animais obteve-se 79 isolados que foram selecionados de acordo com as características morfológicas (Gram e forma bacilar) e fisiológicas (catalase), Destes 41 isolados foram caracterizados como Gram positivo e catalase negativo.

A identificação molecular seguiu a proposta de Moreira *et al.* (2005) que é capaz de estabelecer 41 das 106 espécies de lactobacilos. O método se baseia na presença de inserções gênicas (tRNAs) na região do espaçador transcrito da região 16S e 23S rRNA. A amplificação desta região genômica é capaz de estabelecer três grupos de gêneros de bactérias do ácido láctico: *Streptococcus/Lactococcus* com um único espaçador, *Enterococcus* com dois espaçadores de tamanhos diferentes, e *Lactobacillus/Weissella/Pediococcus* com três espaçadores de tamanhos diferentes. Desse modo, dos 41 isolados, 37 apresentaram três espaçadores, pertencendo ao grupo do gênero *Lactobacillus*.

Em seguida, deu-se a digestão enzimática dos amplicons das amostras pertencentes ao grupo do gênero lactobacilos. Doze enzimas foram utilizadas (*SphI*, *NcoI*, *NheI*, *SspI*, *Csp45I*, *EcoRV*, *DraI*, *VspI*, *HincII*, *EcoRI*, *HindIII* e *AvrII*) e com elas foi possível identificar dez espécies de *Lactobacillus* (**Figura 3; Anexo I**) com a seguinte distribuição: *L. reuteri* (52%), *L. fructivorans* (12%), *L. animalis* (9%), *L. murinus* (6%), *L. sanfranciscensis* (6%), *L. plantarum* A (3%), *L. acidophilus* (3%), *L. salivarius* (3%), *L. sakei* (3%), e *L. paralimentarius* (3%). Sete isolados não foram identificados através dos perfis de restrição. O isolado número 2 não foi identificado devido ao baixo rendimento do DNA, os isolados número 17, 18, 19, 20, 21 e 22 não mostraram perfis que puderam ser identificados de acordo com o Anexo I. Estes isolados foram submetidos ao sequenciamento da região 16S rDNA (NAGE). Após o sequenciamento, foi possível identificar mais quatro isolados, dentre eles o número 2 (*L. reuteri*), 17 (*Enterococcus hirae*), 18 (*L. animalis*), 19 (*Enterococcus faecium*) 20 (*Enterococcus faecalis*), 21 (*L. reuteri*) e 22 (*Enterococcus hirae*). Os isolados 17, 19, 20 e deveriam ter sido excluídos após a amplificação da região do espaçador transcrito da região 16S-23S rDNA e também pelo teste de gram, já que se apresentariam na forma de cocos gram positivo e não como bacilos gram positivo. Os dados referentes ao sequenciamento da região 16S rRNA encontram-se no **apêndice IV**. A relação dos isolados e sua respectiva identificação encontra-se na **Quadro 1**.

A abundância de espécies é demonstrada na figura 2, sendo a espécie *L. reuteri* a mais prevalente, correspondendo aproximadamente a 50% dos isolados. No trabalho de McCoy e Gilliland (2004) dos 22 isolados de lactobacilos isolados, 18 correspondiam a *L. reuteri*, representando a maioria das amostras, corroborando os resultados encontrados

nas amostras do presente estudo. Entretanto, Beasley (2004) fez o isolamento e a identificação de bactérias ácido-láticas de fezes caninas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA e identificou LAB em 67% das amostras, sendo 16,2% *Lactobacillus rhamnosus*, 12,6% *Lactobacillus casei* e 10,8% *Lactobacillus salivarius*. O *L. reuteri* é considerada a espécie mais prevalente entre os lactobacilos que habitam a microflora intestinal dos humanos, mamíferos e aves. Possuem um amplo espectro de hospedeiros, como ovelhas, frangos, porcos e roedores, podendo também ser encontrados em alimentos, como na carne, no leite e seus derivados (Semjonovs *et al.* 2008). Das espécies identificadas neste trabalho, *L. salivarius*, *L. reuteri* e *L. murinus* já foram previamente encontradas em fezes caninas por outros autores (Fujisawa and Mitsuoka, 1996; Greetham *et al.*, 2002).

Quadro 1: Espécies de bactérias lácticas isoladas de fezes de cães lactentes.

Isolado	Espécie	Isolado	Espécie
1	<i>Lactobacillus animalis</i>	19	<i>Enterococcus faecium</i>
2	<i>Lactobacillus reuteri</i>	20	<i>Enterococcus faecalis</i>
3	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	21	<i>Lactobacillus reuteri</i>
4	<i>Lactobacillus reuteri</i>	22	<i>Enterococcus hirae</i>
5	<i>Lactobacillus reuteri</i>	23	<i>Lactobacillus murinus</i>
6	<i>Lactobacillus animalis</i>	24	<i>Lactobacillus murinus</i>
7	<i>Lactobacillus reuteri</i>	25	<i>Lactobacillus salivarius</i>
8	<i>Lactobacillus reuteri</i>	26	<i>Lactobacillus reuteri</i>
9	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	27	<i>Lactobacillus reuteri</i>
10	<i>Lactobacillus reuteri</i>	28	<i>Lactobacillus sakei</i>
11	<i>Lactobacillus reuteri</i>	29	<i>Lactobacillus fructivorans</i>
12	<i>Lactobacillus reuteri</i>	30	<i>Lactobacillus fructivorans</i>
13	<i>Lactobacillus reuteri</i>	31	<i>Lactobacillus fructivorans</i>
14	<i>Lactobacillus reuteri</i>	32	<i>Lactobacillus fructivorans</i>
15	<i>Lactobacillus plantarum A</i>	33	<i>Lactobacillus reuteri</i>
16	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	34	<i>Lactobacillus reuteri</i>
17	<i>Enterococcus hirae</i>	35	<i>Lactobacillus reuteri</i>
18	<i>Lactobacillus animalis</i>	36	<i>Lactobacillus reuteri</i>
		37	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>

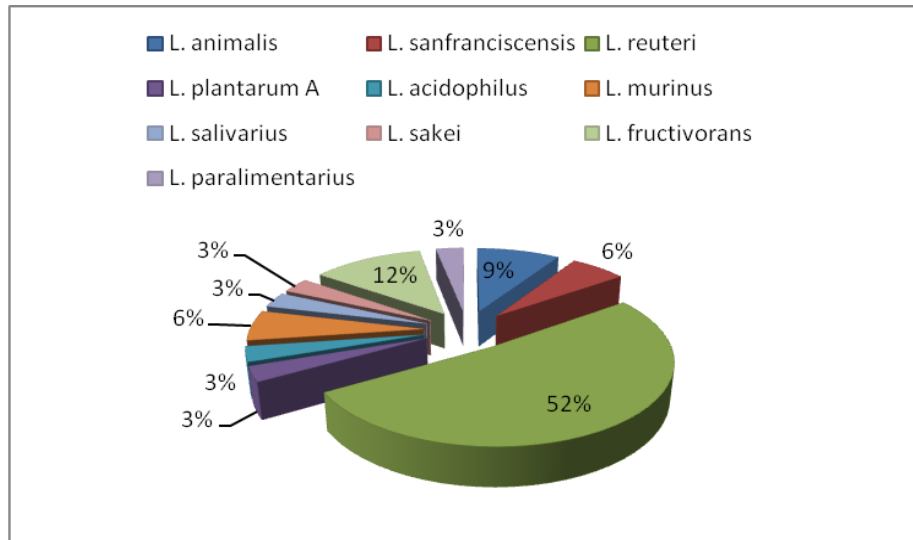


Figura 3: Abundância de espécies de lactobacilos isoladas de fezes caninas.

4.2 – CARACTERIZAÇÃO PROBIÓTICA:

4.2.1 – Resistência ao Suco Gástrico Artificial

Para promover os efeitos benéficos o probiótico deve resistir e manter a viabilidade sob as condições adversas ou desafios impostos pelo organismo do hospedeiro. O primeiro destes desafios é o suco gástrico, que contém as enzimas gástricas digestivas que funcionam em um pH extremamente baixo. Muitas bactérias não sobrevivem bem em pH ácido (Jin et. al. 1998), os efeitos adversos do baixo pH na fisiologia da bactéria ainda não foram completamente entendidos, mas a acidificação interna reduz a atividade de enzimas sensíveis, o que resulta em danos para proteínas e para o DNA (Leeber *et al.* 2008). Sabe-se que a fisiologia do trato digestivo dos cães é diferente em relação aos seres humanos e que o pH no estômago está em torno de 3,4 (Zink *et al.* 2008).

Os gráficos referentes ao crescimento das bactérias são apresentados no **Apêndice I** e a porcentagem de inibição de cada isolado é apresentada no **Quadro 2**. A porcentagem de inibição foi calculada de duas maneiras diferentes e os resultados comparados, primeiramente através da porcentagem de inibição após 6 horas de crescimento e depois pelo cálculo da área sob a curva dos gráficos. Alguns isolados apresentaram grande diferença entre os resultados obtidos pelas duas formas de avaliação do crescimento, um exemplo foi o isolado número 4 que apresentou uma taxa de inibição de 51% em 6 horas e 12,95% pela área sob a curva do gráfico. Outros, entretanto, não mostraram grande diferença nos valores da taxa de inibição, como o isolado 22 (6h = 12,98%, área = 15,95%).

O cálculo da área sob a curva dos gráficos se mostrou mais coerente, pois leva em consideração as 18 horas de crescimento medidas e não apenas um único ponto no gráfico de crescimento bacteriano, correspondente às 6 horas. Portanto, pelo cálculo da área sob a

curva dos gráficos observamos que quase todas as amostras puderam ser consideradas resistentes ao pH ácido, sendo os isolados 1 (*L. animalis*, -20,2%), 2 (*L. reuteri*, 0,55%), 3 (*L. sanfranciscensis*, 1,88%), 5 (*L. reuteri*, 3,49%), 6 (*L. animalis*, 0,52%), 7 (*L. reuteri*) (5,29%), 8 (*L. reuteri*, 5,27%), 9 (*L. sanfranciscensis*, 0,96%), 10 (*L. reuteri*, 1,02%), 11 (*L. reuteri*, 3,12%), 12 (*L. murinus*, 1,49%), 13 (*L. reuteri*, 2,58%), 14 (*L. reuteri*, 0,94%), 15 (*L. plantarum* A, 1,75%), 16 (*L. acidophilus*, 4,78%), 17 (não identificado, 2,84%), 18 (não identificado, 1,19%), 19 (não identificado, 1,09%), 20 (*L. reuteri*, 1,24%), 21 (não identificado, 0,87%), 23 (*L. murinus*, 3,9%), 24 (*L. murinus*, -0,98%), 25 (*L. salivarius*, -1,9%), 26 (*L. reuteri*, -0,03), 27 (*L. reuteri*, 0,59%), 28 (*L. sakei*, 3,42%), 29 (*L. fructivorans*, 2,44%), 30 (*L. fructivorans*, 4,78%), 31 (*L. fructivorans*, 8,07%), 32 (*L. fructivorans*, 8,64%), 33 (*L. reuteri*, 1,46%), 34 (*L. reuteri*, -0,5%), 35 (*L. reuteri*, 0,23%) e 37 (*L. paralimentarius*, 9,78%).

Strompfová *et al.* (2006), verificando a viabilidade de uso de *L. fermentum* AD1 como probiótico para cães saudáveis, obtiveram uma taxa de sobrevivência da bactéria em pH 3,0 depois de 3 horas de incubação a 37°C de aproximadamente 86,8%, ou seja, uma taxa de inibição de crescimento de 13,2%. A taxa de sobrevivência foi considerada suficiente, entretanto um pouco baixa em pH ácido (Strompfová *et al.* 2006). A maior parte (35/37) dos isolados em nosso estudo mostraram uma porcentagem de inibição, em pH 2,5, variável de 0 a 13,2%, podendo suas taxas de inibição serem consideradas como suficientes com base no trabalho do grupo de Strompfová. Os isolados 4 (*L. reuteri*, 12,95%), 22 (não identificado, 15,95%) e 36 (*L. reuteri*, 11%) foram os únicos que apresentaram taxas de inibição acima de 10%, as quais classificamos como tolerantes. O resultado obtido corrobora com outros autores (Morelli, 2000) que observaram que bactérias de origem intestinal tendem a ser mais resistentes aos ácidos estomacais.

Quadro 2: Taxa de inibição de crescimento dos isolados em presença de suco gástrico artificial em 6h e pela área sob a curva do gráfico.

Isolado	% Inibição 6h	% Inibição Área	Isolado	% Inibição 6h	% Inibição Área
1	8,47	-20,2	19	1,32	1,09
2	-0,08	0,55	20	2,16	1,24
3	0,22	1,88	21	-1,29	0,87
4	51	12,95	22	15,98	15,95
5	5,29	3,49	23	4,31	3,90
6	-1,86	0,52	24	-3,16	-0,98
7	14,34	5,29	25	-1,22	-1,9
8	15,35	5,27	26	1,08	-0,03
9	0,37	0,96	27	1,17	0,59
10	1,23	1,02	28	4,92	3,42
11	3,26	3,12	29	0,61	2,44
12	1,61	1,49	30	9,07	4,78
13	0,41	2,58	31	10,47	8,07
14	0,14	0,94	32	11,08	8,64
15	-3	1,75	33	1,96	1,46
16	9,5	4,78	34	-1,54	-0,5
17	3,07	2,84	35	1,93	0,23
18	3,16	1,19	36	14,35	11
			37	11,91	9,78

4.2.2 - Resistência a Sais Biliares

Além de ter que tolerar o pH ácido no estômago, os probióticos têm como desafio os sais biliares intestinais. Os sais biliares representam moléculas anfipáticas com atividade antimicrobiana, agindo como detergentes, rompendo membranas biológicas (Leeber *et al.*, 2008). A concentração intestinal dos ácidos biliares no trato intestinal humano é de aproximadamente 0,3%, entretanto no trato intestinal canino pouco se sabe a respeito deste parâmetro (Strompfová, 2006). Sabe-se também que a taxa de resistência aos sais biliares tende a variar entre as bactérias ácido lácticas e entre as linhagens de uma mesma espécie (Xanthopoulos, 1997).

Os gráficos que mostram o crescimento bacteriano em presença de oxgall 0,3% são apresentados no **Apêndice II** e a porcentagem de inibição para cada isolado é apresentada na **Quadro 3**. A porcentagem de inibição foi calculada de duas maneiras diferentes e os resultados comparados, primeiramente através da porcentagem de inibição após 6 horas de

crescimento e depois pelo cálculo da área sob a curva dos gráficos. Notou-se uma diferença em todos os isolados entre os resultados nos cálculos da porcentagem de inibição por 6h de crescimento e pela área dos gráficos. O cálculo da área dos gráficos se mostrou mais coerente, pois levou em consideração as 18 horas de crescimento e não apenas um único ponto do gráfico correspondente à 6 horas.

No trabalho desenvolvido por Stropfová *et al.* (2006) a taxa de sobrevivência de *L. fermentum* AD1 na presença de 1% de oxgall a 37°C depois de 24 horas de incubação foi de aproximadamente 75,4%, o que caracteriza uma taxa de inibição de crescimento bacteriano de 24,6%. O mesmo autor em 2004, avaliando os gêneros lactobacilos e enterococos como probióticos, verificou uma taxa de sobrevivência variável entre seis linhagens de lactobacilos em 1% de oxgall a 37°C depois de 24 horas de incubação, com as taxas de sobrevivência bacteriana variando entre 67% (linhagem D1) e 75% (linhagem AD1). As taxas de inibição de crescimento, portanto, variaram de 25% a 33%. Em nosso trabalho destacam-se as amostras: 20 (*L. reuteri*, 29,6%), 23 (*L. murinus*, 30,35%), 26 (*L. reuteri*, 31,9%) e 28 (*L. sakei*, 31,05%), tidas como as mais resistentes ou tolerantes aos sais biliares.

Gilliland *et al.* (1984) avaliaram o crescimento de sete linhagens de lactobacilos com e sem oxgall 0,3% e consideraram como resistentes aos sais biliares três linhagens que apresentavam um tempo necessário de até 6 horas para atingir o valor de OD_{620nm} de 0,3. O trabalho de McCoy e Gilliland (2004) comparou o crescimento dos lactobacilos em presença e na ausência de oxgall 0,3% e foram observados quatro isolados de *L. reuteri* que apresentavam um crescimento mais rápido em relação aos demais, considerando-os como melhores probióticos, levando-se em consideração o tempo necessário para aumentar o valor de OD_{620nm} de 0,3. Este método, entretanto, não é o ideal para avaliar os isolados de fezes caninas do presente estudo quanto à inibição pelos sais biliares, pois eles apresentam diferentes padrões de crescimento, não podendo ser comparados como mais ou menos resistentes ao oxgall 0,3% apenas por atingirem um valor de OD_{620nm} de 0,3 em menor tempo, caso o valor inicial de OD_{620nm} não tenha sido padronizado antes de ser feito o inóculo nas microplacas.

Se esse padrão de avaliação fosse levado em consideração em nosso estudo, aproximadamente 81% das bactérias seriam consideradas resistentes, pois levam menos de 6 horas para atingir um valor de OD_{620nm} de 0,3 e 19% dos isolados seriam considerados tolerantes pois não alcançaram o valor de OD_{620nm} de 0,3 em 6 horas, mas apresentaram crescimento bacteriano. O resultado não condiz com aquele obtido por meio do cálculo da área sob a curva do gráfico. Portanto, o melhor método para se avaliar a inibição aos sais biliares é a análise da área dos gráficos, pois, representa a diferença proporcional entre os

crescimentos dos isolados na presença e na ausência de oxgall 0,3% ao longo de todo período de 18 horas avaliado.

Levando-se em consideração o cálculo da área sob a curva dos gráficos de crescimento dos isolados caninos na presença e na ausência de sais biliares, os isolados foram classificados como resistentes (até 40% de inibição), tolerantes (40 a 60% de inibição) e sensíveis (mais de 60%). As amostras tidas como resistentes foram a 2 (*L. reuteri*, 39,8%), 5 (*L. reuteri*, 39%), 8 (*L. reuteri*, 39,1%), 9 (*L. sanfransciscensis*, 37,8%), 10 (*L. reuteri*, 30,6%), 12 (*L. reuteri*, 36%), 14 (*L. reuteri*, 33,45%), 15 (*L. plantarum* A, 35,8%), 17 (não identificado, 37%), 20 (*E. faecalis*, 29,6%), 22 (não identificado, 39%), 23 (*L. murinus*, 30,35%), 25 (*L. salivarius*, 38,5%), 26 (*L. reuteri*, 31,9%), 27 (*L. reuteri*, 28,7%), 28 (*L. sakei*, 31,05%), 33 (*L. reuteri*, 34,95%) e 36 (*L. reuteri*, 37,15%). As bactérias que foram consideradas sensíveis foram apenas a número 1 (*L. animalis*, 80%), 29 (*L. fructivorans*, 66,2%) e 31 (*L. fructivorans*, 61,85%), os isolados restantes foram considerados como tolerantes. De acordo com o resultado, 45% dos isolados revelaram-se resistentes ao oxgall 0,3%, 47% tolerantes e apenas 8% mostraram-se sensíveis.

Quadro 3: Taxa de inibição do crescimento dos isolados em presença de oxgall 0,3% em 6h e pelo cálculo da área sob a curva do gráfico.

Isolado	% de inibição 6h	% de inibição Área	Isolado	% de inibição 6h	% de inibição Área
1	59,35	80,0	19	60,5	43,75
2	55,8	39,8	20	40,7	29,6
3	69,8	48,85	21	53,65	41,65
4	64,45	42,10	22	56,55	39
5	63,7	39	23	40	30,35
6	79	54,05	24	62,35	44,3
7	63,9	40,9	25	49,35	38,5
8	63,55	39,10	26	43,2	31,9
9	61,35	37,8	27	37,45	28,70
10	56,4	30,6	28	41,7	31,05
11	71,8	45,35	29	74,05	66,2
12	64,2	36	30	63,05	56,6
13	66,95	41,4	31	72,55	61,85
14	59,7	33,45	32	79,25	55,9
15	61,4	35,8	33	53,35	34,95
16	55,25	42,5	34	64	50,3
17	50,1	37	35	58,45	44,2
18	55,5	42,85	36	53,2	37,15
			37	61,15	46,8

4.2.3 – Hidrofobicidade da Superfície Celular

A hidrofobicidade relaciona-se diretamente com as capacidades das linhagens em aderir às superfícies animadas ou inertes. Está relacionada aos componentes hidrofóbicos presentes na membrana externa do microrganismo e acredita-se que interações hidrofóbicas apresentam papel importante na adesão das bactérias ao epitélio (Mangoni, 2009). Através do teste de adesão a solventes (MATS) é possível avaliar qualitativamente o quão polar ou apolar é a superfície bacteriana, sendo importante, pois indicaria o potencial de adesão do probiótico às superfícies apolares do epitélio intestinal e vaginal. Entretanto, propõe-se ser o teste apenas o indicador primário para adesão de microrganismos (Mangoni, 2009).

Os resultados de MATS encontram-se no **Quadro 4**. Lactobacilos probióticos isolados de bovinos também foram submetidos ao teste de adesão à hidrocarbonetos para verificar sua hidrofobicidade no trabalho desenvolvido por Nader-Macías *et al.* (2008) e mais de

92,2% das amostras apresentaram hidrofobicidade relativamente baixa (0 a 33%), 5,4% média hidrofobicidade (33,34 a 66,66%) e apenas 2,4% dos isolados apresentaram alta hidrofobicidade (66,67% a 100%). De acordo com este critério, os novos isolados de cães considerados como de alta hidrofobicidade correspondem ao número 1 (*L. animalis*, 69,87%), 4 (*L. reuteri*, 67%), 5 (*L. reuteri*, 67,04%), 7 (*L. reuteri*, 76,59%), 13 (*L. reuteri*, 66,71%), 14 (*L. reuteri*, 69,08%) e 15 (*L. plantarum* A, 67,90%), representando cerca de 19% dos isolados; os de média hidrofobicidade correspondem a aproximadamente 81%, e nenhum isolado apresentou baixa hidrofobicidade da superfície celular. Também para avaliar a hidrofobicidade da superfície celular de isolados de seis espécies diferentes de lactobacilos provenientes de produtos industriais, Pelletier *et al.* (1997) realizaram o teste de MATS para o hexadecano, um solvente apolar orgânico, e verificaram que os microrganismos estudados eram relativamente hidrofílicos, com as porcentagens de adesão ao solvente variando entre 2,7 e 26,5%.

Quadro 4: Porcentagem de adesão dos isolados em solvente orgânico apolar (xileno).

	% de		% de
Isolado	associação	Isolado	associação
1	69,87	19	48,60
2	66,11	20	51,81
3	49,75	21	44,71
4	67,04	22	37,88
5	67,73	23	48,83
6	48,03	24	47,84
7	76,59	25	48,11
8	61,50	26	44,04
9	44,55	27	44,65
10	64,47	28	47,24
11	53,02	29	46,78
12	54,50	30	48,99
13	66,71	31	47,70
14	69,08	32	46,66
15	67,90	33	45,76
16	51,18	34	46,76
17	47,26	35	44,66
18	49,13	36	46,19
		37	50,57

4.2.4 – Antagonismo *in vitro* e síntese de peróxido de hidrogênio

Os resultados do teste de antagonismo podem ser observados no **Apêndice III** e na **Quadro 5** e ainda na **Figura 4**. As bactérias isoladas no presente trabalho apresentaram atividade antagonista para patógenos Gram positivos e Gram negativos, o efeito inibitório podendo ser devido à produção de H₂O₂, ácido lático, bacteriocinas, substâncias que agem como antibióticos, ou a combinação de vários destes compostos (Nardi *et al.* 2005).

Os isolados de fezes que apresentaram antagonismo para os sete patógenos testados (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria monocytogenes*) foram o número 2 (não identificado), 4 (*L. reuteri*), 5 (*L. reuteri*), 9 (*L. sanfranciscensis*), 11 (*L. reuteri*), 12 (*L. reuteri*), 13 (*L. reuteri*), 14 (*L. reuteri*), 22 (não identificado), 28 (*L. sakei*), 34 (*L. reuteri*), 35 (*L. reuteri*) e 36 (*L. reuteri*). Nota-se que a maioria (66,6%) dos isolados que apresentam bom antagonismo aos sete patógenos pertencem à espécie *L. reuteri*, e isso pode ser devido à produção de ácido lático e, também de outras substâncias antimicrobiana de amplo espectro como a reuterina. Esta substância é produzida durante o metabolismo anaeróbico do glicerol e é capaz de inibir bactérias de vários gêneros incluindo *Salmonella*, *Escherichia*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* (Axelsson *et al.* 1989). O *L. reuteri* é uma bactéria ácido-lática heterofermentativa presente na fermentação de cereais e habitante comum do trato gastrointestinal dos humanos e dos animais. As linhagens de *L. reuteri* são capazes de produzir potentes antimicrobianos além de bacteriocinas e ácidos orgânicos. A bacteriocina reutericina 6 foi identificada em isolados intestinais. A reuterilcina foi identificada primariamente em linhagens isoladas de cereais. A produção de dois ou mais destes antimicrobianos por uma única linhagem ainda não foi descrito (Ganzle, 2004).

Segundo McCoy e Gilliland (2004) todos os isolados de *L. reuteri* isolados de cães apresentaram efeito inibitório no crescimento de *S. enterica* sorovar Typhimurium, do mesmo modo, neste estudo todos os isolados mostram uma grande inibição de crescimento contra *Salmonella*, e este é um dado muito importante, levando-se em consideração que a *S. enterica* sorovar Typhimurium é um dos patógenos intestinais que mais acomete os cães e ainda possui potencial zoonótico (Rinkinen, 2003).

Da mesma forma, a *Escherichia coli* é outro patógeno que acomete os cães, podendo causar diarreia e osteomeolite (Pereira *et al.* 2009). Nota-se que a grande maioria, correspondente a 92% dos isolados caninos, apresentou inibição à *E. coli*.

Em contrapartida, o patógeno que sofreu menor atividade antagonista aos ácidos e substâncias antimicrobianas dos lactobacilos foi o *Bacillus cereus*, não apresentando halo de inibição de crescimento a 16 dos 37 isolados avaliados. Trata-se de um patógeno Gram positivo, aeróbio ou anaeróbio facultativo, formador de esporos. É causador de síndromes gastrointestinais nos animais nos homens, estando também associado à infecções hospitalares em pacientes imunocomprometidos. Os esporos são altamente resistentes ao calor e a agentes químicos (Drobniowski, 1993), o que poderia explicar a maior resistência deste patógeno aos antimicrobianos produzidos pelos isolados de lactobacilos.

Foram testados também oito isolados de *Lactobacillus sp* (isolados de 1 a 8) para *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae e nenhum deles apresentou halo de inibição ao crescimento do patógeno, indicando uma ausência de atividade antagonista. Nota-se também que a maioria das bactérias (89%) apresentou atividade antagonista para *Enterococcus faecalis*, considerada uma BAL, mostrando que pode existir outra substância antagonista diferente do ácido láctico.

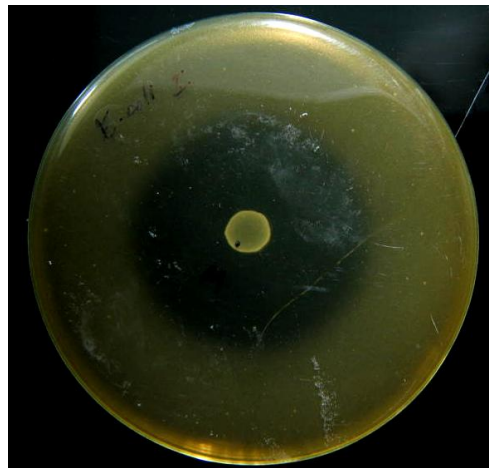


Figura 4: Antagonismo de um isolado de lactobacilo contra *Escherichia coli*, com o spot central de um isolado de lactobacilos e o halo de inibição translúcido em volta.

Quadro 5: Antagonismo *in vitro* dos isolados contra os sete patógenos, na seguinte ordem: *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salomonella enterica tiphymurium*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Isolado	Antagonismo	Isolado	Antagonismo
1	- + - + + + -	19	- - + + + + +
2	+ + + + + + +	20	+ + + + + + -
3	+ + + + + + -	21	- + + + + + +
4	+ + + + + + +	22	+ + + + + + +
5	+ + + + + + +	23	- + + + + + +
6	+ + + + - + +	24	- + - + + + -
7	+ + + + - + +	25	- + + + + + -
8	+ + + + - + +	26	- + - + + + -
9	+ + + + + + +	27	- + + + + + -
10	+ - + + + + +	28	+ + + + + + +
11	+ + + + + + +	29	- + - + + + +
12	+ + + + + + +	30	- + + + + + +
13	+ + + + + + +	31	- + + + + + +
14	+ + + + + + +	32	- + + + + + +
15	+ + - + + + +	33	- + + + + + +
16	+ + + - + + +	34	+ + + + + + +
17	- - + + + + +	35	+ + + + + + +
18	- - + + + + +	36	+ + + + + + +
		37	- + + + + + +

O peróxido de hidrogênio é produzido normalmente por isolados de lactobacilos vaginais, podendo também estar associados a lactobacilos intestinais ou que vivem no ambiente (Martín e Suárez, 2009). Estão associados à capacidade de colonização e proteção vaginal, sendo importante para a manutenção da homeostase da microbiota, combatendo bactérias patogênicas (Vallor *et al.* 2001). Segundo Pridmore *et al.* (2008), o isolado intestinal humano *L. johnsoni* NCC 533 é capaz de produzir peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que é capaz de matar o patógeno *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, reconhecidamente um patógeno intestinal canino (Rinkinen *et al.* 2003), em uma concentração mínima de 128 µM.

A **Figura 5** e a **Quadro 6** mostram os resultados do teste de peróxido de hidrogênio nos 37 isolados de fezes caninas. As principais espécies produtoras de peróxido de hidrogênio são *L. crispatus* e *L. jensenii* (Branco *et al.* 2010), entretanto já foram encontradas outras espécies capazes de produzir esta substância, como *L. plantarum* (Jonhson e Delwiche, 1965), *L. sakei* (Chaillou *et al.* 2005), *L. acidophilus* (Collins e Aramaki, 1980) e *L. delbrueckii bulgaricus* e também outros gêneros de BAL como

Lactococcus lactis (Dahiya e Speck, 1968). No presente trabalho, a grande maioria (34/37) das bactérias se mostrou como baixa produtora de peróxido de hidrogênio. As únicas bactérias que não poderiam ser utilizadas como possíveis vetores vacinais vaginais, por não produzirem a substância em questão, seriam a 1 (*L. animalis*), a 16 (*L. acidophilus*) e a 22 (não identificada). Ao contrário das linhagens de *L. acidophilus* isoladas de leite desnatado por Collins e Aramaki (1980), o nosso isolado de número 16 de *L. acidophilus* não apresentou nenhuma produção de peróxido.

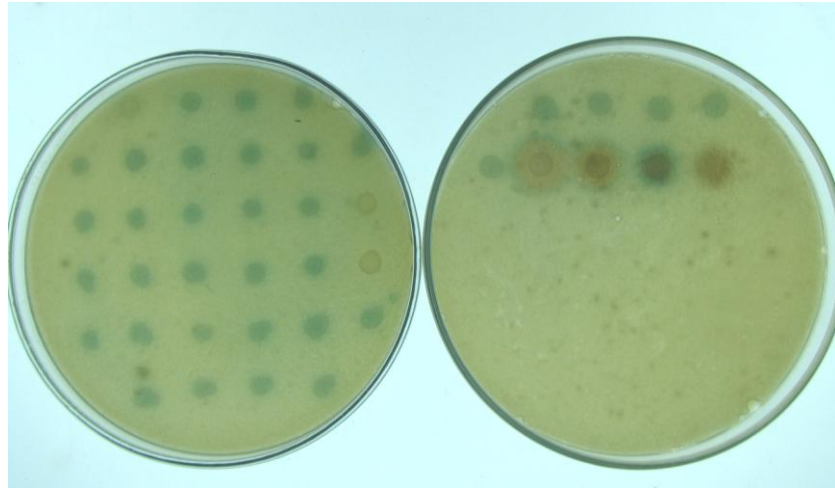


Figura 5: Perfis de produção de peróxido de hidrogênio dos isolados de lactobacilos de fezes caninas. À esquerda mostra-se uma placa com os isolados de 1 a 32, à direita estão os isolados restantes de 33 a 37 e mais quatro amostras controle positivo.

Quadro 6: Avaliação qualitativa dos perfis de produção de peróxido de hidrogênio. Os isolados foram classificados como de alta produção (+++), média (++) , baixa (+) e nenhuma produção de peróxido (-).

Isolado	Produção de Peróxido	Isolado	Produção de Peróxido
1	-	19	+
2	+	20	+
3	+	21	+
4	+	22	-
5	+	23	+
6	+	24	+
7	+	25	+
8	+	26	+
9	+	27	+
10	+	28	+
11	+	29	+
12	+	30	+
13	+	31	+
14	+	32	+
15	+	33	+
16	-	34	+
17	+	35	+
18	+	36	+
		37	+

4.3 – Probióticos em potencial

O **Quadro 7** mostra os resultados para os cinco testes de caracterização probiótica realizados nos 37 isolados de lactobacilos de fezes caninas. Como possíveis veículos vacinais orais destacaram-se os isolados número 2 (*L. reuteri*), 5 (*L. reuteri*), 7 (*L. reuteri*), 8 (*L. reuteri*), 10 (*L. reuteri*), 14 (*L. reuteri*) e 15 (*L. plantarum* A), uma vez que apresentam baixa inibição por ácidos, baixa ou moderada inibição por sais biliares, boa capacidade de associação a solventes orgânicos (hidrofobicidade) e um bom antagonismo, sendo capazes de inibir todos ou quase todos os patógenos testados, podendo auxiliar no combate às infecções do trato gastrointestinal.

Quadro 7: Resultado da caracterização probiótica dos lactobacilos isolados de fezes de cães lactentes.Característica desejável: , característica indesejável: Obs: Isolados 1 a 16 provenientes de cães *Crista Chinês*. Isolados 17 a 37 provenientes de cães *York Shire Terrier*.

Isolado	Identificação	Antagonismo	Hidrofobicidade (%)	Inibição em Suco gástrico (%) Área	Inibição em Sais biliares (%) Área	Peróxido de Hidrogênio
1	<i>L. animalis</i>	<input checked="" type="checkbox"/> + <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	69,87	-20,2	79,95	<input checked="" type="checkbox"/>
2	<i>L. reuteri</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	66,11	0,55	39,8	<input type="checkbox"/>
3	<i>L. sanfranciscensis</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	49,75	1,88	48,85	<input type="checkbox"/>
4	<i>L. reuteri</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	67,04	12,95	42,1	<input type="checkbox"/>
5	<i>L. reuteri</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	67,73	3,49	39	<input type="checkbox"/>
6	<i>L. animalis</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	48,03	0,52	54,05	<input type="checkbox"/>
7	<i>L. reuteri</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	76,59	5,29	40,9	<input type="checkbox"/>
8	<i>L. reuteri</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	61,50	5,27	39,1	<input type="checkbox"/>
9	<i>L. sanfranciscensis</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	44,55	0,96	37,8	<input type="checkbox"/>
10	<i>L. reuteri</i>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	64,47	1,02	30,6	<input type="checkbox"/>
11	<i>L. reuteri</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	53,02	3,12	45,35	<input type="checkbox"/>
12	<i>L. reuteri</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	54,50	1,49	36	<input type="checkbox"/>
13	<i>L. reuteri</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	66,71	2,58	41,4	<input type="checkbox"/>
14	<i>L. reuteri</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	69,08	0,94	33,45	<input type="checkbox"/>
15	<i>L. plantarum A</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	67,90	1,75	35,8	<input type="checkbox"/>
16	<i>L. acidophilus</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	51,18	4,78	42,5	<input checked="" type="checkbox"/>
17	não identificado	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	47,26	2,84	37	<input type="checkbox"/>
18	<i>L. animalis</i>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	49,13	1,19	42,85	<input type="checkbox"/>
19	não identificado	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	48,60	1,09	43,75	<input type="checkbox"/>
20	<i>E. faecalis</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	51,81	1,24	29,6	<input type="checkbox"/>
21	<i>L. reuteri</i>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	44,71	0,87	41,65	<input type="checkbox"/>
22	não identificado	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	37,88	15,95	39	<input checked="" type="checkbox"/>
23	<i>L. murinus</i>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	48,83	3,90	30,35	<input type="checkbox"/>
24	<i>L. murinus</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	47,84	-0,98	44,3	<input type="checkbox"/>
25	<i>L. salivarius</i>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	48,11	-1,9	38,5	<input type="checkbox"/>
26	<i>L. reuteri</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	44,04	-0,03	31,9	<input type="checkbox"/>
27	<i>L. reuteri</i>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	44,65	0,59	28,7	<input type="checkbox"/>
28	<i>L. sakei</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	47,24	3,42	31,05	<input type="checkbox"/>
29	<i>L. fructivorans</i>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	46,78	2,44	66,2	<input type="checkbox"/>
30	<i>L. fructivorans</i>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	48,99	4,78	56,6	<input type="checkbox"/>
31	<i>L. fructivorans</i>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	47,70	8,07	61,85	<input type="checkbox"/>
32	<i>L. fructivorans</i>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	46,66	8,64	55,9	<input type="checkbox"/>
33	<i>L. reuteri</i>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	45,76	1,46	34,95	<input type="checkbox"/>
34	<i>L. reuteri</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	46,76	-0,5	50,3	<input type="checkbox"/>
35	<i>L. reuteri</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	44,66	0,23	44,2	<input type="checkbox"/>
36	<i>L. reuteri</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	46,19	11	37,15	<input type="checkbox"/>
37	<i>L. paralimentarius</i>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	50,57	9,78	46,75	<input type="checkbox"/>

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O uso de lactobacilos como probióticos no tratamento e prevenção de doenças não é novo. Os probióticos têm sido amplamente usados em humanos terapêuticamente para modular a resposta imune, abaixar os níveis de colesterol, tratar artrite reumatóide, prevenir câncer, tratar intolerância à lactose, prevenir e reduzir os efeitos da dermatite atópica, além de serem úteis no tratamento da doença de Crohn, diarreia, constipação, candidíase e infecções do trato urinário (Reid, 1999).

Tem sido sugerido que os probióticos são benéficos na manutenção da saúde do trato gastrointestinal dos cães (Biourge *et al.* 1998). Existe um interesse no uso de probióticos, como espécies de lactobacilos, para ajudar no controle de patógenos intestinais e melhorar a nutrição dos animais (McCoy e Gilliland, 2007). As espécies de lactobacilos devem ser de origem intestinal canina, já que os isolados exibem especificidade ao hospedeiro (McCoy e Gilliland, 2007). Os isolados devem ser resistentes ou tolerantes aos desafios ao longo do trato gastrointestinal, como o pH ácido do estômago e a secreção de sais biliares ao longo do intestino delgado, para que possam persistir e se estabelecer ao longo do trato digestivo dos cães. É necessário também que a bactéria candidata a probiótico tenha uma alta capacidade de associação a solventes orgânicos (bom potencial de adesão a superfícies hidrofóbicas), além de uma forte atividade antagonista a bactérias enteropatogênicas. Neste sentido, foram selecionados sete isolados como potenciais veículos vacinais orais, sendo 6 pertencente à espécie *L. reuteri* e um pertencente à espécie *L. plantarum* A.

Entretanto, ainda são necessários mais testes para uma caracterização probiótica mais completa. Os sete isolados selecionados ainda devem ser submetidos ao teste de antagonismo *in vitro* à *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae a fim de verificar a atividade inibitória a este patógeno. Testes *in vitro* devem ser feitos, como a adesão a células Caco-2 e a capacidade de resistência a antibióticos (antibiograma). Também testes *in vivo* devem ser realizados em camundongos a fim de avaliar a atividade imunomodulatória bacteriana pela análise da produção de citocinas por Real-Time PCR.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTERMANN, E. *et al.* **Identification and phenotypic characterization of the cell-division protein CdpA.** *Gene* [S.l.], v. 342, n. 1, p. 189-197, Nov 2004.
- ATKINS, H. S. *et al.* **Recombinant *Salmonella* vaccines for biodefense.** *Vaccine*, v. 24, n. 15, p. 2710-2717, Apr 2006.
- AVONTS, L., DE VUYST, L. **Antimicrobial potential of probiotic lactic acid bacteria.** v. 66: Meded Rijksumiv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet, 2000. p. 543-550.
- AXELSSON, L. T. *et al.* **Production of a Broad Spectrum Antimicrobial Substance by *Lactobacillus reuteri*.** v. 2. n. 2: *Microbial Ecology in Health and Disease*, 1989. p. 131-136.
- BHARTI A.R.; NALLY J.E.; RICALDI J.N.; MATTHIAS M.A.; DIAZ M.M.; LOVETT M.A.; LEVETT P.N.; VINETZ J.M. **Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance.** *Lancet Infectious Diseases*, n. 3 v. 12, p. 757-771, 2003.
- BEASLEY, S. H. **Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota.** University of Helsinki: Academic Thesis in Microbiology, 2004.
- BIOUSSE, V. *et al.* **The use of probiotics in the diet of dogs.** *J Nutr*, v. 128, n. 12 Suppl, p. 2730S-2732S, Dec 1998.
- BOOT, H. J.; POUWELS, P. H. **Expression, secretion and antigenic variation of bacterial S-layer proteins.** *Molecular Microbiology*, v. 21, n. 6, p. 1117-1123, Sep 1996.
- BRANCO *et al.* **Identification and in vitro production of *Lactobacillus* antagonists from women with or without bacterial vaginosis.** *Braz J Med Biol Res.* v. 43, n. 4, p. 338-344, 2010.
- BRIHUEGA, B.; HUTTER, E. **Incidencia de la leptospirosis em caninos de la ciudad de Buenos Aires.** v. 11: *Veterinária Argentina*, 1994. p. 98-101.
- BROD, CLAUDIOMAR SOARES *et al.* **Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [online]. vol.38, n.4, pp. 294-300, 2005.
- BROUGHTON, E. S.; SCARNELL, J. **Prevention of Renal Carriage of Leptospirosis in dogs by vaccination.** *Veterinary Record*, v. 117, n. 12, p. 307-311, 1985.
- CARR, F. J. *et al.* **The lactic acid bacteria: A literature survey.** *Critical Reviews in Microbiology*, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.
- CHAILLOU, S. *et al.* **The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K.** *Nature Biotechnology*, v. 23, n. 12, p. 1527-1533, 2005.

- CHANG, T. L. Y. *et al.* **Inhibition of HIV infectivity by a natural human isolate of *Lactobacillus jensenii* engineered to express functional two-domain CD4.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 20, p. 11672-11677, 2003.
- CHARTERIS, W. P. *et al.* **Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 84, n. 5, p. 759-768, 1998.
- CHATEAU, N. *et al.* **Heterogeneity of bile-salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium.** *Letters in Applied Microbiology*, v. 18, n. 1, p. 42-44, 1994.
- CHEN, X. Y. *et al.* **The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 115, n. 3, p. 307-312, Apr 2007.
- CHO, J. S. *et al.* **Expression of *Clostridium thermocellum* endoglucanase gene in *Lactobacillus gasserii* and *Lactobacillus johnsonii* and characterization of the genetically modified probiotic *Lactobacilli*.** *Current Microbiology*, v. 40, n. 4, p. 257-263, Apr 2000.
- CHOU, L. S.; WEIMER, B. **Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*.** *Journal of Dairy Science*, v. 82, n. 1, p. 23-31, Jan 1999.
- CHRISTENSEN, H. R. *et al.* ***Lactobacilli* differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells.** *Journal of Immunology* [S.I.], v. 168, n. 1, p. 171-178, Jan 2002.
- CLAESSION, M. J. *et al.* **Multireplicon genome architecture of *Lactobacillus salivarius*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 17, p. 6718-6723, Apr 2006.
- COCONNIER-POLTER, M. H. *et al.* **A *Lactobacillus acidophilus* strain of human gastrointestinal microbiota origin elicits killing of enterovirulent *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by triggering lethal bacterial membrane damage.** *Applied and Environmental Microbiology* [S.I.], v. 71, n. 10, p. 6115-6120, Oct 2005.
- COLLINS, E. B.; ARAMAKI, K. **Production of Hydrogen-Peroxide by *Lactobacillus acidophilus*.** *Journal of Dairy Science* [S.I.], v. 63, n. 3, p. 353-357, 1980.
- CORR, S. C. *et al.* **Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 18, p. 7617-7621, May 2007.
- CORTHESEY, B. *et al.* **Oral immunization of mice with lactic acid bacteria producing *Helicobacter pylori* Urease B subunit partially protects against challenge with *Helicobacter felis*.** *Journal of Infectious Diseases* [S.I.], v. 192, n. 8, p. 1441-1449, Oct 2005.

- CROSS, M. L. **Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens.** *Fems Immunology and Medical Microbiology* [S.l.], v. 34, n. 4, p. 245-253, Dec 2002.
- CZERUCKA, D. *et al.* **Review article: yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*.** *Aliment Pharmacol Ther.* England, 2007. p. 767-78.
- DAHIYA, R.S. e SPECK, M.L. **Hydrogen Peroxide Formation by Lactobacilli and Its Effect on *Staphylococcus aureus*.** *J. Dairy Science.* v. 51, n. 10, p. 1568-1572, 1968.
- DE KEERSMAECKER, S. C. J. *et al.* **Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid.** *Fems Microbiology Letters*, v. 259, n. 1, p. 89-96, 2006.
- DELLES, E. K. *et al.* **Comparison of species and numbers of bacteria in concurrently cultured samples of proximal small-intestinal fluid and endoscopically obtained duodenal mucosa in dogs with intestinal bacterial overgrowth.** *American Journal of Veterinary Research*, v. 55, n. 7, p. 957-964, Jul 1994.
- DROBNIIEWSKI, FRANCIS A. ***Bacillus cereus* and Related Species.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 6, n. 4, p. 324-338, 1993.
- DU TOIT, M. *et al.* **Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 88, n. 3, p. 482-494, Mar 2000.
- DU TOIT, M. *et al.* **Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 40, n. 1-2, p. 93-104, Mar 1998.
- DUNNE, C. *et al.* **Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials.** *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 76, n. 1-4, p. 279-292, Nov 1999.
- ESCHENBACH, D. A. *et al.* **Prevalence of Hydrogen Peroxide-producing lactobacillus species in normal women and women with bacterial vaginosis.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 27, n. 2, p. 251-256, Feb 1989.
- EUZEBY, J.P.: **List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet.** *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 590-592, 1997. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/l/lactobacillus.html>> Acesso em: 02 Abril. 2011.
- FALAGAS, M. E. *et al.* **Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis.** *Clinical Microbiology and Infection*, v. 13, n. 7, p. 657-664, Jul 2007.
- FAO/WHO. **Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food.** Córdoba, Argentina: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, pp 1-34, 2001..
- FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. **Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria.** *Curr Issues Intest Microbiol*, v. 8, n. 2, p. 44-61, Sep 2007.

- FOOKS, L. J. *et al.* **Prebiotics, probiotics and human gut microbiology.** *International Dairy Journal*, v. 9, n. 1, p. 53-61, 1999.
- FRANZ, C. *et al.* **Enterococci at the crossroads of food safety?** *International Journal of Food Microbiology*, v. 47, n. 1-2, p. 1-24, Mar 1999.
- FUJISAWA, T.; MITSUOKA, T. **Homofermentative Lactobacillus species predominantly isolated from canine feces.** *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 58, n. 6, p. 591-593, 1996.
- FUKATA, T. *et al.* **Incidence of Salmonella infection in healthy dogs in Gifu Prefecture, Japan.** *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 64, n. 11, p. 1079-1080, Nov 2002.
- FULLER, R. **Probiotics in Man and Animals.** *Journal of Applied Bacteriology*, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.
- FULLER, R. **Introduction.** In *Probiotics 2: Applications and Practical Aspects*, p. 1-9, 1997.
- GANZLE, M. G. **Reutericyclin: biological activity, mode of action, and potential applications.** *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 64, p. 326–332.
- GILLILAND, S. E. *et al.* **Importance of bile tolerance of lactobacillus-acidophilus used as a dietary adjunct.** *Journal of Dairy Science*, v. 67, n. 12, p. 3045-3051, 1984.
- GILLOR, O. *et al.* **The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 81, n. 4, p. 591-606, Dec 2008.
- GRANGETTE, C. *et al.* **Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*.** *Infection and Immunity*, v. 69, n. 3, p. 1547-1553, Mar 2001.
- GREENE, C. *et al.* **Leptospirosis**, in Greene CE (ed). Philadelphia, WB Saunders: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. pp 273–281, 1998.
- GREETHAM, H. L. *et al.* **Bacteriology of the Labrador dog gut: a cultural and genotypic approach.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, n. 4, p. 640-646, 2002.
- HAMMES, W. P.; HERTEL, C. **The genera *Lactobacillus* and *Cornobacterium*.** *The prokaryotes - An Evolving Electronic for the microbiological Community.*, 2003.
- HO, P. S. *et al.* **Intragastric administration of *Lactobacillus casei* expressing transmissible gastroenteritis coronavirus spike glycoprotein induced specific antibody production.** *Vaccine*, v. 23, n. 11, p. 1335-1342, Feb 2005.
- HOYOS, G. **Aplicación de la biotecnología en la producción animal: La experiencia mexicana de una década.** *Memoriais del 1er Simposio Mexicano sobre Probióticos*, 1997. p. pp. 131-148.
- HYRONIMUS, B. *et al.* **Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 61, n. 2-3, p. 193-197, 2000.
- JACOBSEN, C. N. *et al.* **Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of**

five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 11, p. 4949-4956, Nov 1999.

- JAKAVA-VILJANEN, M. *et al.* **Isolation of three new surface layer protein genes (slp) from *Lactobacillus brevis* ATCC 14869 and characterization of the change in their expression under aerated and anaerobic conditions.** *Journal of Bacteriology*, v. 184, n. 24, p. 6786-6795, Dec 2002.

- JIN, L. Z. *et al.* **Probiotics in poultry: modes of action.** *Worlds Poultry Science Journal*, v. 53, n. 4, p. 351-368, 1997.

- JIN, L. Z. *et al.* **Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine.** *Letters in Applied Microbiology*, v. 27, n. 3, p. 183-185, Sep 1998.

- JOHNSTON, M. A.; DELWICHE, E. A. **CATALASE OF LACTOBACILLACEAE.** *Journal of Bacteriology*, v. 83, n. 4, p. 936-&, 1962.

- JOUGLARD, S.; BROD, C. **Leptospirose em cães: prevalência e fatores de risco no meio rural do Município de Pelotas, RS.** v. 67: Arq Inst Biol 2000, 2000. p. 181-5.

- KAILASAPATHY, K.; CHIN, J. **Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.*** *Immunology and Cell Biology*, v. 78, n. 1, p. 80-88, Feb 2000.

- KAJIKAWA, A. *et al.* **Intragastric immunization with recombinant *Lactobacillus casei* expressing flagellar antigen confers antibody-independent protective immunity against *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*.** *Vaccine*, v. 25, n. 18, p. 3599-3605, May 2007.

- KLEEREBEZEM, M. *et al.* **Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 4, p. 1990-1995, Feb 2003.

- LEBEER, S. *et al.* **Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 72, n. 4, p. 728, 2008.

- LEBEER, S. *et al.* **Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, n. 3, p. 171-184, 2010.

- **Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI).** Endereço na Internet: <http://www.inpi.gov.br/menu-superior/imprensa/clipping/novembro-2007-1-old-version-replaced-12112007-124018/22-11-2007#2>

- LEE, S. H. *et al.* **Influence of pediococcus-based probiotic on coccidiosis in broiler chickens.** *Poultry Science*, v. 85, p. 122-123, 2006.

- MACDONALD, T. T.; BELL, I. **Probiotics and the immune response to vaccines.** *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 69, n. 3, p. 442-446, Aug 2010.

- MACK, D. R. *et al.* **Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells *in vitro*.** *Gut*, v. 52, n. 6, p. 827-833, Jun 2003.

- MAIA O.B. *et al.* **Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium.** *Veterinary Microbiology*, 79 (2), pp. 183-189, 2001.

- MANGONI, J. **Potencial Probiótico de Lactobacilos de origem suína.** 2009. 45 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2009. MAIA, O. B. *et al.* Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with *Salmonella enterica* subsp *enterica* ser. Typhimurium. *Veterinary Microbiology*, v. 79, n. 2, p. 183-189, Mar 2001.

- **MarketsandMarkets, global market research and consulting company (2009).** Probiotics Market (2009-2014).

- MARTIN, R.; SUAREZ, J. E. **Biosynthesis and Degradation of H₂O₂ by Vaginal Lactobacilli.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 2, p. 400-405, Jan 2010.

- MASUZAWA, T. *et al.* **COMPARISON OF PROTECTIVE EFFECTS WITH TETRA-VALENT GLYCOLIPID ANTIGENS AND WHOLE CELL-INACTIVATED VACCINE IN EXPERIMENTAL-INFECTION OF LEPTOSPIRA.** *Microbiology and Immunology*, v. 35, n. 3, p. 199-208, 1991.

- McCOY, S.; GILLILAND, S. E. **Isolation and Characterization of *Lactobacillus* Species Having Potential for Use as Probiotic Cultures for Dogs.** *Food Microbiology and Safety*, v. 72, n. 3, p. 94-97, 2007.

- METCHNIKOF, E. **Prolongation of life: optimistic studies.** New York: Putnam, New York (translated by Mitchell PC), 1908.

- MITSUOKA, T. *et al.* **STUDIES ON COMPOSITION OF FECAL FLORA OF HEALTHY DOGS WITH SPECIAL REFERENCES OF LACTOBACILLUS FLORA AND BIFIDOBACTERIUM FLORA.** *Zentralblatt Fur Bakteriologie Mikrobiologie Und Hygiene Series a-Medical Microbiology Infectious Diseases Virology Parasitology*, v. 235, n. 4, p. 485-493, 1976.

- MOHAMADZADEH, M. *et al.* **Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 8, p. 2880-2885, Feb 2005.

- MORELLI, L. ***In vitro* selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal.** *Curr Issues Intest Microbiol*, v. 1, n. 2, p. 59-67, Sep 2000.

- MOTA, R.M.; MOREIRA, J. L.; SOUZA M.R.; HORTA M.F.; TEIXEIRA S.M.R.; NEUMANN, E.; NICOLI, J.R., NUNES, A. C. **Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal and food origin by 16-23S rRNA restriction profiling.** *BMC Biotechnology*. Volume 5, Issue 15, 2005.

- MURRAY, P. M. *et al.* ***Treponema, Borelia e Leptospira.*** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 285-288, 2000.

- NADER-MACIAS, M. E. F. *et al.* **Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle.** *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 35, n. 11, p. 1387-1395, 2008.
- NADIA, C. R. **Avaliação *in vitro* de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416.** 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2008.
- NARDI *et al.* **Purification and molecular characterization of antibacterial compounds produced by *Lactobacillus murinus* strain L1.** *Journal of Applied Microbiology*. V. 99, p. 649-656, 2005.
- NEUMANN, E. **Comportamento *in vitro* de estirpes de *Lactobacillus acidophilus* sensível e resistente à bactericida sob condições do trato digestivo.** Viçosa: UFV 86 p. (Dissertação de Mestrado)
- OLIVEIRA, M. L. S. *et al.* **Induction of systemic and mucosal immune response and decrease in *Streptococcus pneumoniae* colonization by nasal inoculation of mice with recombinant lactic acid bacteria expressing pneumococcal surface antigen A.** *Microbes and Infection*, v. 8, n. 4, p. 1016-1024, Apr 2006.
- OLIVEIRA, M. L. S. *et al.* **Expression of *Streptococcus pneumoniae* antigens, PsaA (pneumococcal surface antigen A) and PspA (pneumococcal surface protein A) by *Lactobacillus casei*.** *Fems Microbiology Letters*, v. 227, n. 1, p. 25-31, Oct 2003.
- OUWEHAND, A. C. *et al.* **The normal faecal microflora does not affect the adhesion of probiotic bacteria *in vitro*.** *Fems Microbiology Letters*, v. 177, n. 1, p. 35-38, Aug 1999.
- PELLETIER, C. *et al.* **Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 5, p. 1725-1731, 1997.
- PEREIRA, C.S.; BARROS, P.R.; SILVA, P.M.; RODRIGUES, D.P. **Patógenos isolados do trato gastrointestinal de cães saudáveis no Rio de Janeiro.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* [online]. vol.61, n.4, pp. 1000-1001, 2009.
- PICARD, C. *et al.* **Review article: bifidobacteria as probiotic agents - physiological effects and clinical benefits.** *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 22, n. 6, p. 495-512, Sep 2005.
- PLANK, R.; DEAN, D. **Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans.** *Microbes and Infection*, v. 2, n. 10, p. 1265-1276, Aug 2000.
- POUWELS, P.H.; BOOT, H.J. **Expression, secretion and antigenic variation of bacterial S-layer proteins.** *Mol Microbiol.* 21(6):1117-23, 1996.
- POUWELS, P. H. *et al.* **Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 41, n. 2, p. 155-167, May 1998.

- PRETZER, G. *et al.* **Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*.** *Journal of Bacteriology*, v. 187, n. 17, p. 6128-6136, Sep 2005.
- PRIDMORE, R. D. *et al.* **The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 8, p. 2512-2517, Feb 2004.
- PRIDMORE, R. D. *et al.* **Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-Salmonella activity.** *Fems Microbiology Letters*, v. 283, n. 2, p. 210-215, Jun 2008.
- RABE, L.K e HILLIER, S. L. **Optimization of Media for Detection of Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-Salmonella activity.** V.283, n. 2, p. 210-215, 2008.
- REID, G. **The Scientific Basis for Probiotic Strains of *Lactobacillus*.** *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65. n. No. 9. p. p. 3763–3766, 1999.
- REYSENBACH, ANNA-LOUISE *et al.* 2000. **Novel Bacterial and Archaeal Lineages from an In Situ Growth Chamber Deployed at a Mid-Atlantic Ridge Hydrothermal Vent.** *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, No 9. p. 3798–3806, 2000.
- Report of the American Animal Hospital Association (AAHA) **Canine Vaccine Task Force: Executive Summary and 2003 Canine Vaccine Guidelines and Recommendations** (vol 39, pg 119, 2003). *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 39, n. 3, p. 225-225, May-Jun 2003.
- RINKINEN, M. L. *et al.* **Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization?** *Veterinary Microbiology*, v.92, pp. 111-119, 2003.
- RINKINEN, M. L. *et al.* ***Streptococcus alactolyticus* is the dominating culturable lactic acid bacterium species in canine jejunum and feces of four fistulated dogs.** *Fems Microbiology Letters*, v. 230, n. 1, p. 35-39, Jan 2004.
- ROSS, L.; RENTKO, V. **Leptospirosis.** Philadelphia, WB Saunders: *Current Veterinary Therapy XIII*. pp. 308–310, 2000.
- RUTGERS, H. C. *et al.* **SMALL-INTESTINAL BACTERIAL OVERGROWTH IN DOGS WITH CHRONIC INTESTINAL DISEASE.** *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 206, n. 2, p. 187-193, Jan 1995.
- RYAN, E. J. *et al.* **Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes.** *Trends in Biotechnology*, v. 19, n. 8, p. 293-304, Aug 2001.
- SAAD, S. **Probióticos e prebióticos: o estado da arte.** v. v. 42. n. n. 1. São Paulo: *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, 2006.
- SARTOR, R. B. **Targeting enteric bacteria in treatment of inflammatory bowel diseases: why, how, and when.** *Curr Opin Gastroenterol*. United States. p. 358-65, 2003.

- SAVIJOKI, K. *et al.* **High level heterologous protein production in *Lactococcus* and *Lactobacillus* using a new secretion system based on the *Lactobacillus brevis* S-layer signals.** *Gene*, v. 186, n. 2, p. 255-262, Feb 1997.
- SAZAWAL, S. *et al.* **Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials.** *Lancet Infectious Diseases*, v. 6, n. 6, p. 374-382, Jun 2006.
- SETH, A. *et al.* **Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism.** *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 294, n. 4, p. G1060-G1069, Apr 2008.
- SMITH, J. L. *et al.* **Lantibiotic production by *Streptococcus mutans*: their uses in replacement therapy for the prevention of dental caries and as antibiotics for the treatment of various infectious diseases.** In: RILEY, M.; GILLOR, O. (Ed.). Norfolk: *Horizon Bioscience*, 2007. p. pp. 95–115.
- STROMPFOVA, V. *et al.* **Selection of enterococci for potential canine probiotic additives.** *Veterinary Microbiology*, v. 100, n. 1-2, p. 107-114, May 2004.
- STROMPFOVA, V. *et al.* **Application of potential probiotic *Lactobacillus fermentum* AD1 strain in healthy dogs.** *Anaerobe*, v. 12, n. 2, p. 75-79, Apr 2006.
- TAGG, J. R.; DIERKSEN, K. P. **Bacterial replacement therapy: adapting 'germ warfare' to infection prevention.** *Trends in Biotechnology*, v. 21, n. 5, p. 217-223, May 2003.
- TILSALA-TIMISJARVI, A.; ALATOSSAVA, T. **Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 35, n. 1, p. 49-56, Mar 1997.
- VALLOR, A. C. *et al.* **Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli: Role of hydrogen peroxide production.** *Journal of Infectious Diseases*, v. 184, n. 11, p. 1431-1436, Dec 2001.
- VINDEROLA, G. *et al.* **Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* on the gut mucosal immunity.** *Cytokine*, v. 36, n. 5-6, p. 254-260, Dec 2006.
- WAGENAAR, J. F. P., GORIS, M. G. A., SAKUNDARNO, M. S., GASEM, M. H., MAIRUHU, A. T. A., DE KRUIF, M. D., TEN CATE, H., HARTSKEERL, R., BRANDJES, D. P. M. AND VAN GORP, E. C. M. **What role do coagulation disorders play in the pathogenesis of leptospirosis?.** *Tropical Medicine & International Health*, v. 12, p. 111–122, 2007.
- WALKER, D.K. e GILLILAND, S. E. **Relationships Among Bile Tolerance, Bile Salt Deconjugation, and Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*.** *Journal of Dairy Science*. v. 76. n. 4, p. 956-961, 1993.
- WATKINS, B. A.; KRATZER, F. H. **EFFECT OF ORAL DOSING OF LACTOBACILLUS STRAINS ON GUT COLONIZATION AND LIVER BIOTIN IN BROILER CHICKS.** *Poultry Science*, v. 62, n. 10, p. 2088-2094, 1983.

- WATKINS, B. A.; KRATZER, F. H. **DRINKING-WATER TREATMENT WITH A COMMERCIAL PREPARATION OF A CONCENTRATED *LACTOBACILLUS* CULTURE FOR BROILER-CHICKENS.** *Poultry Science*, v. 63, n. 8, p. 1671-1673, 1984.
- WOHL, J. S. **Canine leptospirosis.** *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v. 18, n. 11, p. 1215-&, Nov 1996.
- XANTHOPOULOS, V. *et al.* **In vitro study of *Lactobacillus* species strains on bile tolerance and cholesterol removal in Lactic Acid Bacteria.** Presses Universitaires de Caen, Caen: Lactic 97, 1997.
- YAN, F. *et al.* **Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth.** *Gastroenterology*, v. 132, n. 2, p. 562-575, Feb 2007.
- ZEGERS, N. D. *et al.* **Expression of the protective antigen of *Bacillus anthracis* by *Lactobacillus casei*: towards the development of an oral vaccine against anthrax.** p.309-314,1999.
- ZINK *et al.* **Novel Probiotic Strains for Pets.** United States Patent Application Publication. US 20080171106 A1, 17 Jul. 2008.

ANEXOS

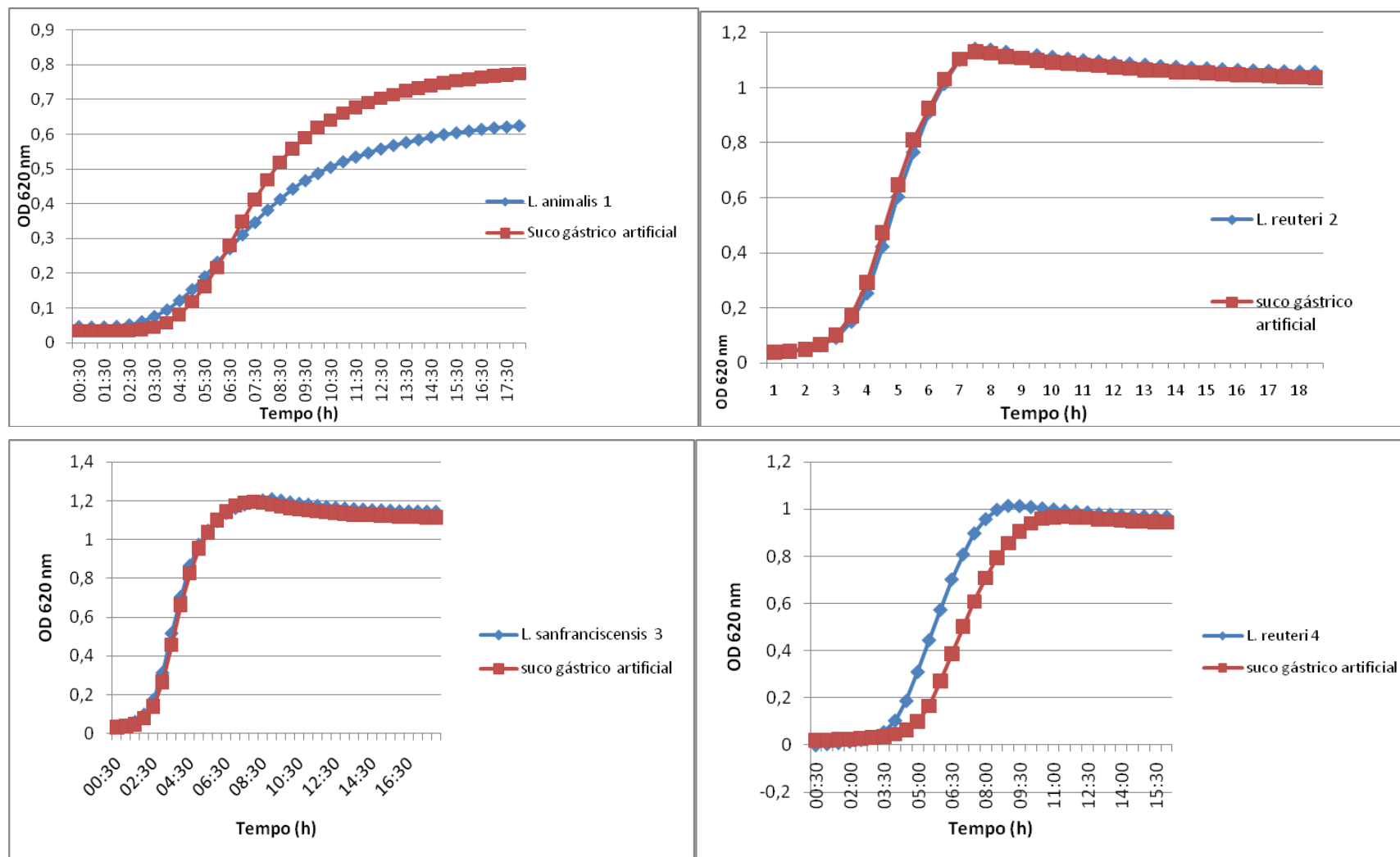
Anexo I: Perfis de digestão esperado para a determinação das espécies de lactobacilos. Os “+” representam digestões positivas entre as regiões 16S-23S para os espaçadores maior, intermediário e menor de *Lactobacillus*.

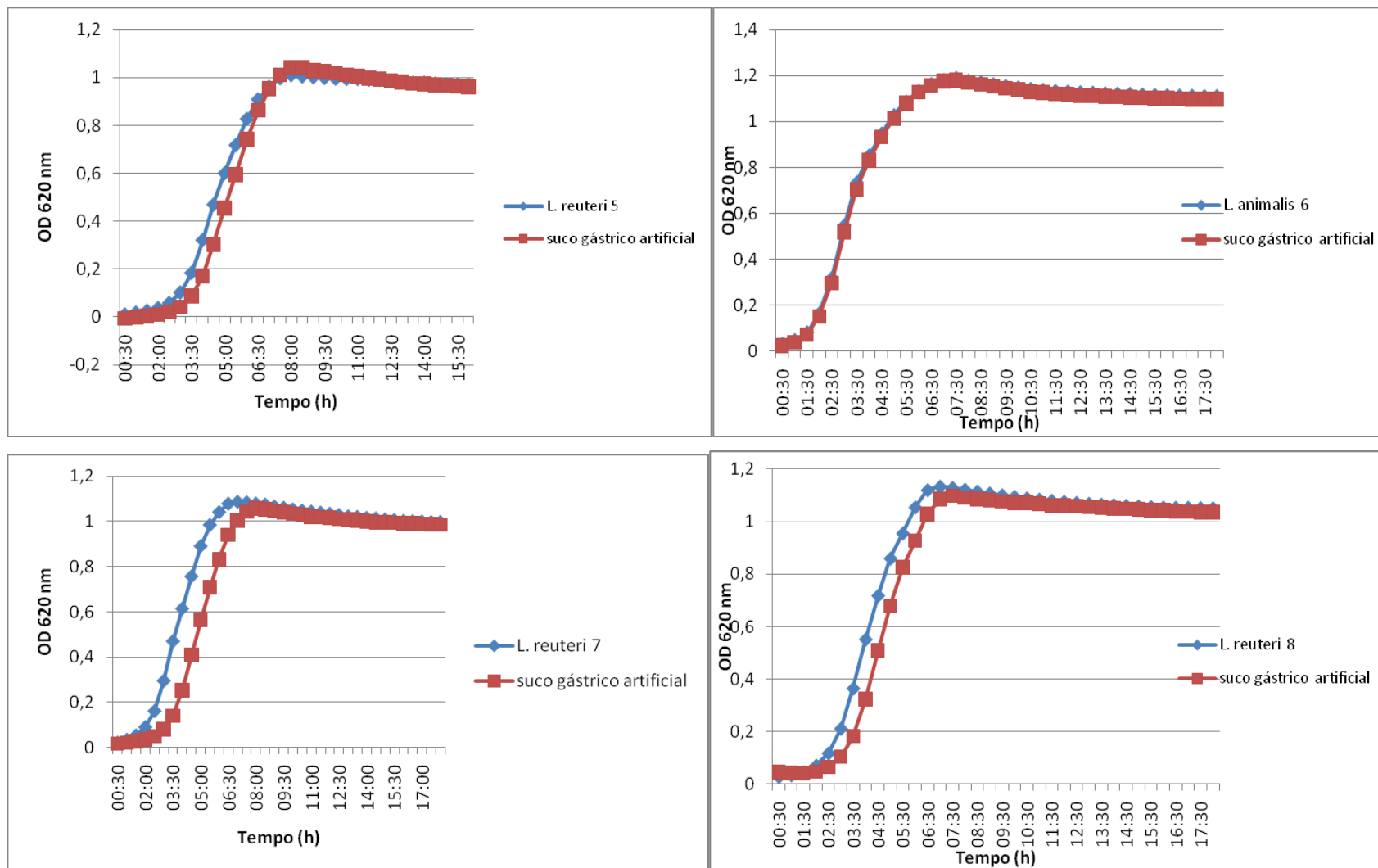
<i>SphI</i>	<i>NcoI</i>	<i>NheI</i>	<i>SspI</i>	<i>Csp45I</i>	<i>EcoRV</i>	<i>DraI</i>	<i>VspI</i>	<i>HincII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	<i>AvrII</i>	IDENTIFICAÇÃO
---	+++	---	---	---	---	---	---	---	+++	+++	+++	<i>L. acidophilus</i>
+++	---	+++	+++	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. agilis</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	+++	+	---	+++	---	<i>L. alimentarius</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	+++	+	---	+++	---	<i>L. animalis</i>
+++	---	---	---	---	---	---	+++	---	---	+++	---	<i>L. brevis</i>
+++	---	---	---	+	+++	+++	---	---	---	+++	---	<i>L. camelliae</i>
---	---	---	---	---	+++	+++	+++	---	---	+++	---	<i>L. casei</i>
+++	+++	---	+++	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. coleohominis</i>
---	+++	---	---	+	+++	---	---	---	+++	+++	+++	<i>L. crispatus</i>
---	+++	---	---	+++	---	---	---	---	---	---	---	<i>L. delbrueckii</i>
+++	+	---	---	---	---	+++	+++	+	---	+++	---	<i>L. farciminis</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	+++	---	<i>L. ferintoshensis</i>
+++	---	+	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. fermentum</i>
+++	---	---	+++	---	---	+++	+++	+	---	+++	---	<i>L. fructivorans</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+	---	---	---	<i>L. frumenti</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	+	+++	<i>L. gasseri</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	+++	---	<i>L. hilgardii A</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	---	---	+++	---	<i>L. hilgardii B</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	---	---	<i>L. jensenii</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	+	---	<i>L. johnsonii</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. mucosae</i>
---	---	---	---	---	---	+++	---	+	---	+++	---	<i>L. murinus</i>
+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	<i>L. nagelli</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. panis</i>
+++	+	+++	---	+++	+++	+++	---	---	+++	---	---	<i>L. pantheris</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	+++	+	---	+++	---	<i>L. paralimentarius</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. paraplantarum</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. pentosus</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	+	---	+++	---	<i>L. perolens</i>
+++	---	---	+++	+	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. plantarum A</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. plantarum B</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. pontis</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+	---	---	---	<i>L. reuteri A</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. reuteri B</i>
---	---	---	---	---	+++	+++	---	+	---	+++	---	<i>L. rhamnosus</i>
---	---	---	+++	+++	---	+++	---	+	---	---	---	<i>L. ruminis</i>
---	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	+++	---	<i>L. sakei</i>
---	---	---	+++	---	---	+++	---	---	---	---	---	<i>L. salivarius</i>
+++	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	+++	---	<i>L. sanfranciscensis</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+	---	---	---	<i>L. vaginalis A</i>

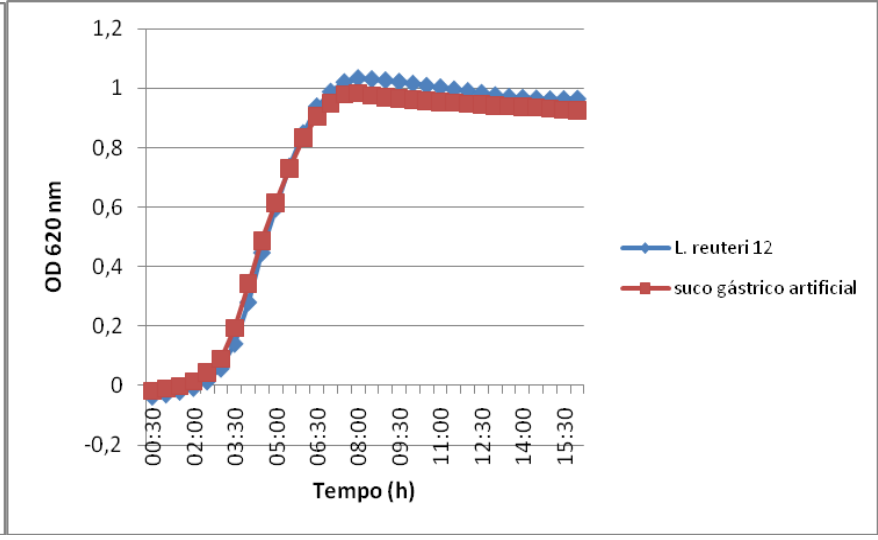
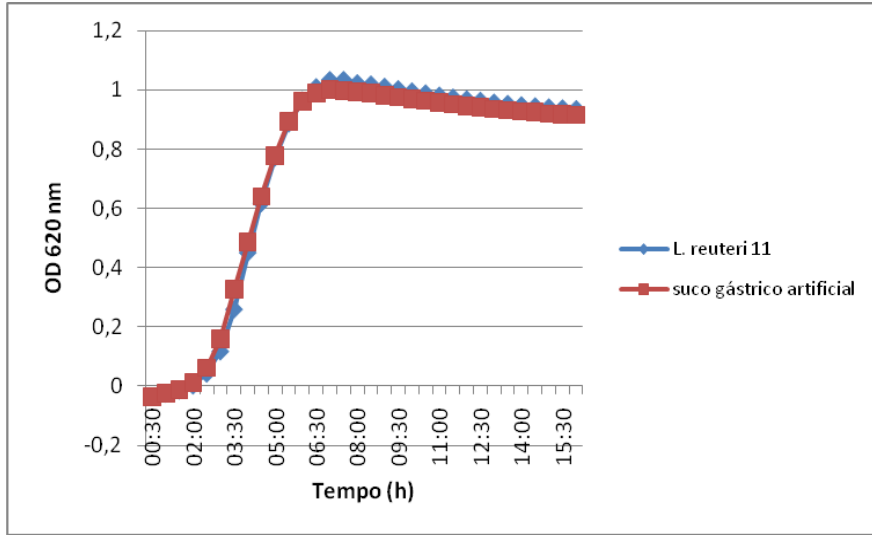
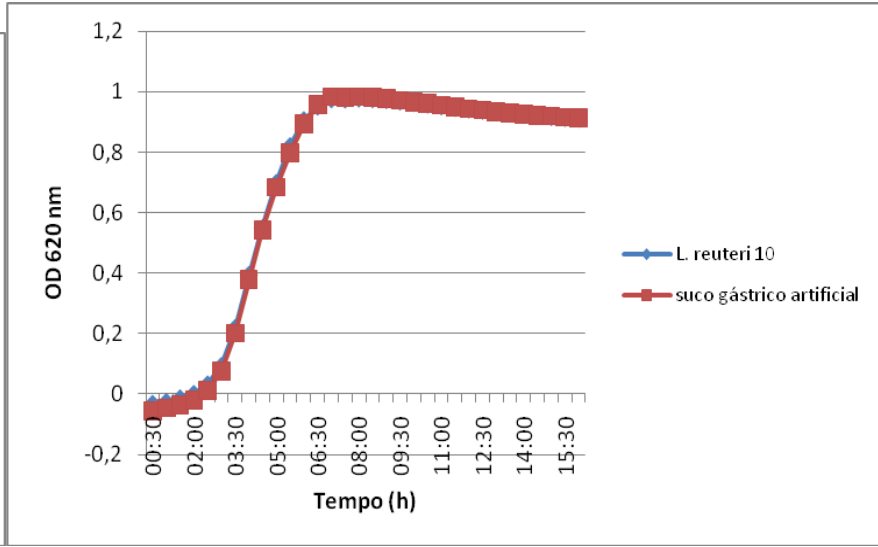
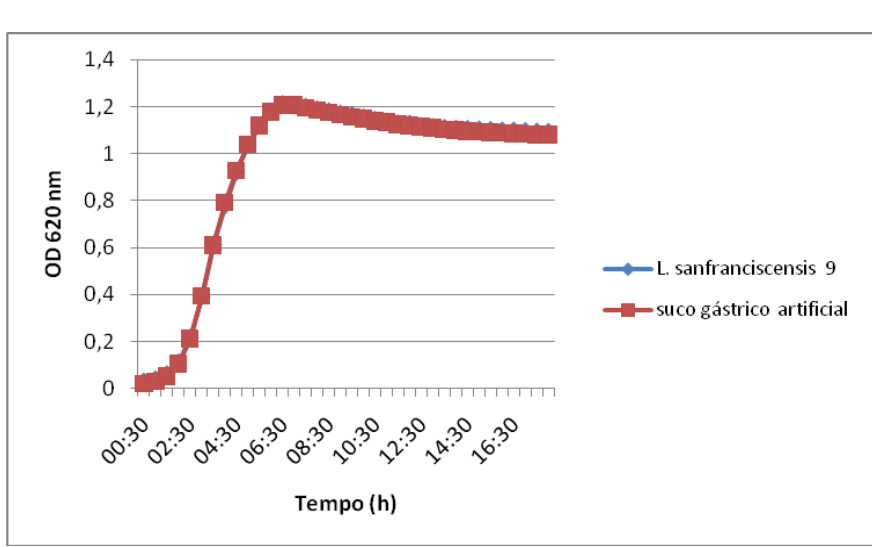
APÊNDICES:

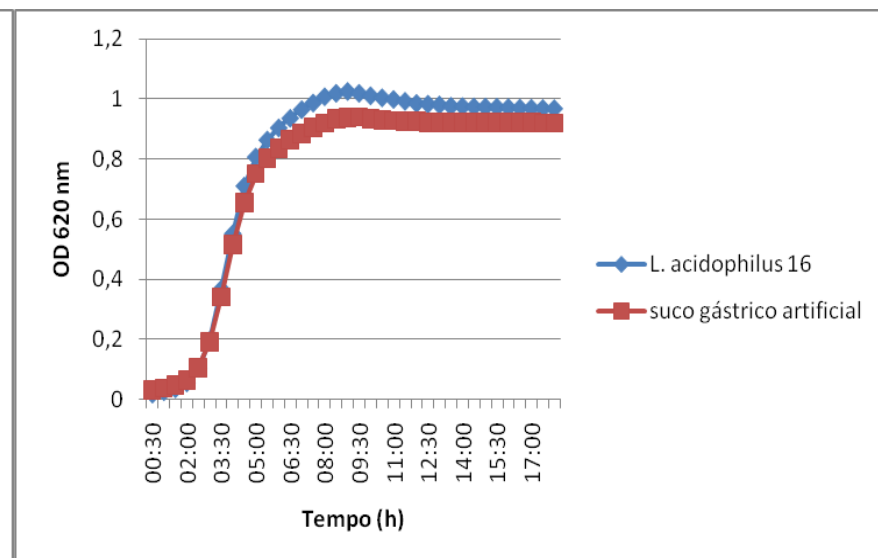
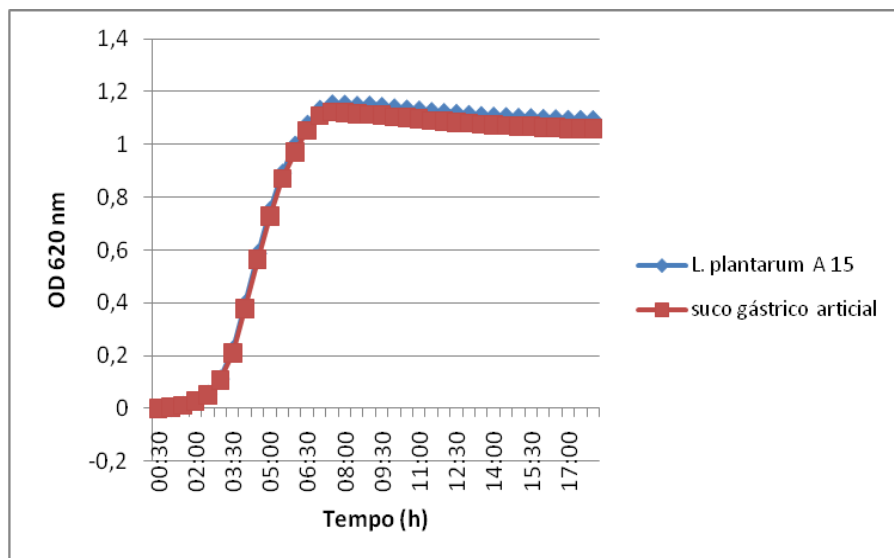
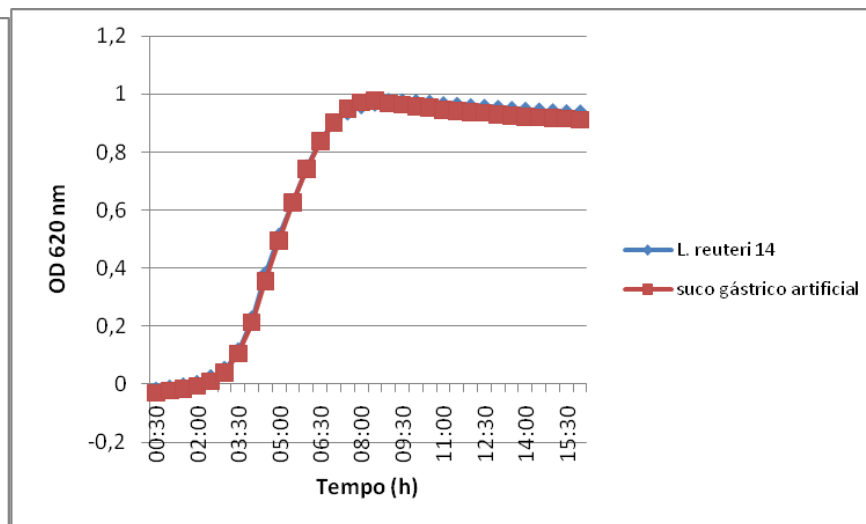
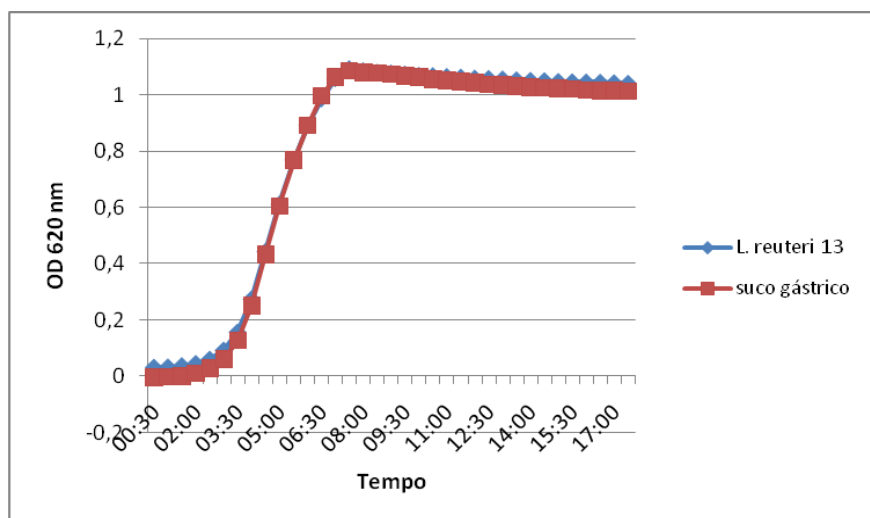
Apêndice I: Curvas de crescimento obtidas para os isolados de lactobacilos desafiados com suco gástrico artificial.

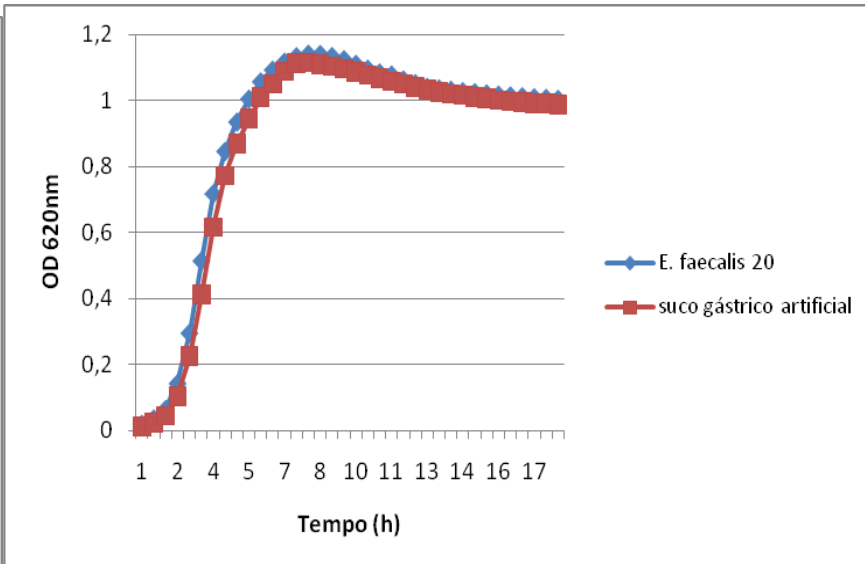
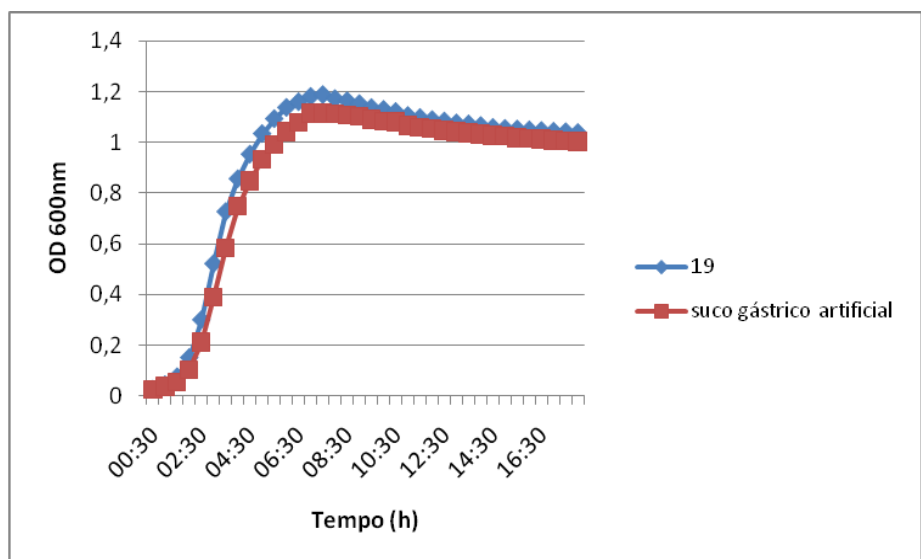
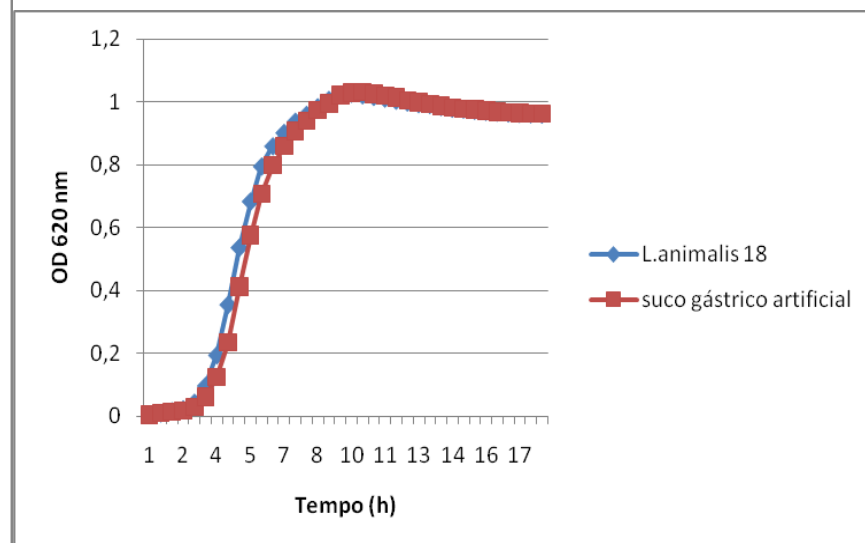
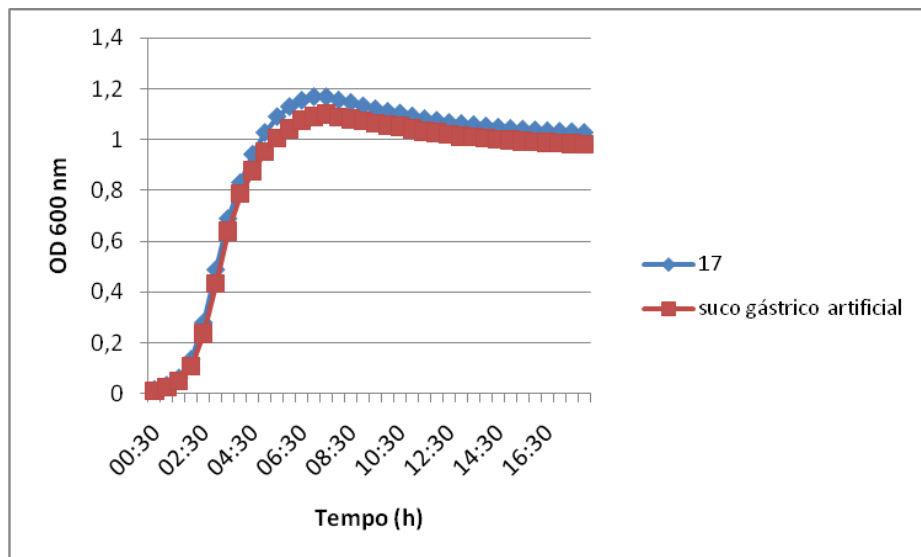
A linha azul equivale ao crescimento controle, a linha vermelha ao crescimento com o desafio. A porcentagem de inibição é mostrada no **Quadro 2**.

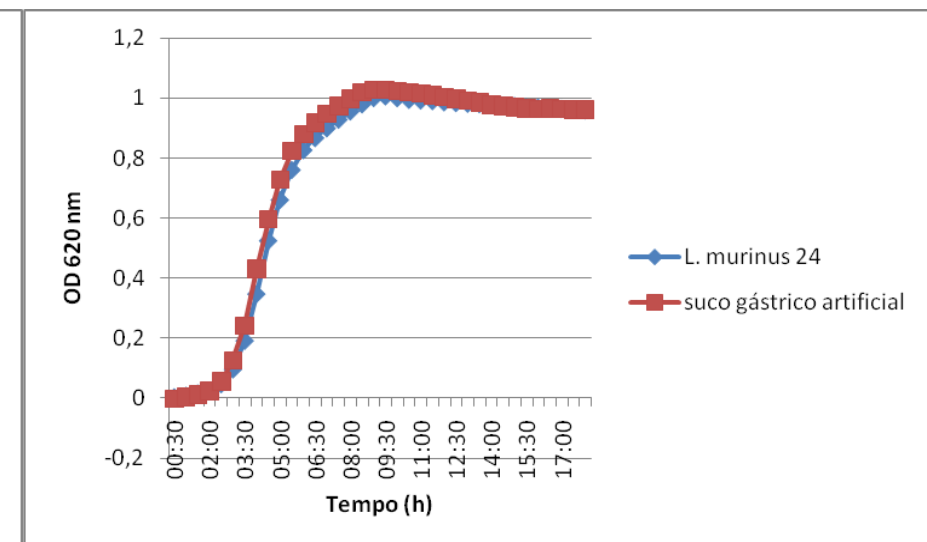
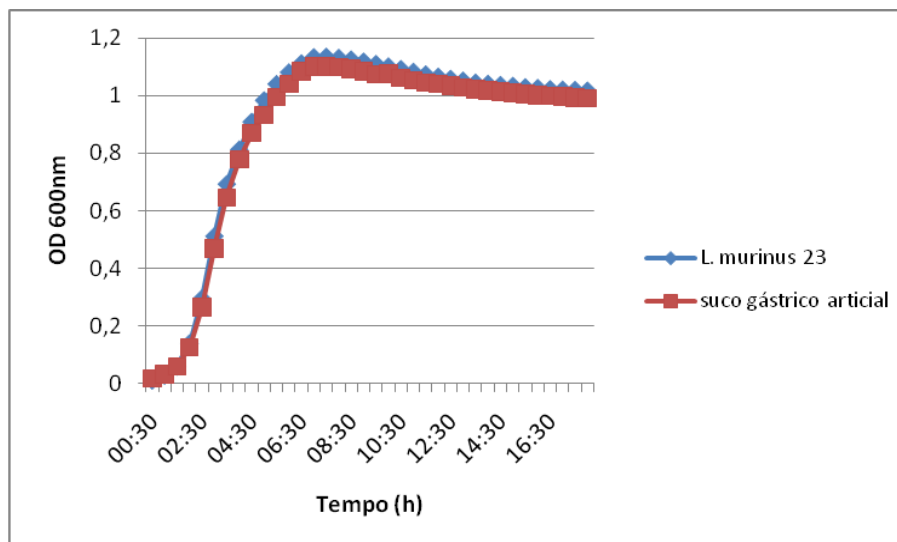
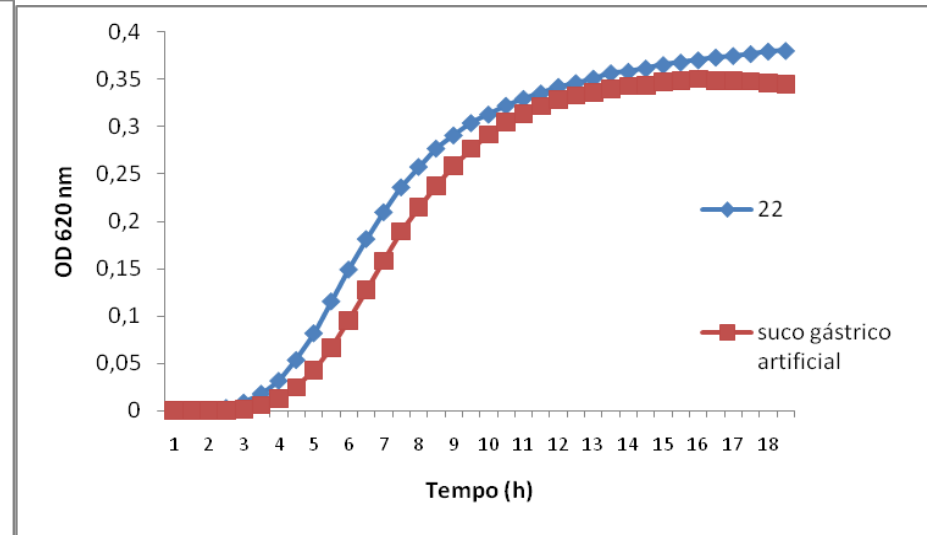
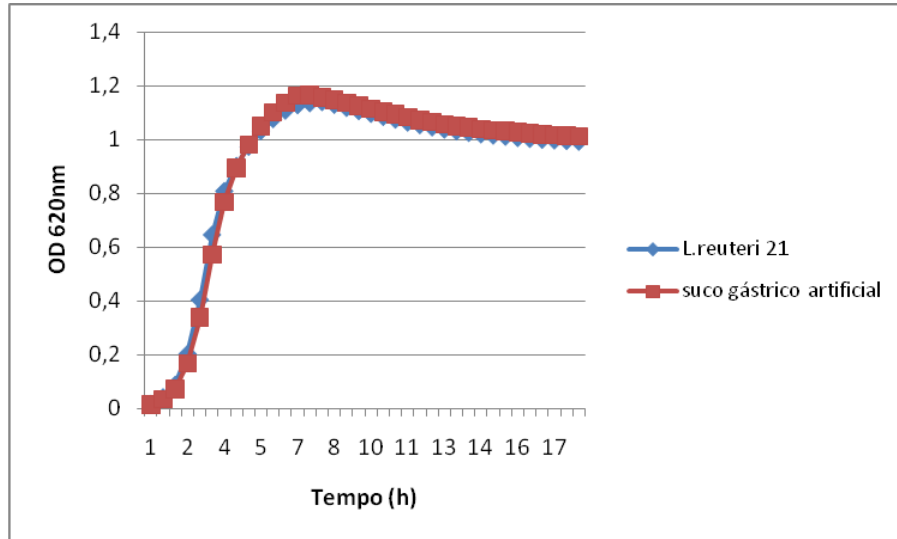


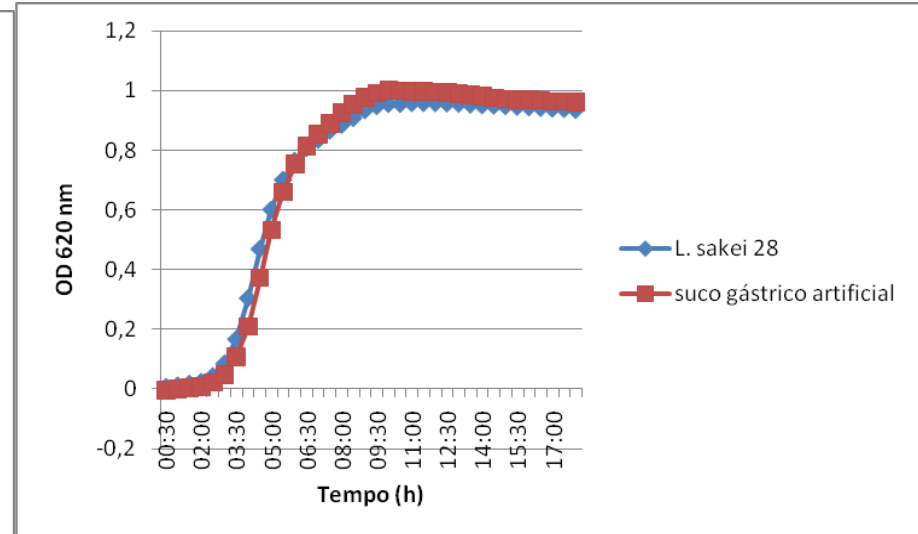
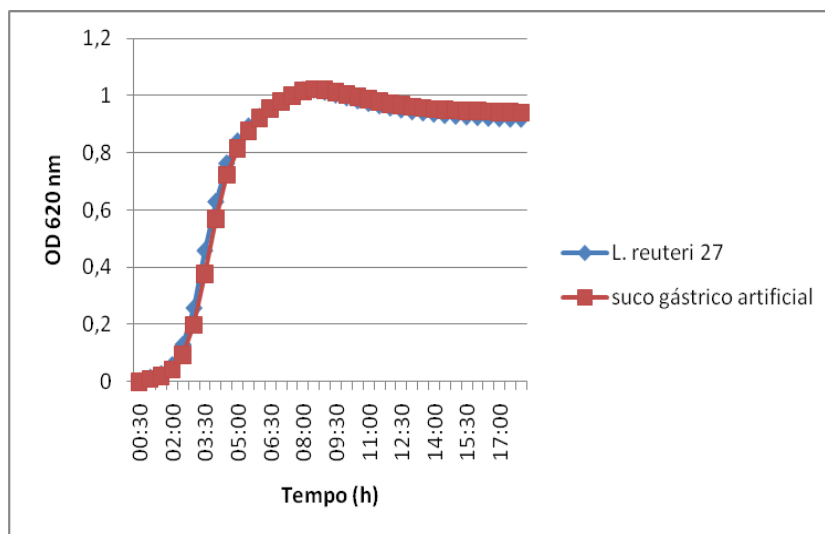
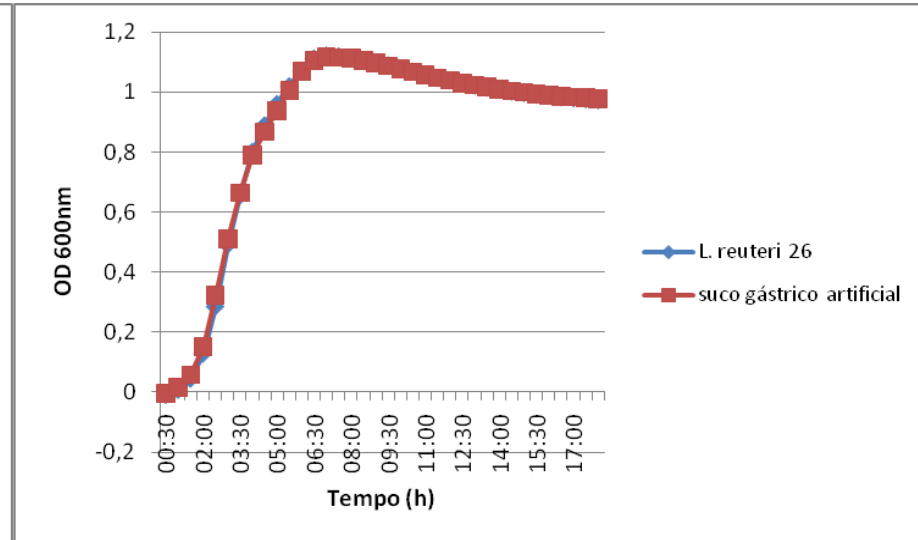
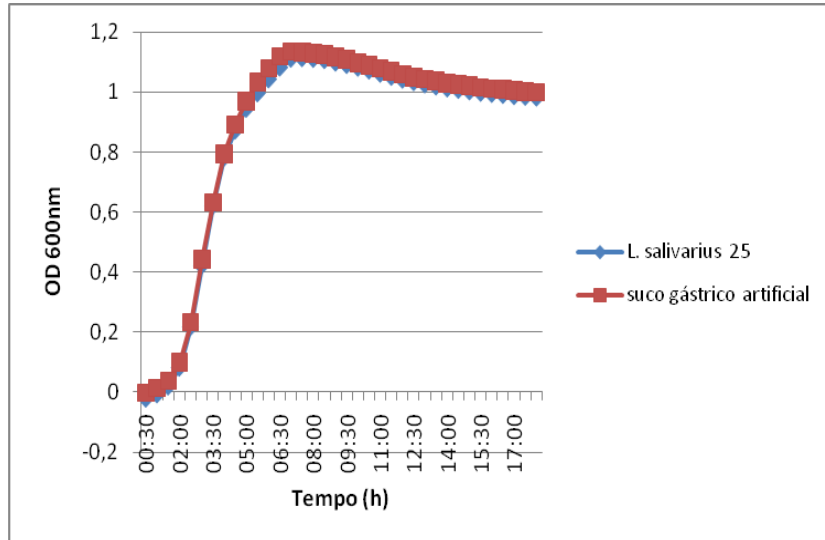


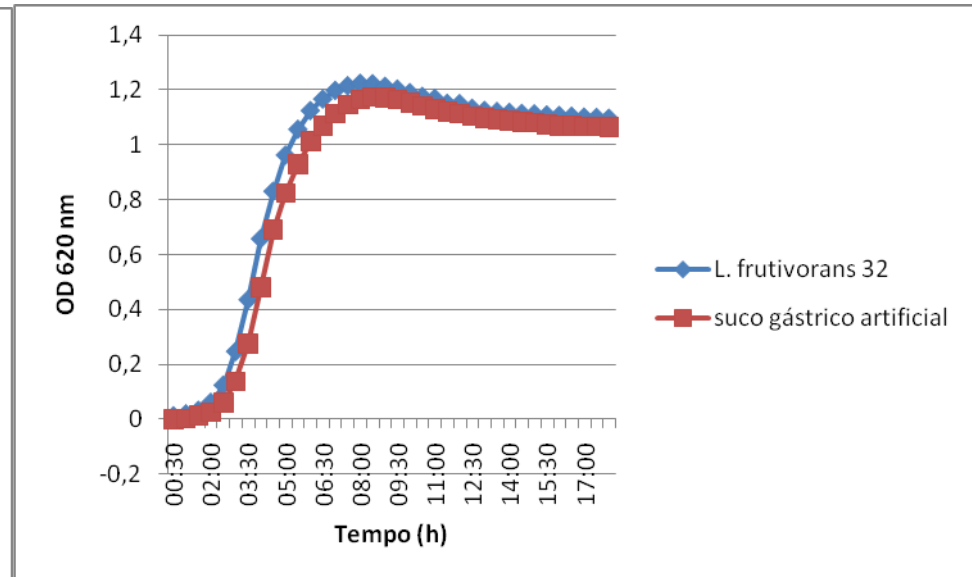
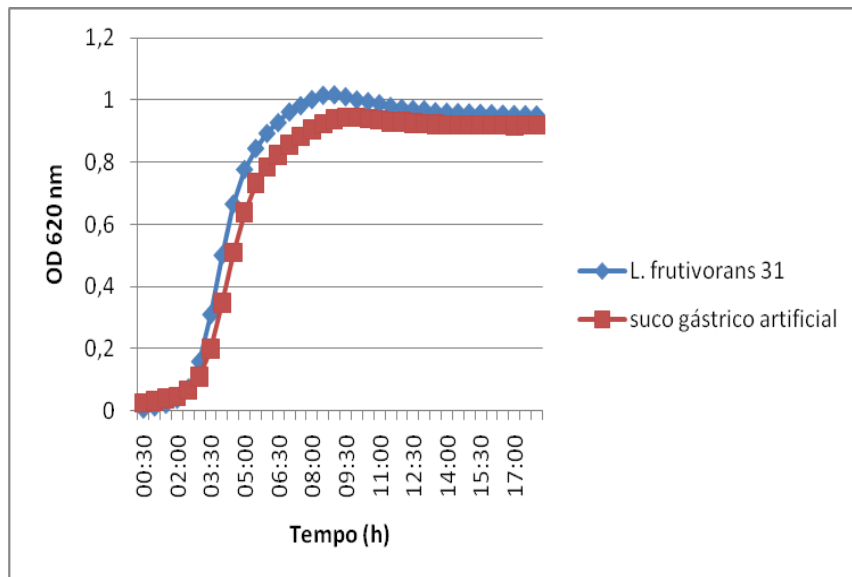
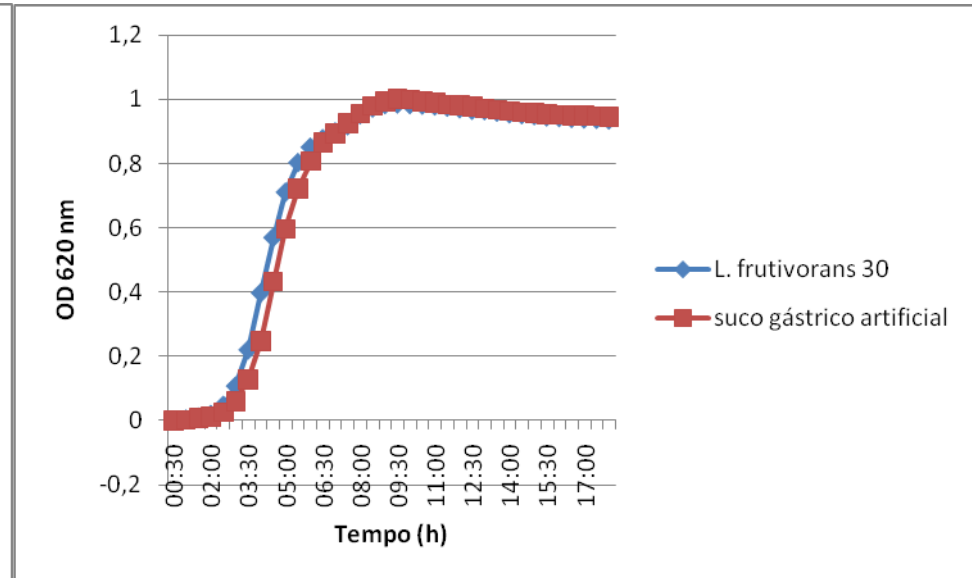
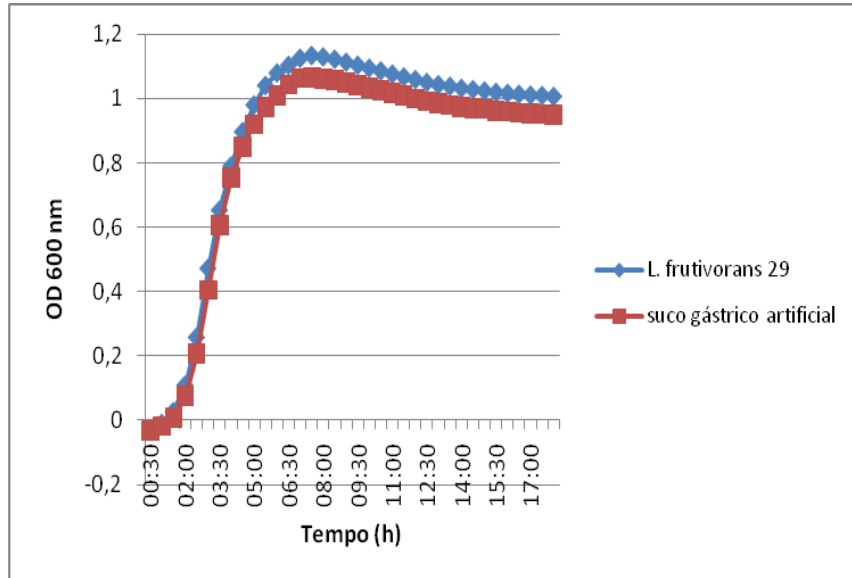


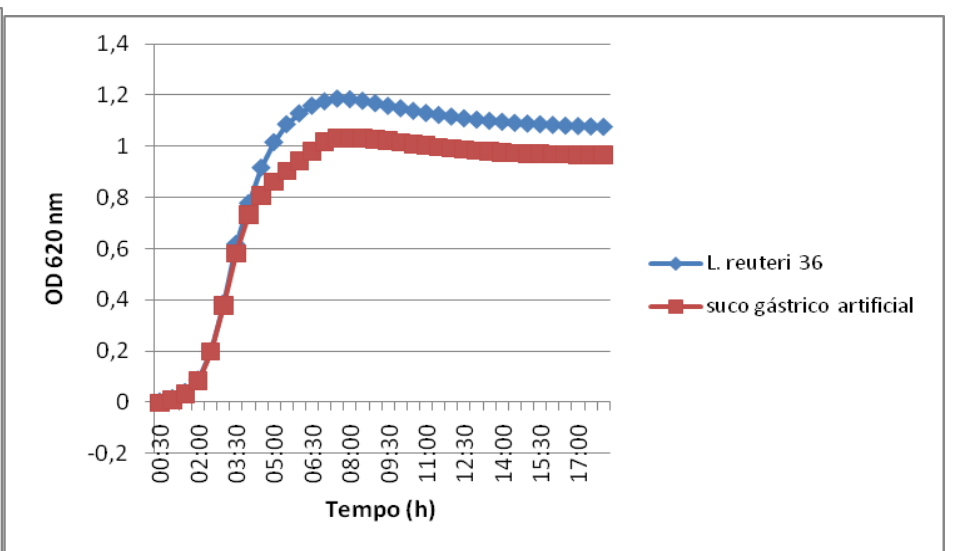
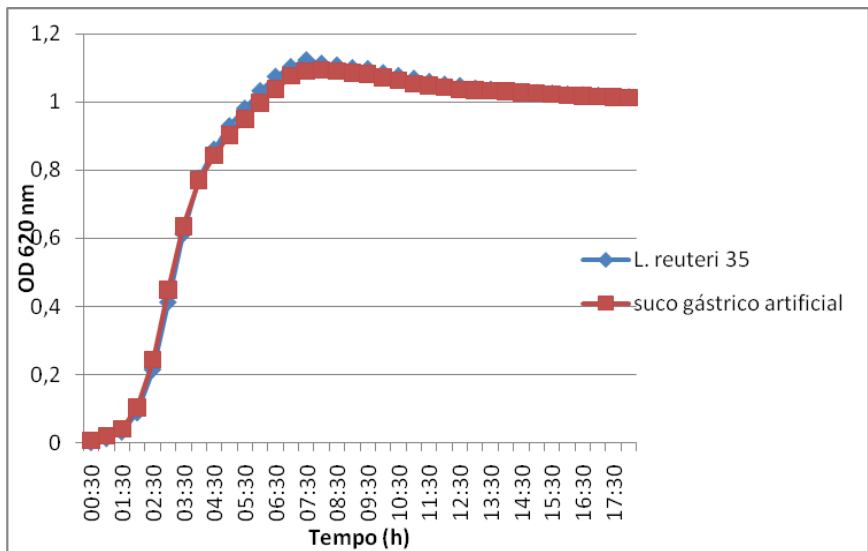
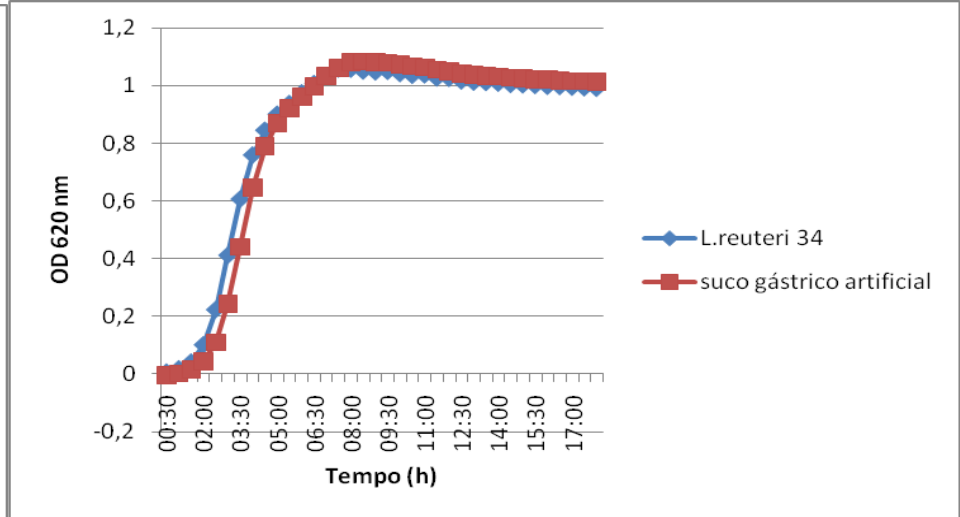
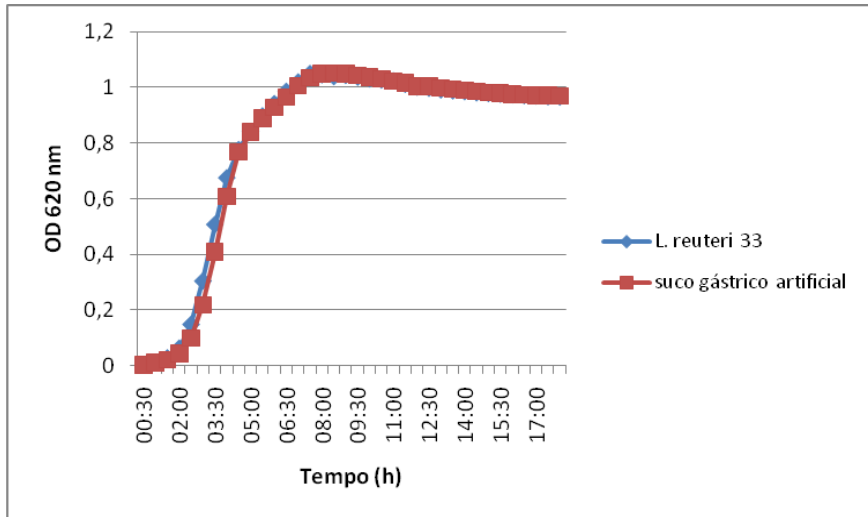


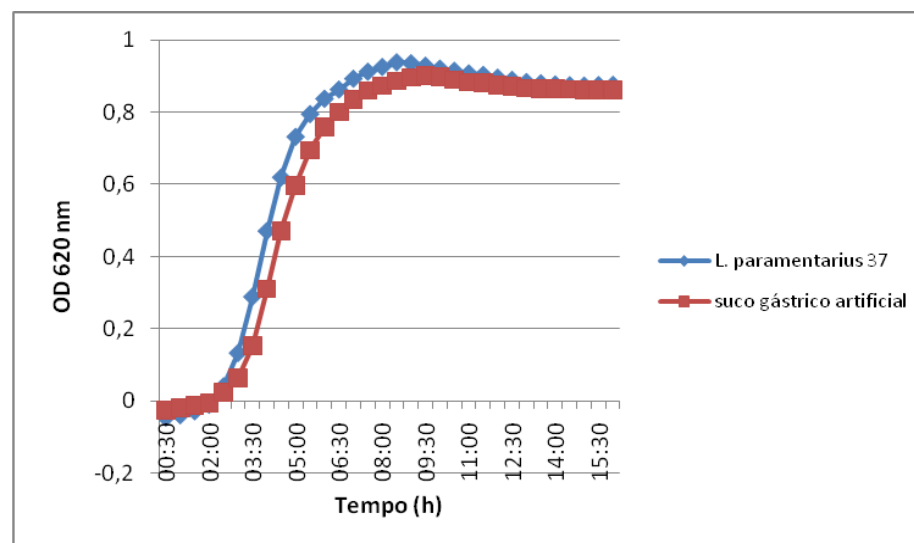






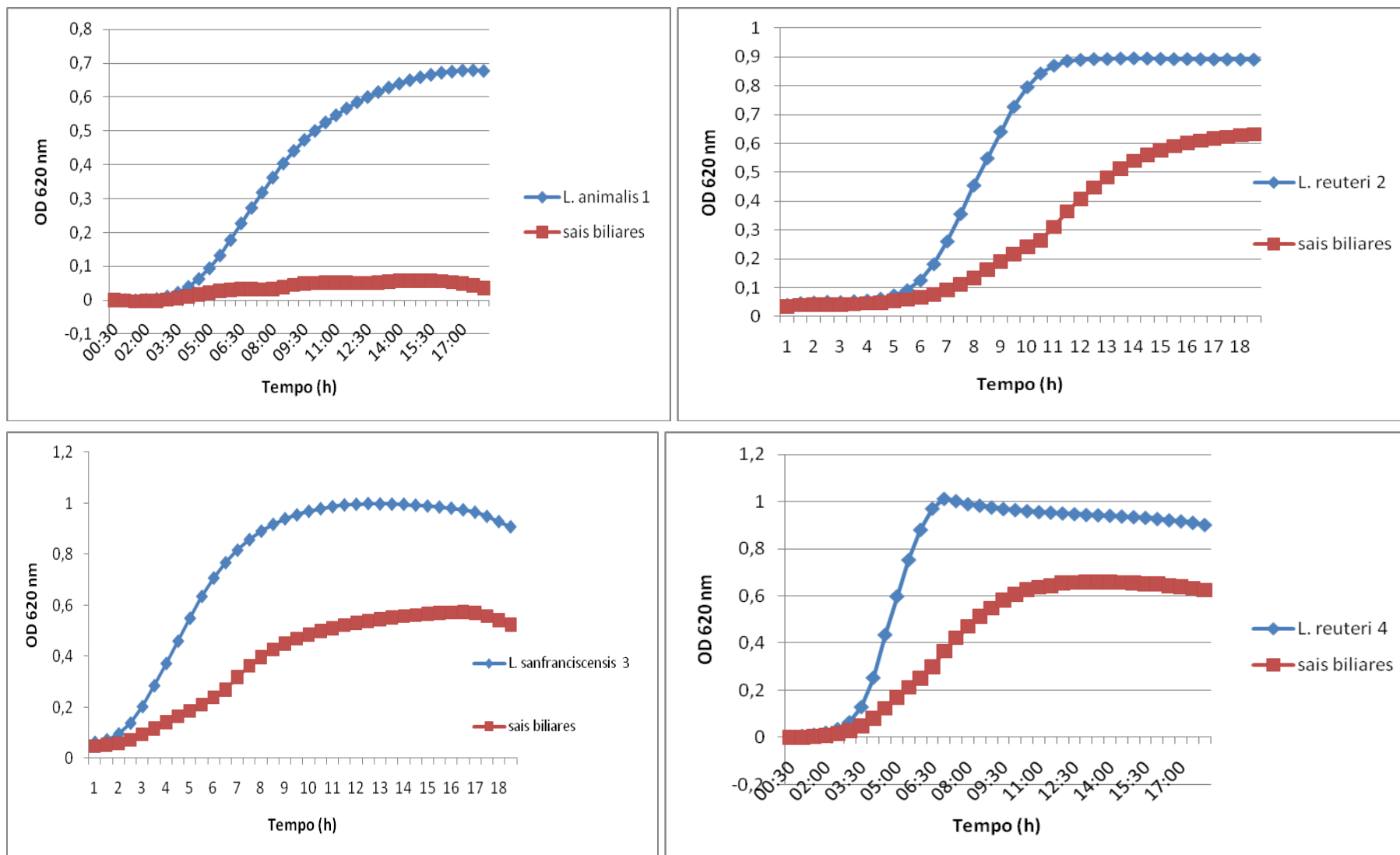


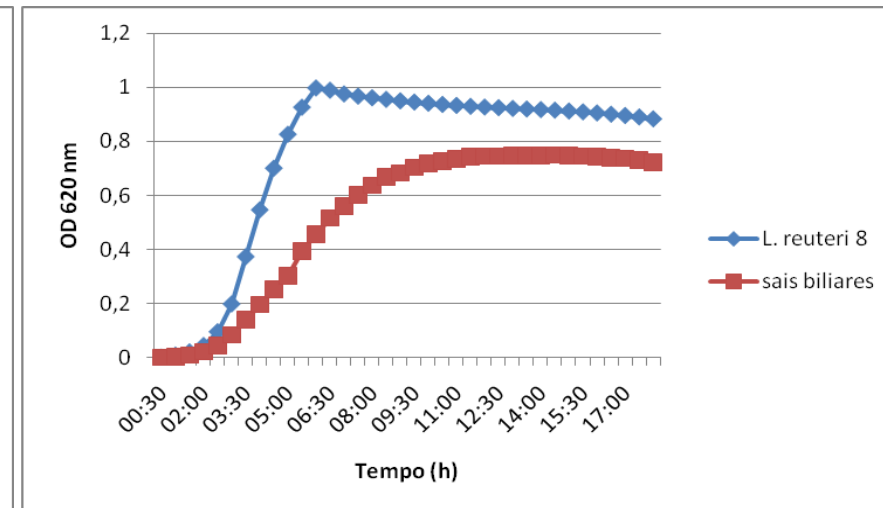
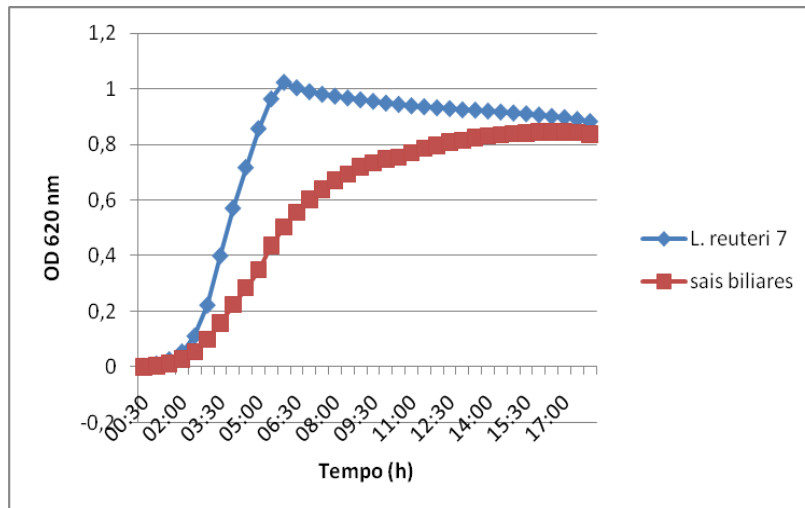
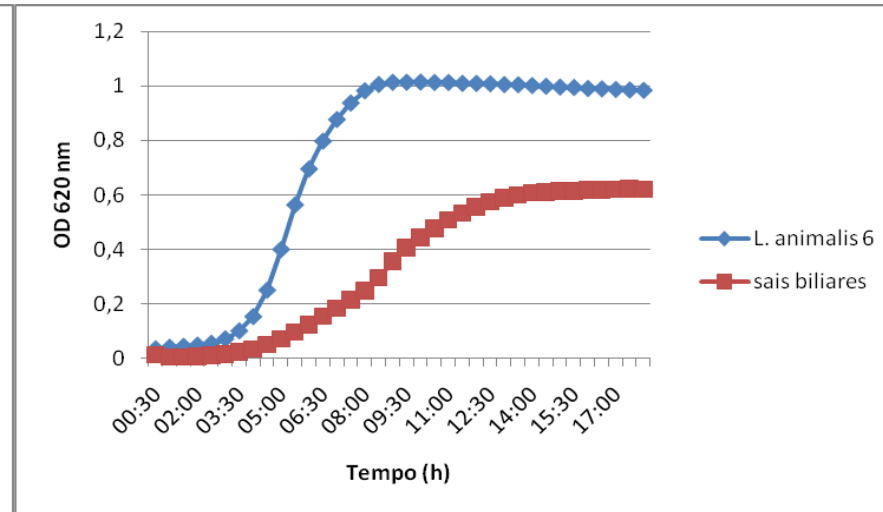
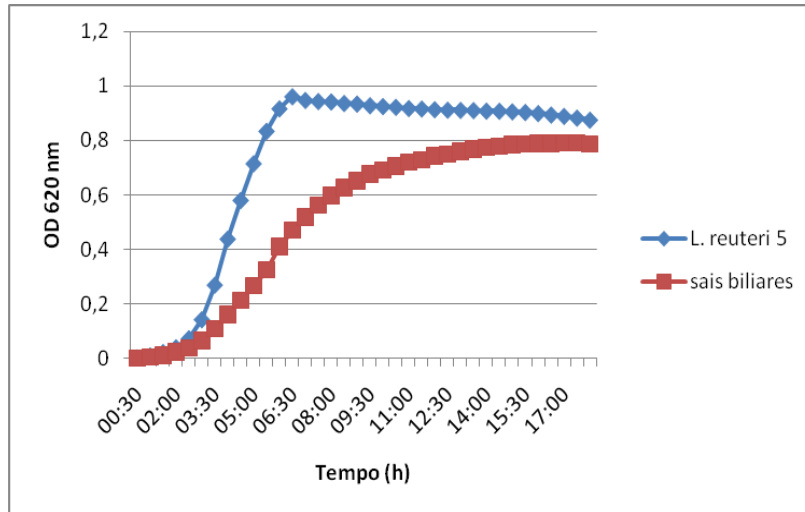


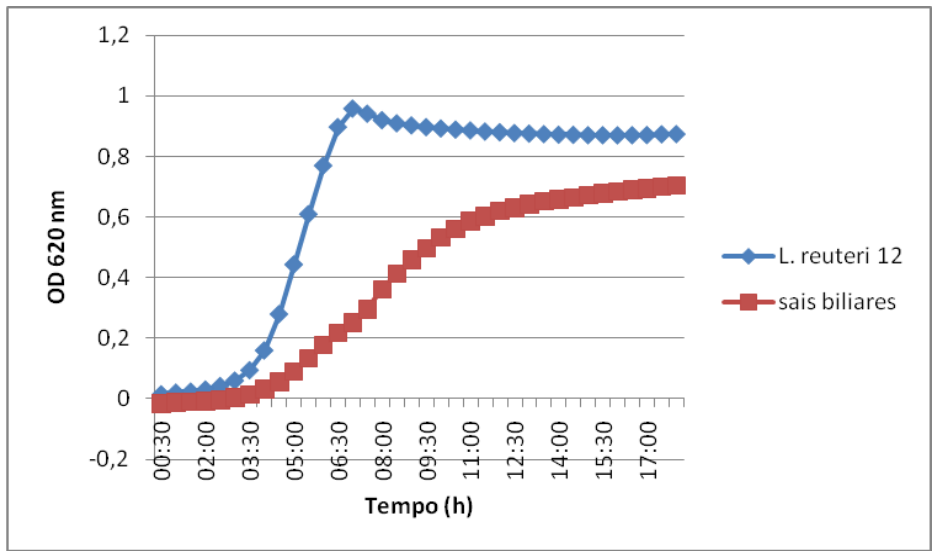
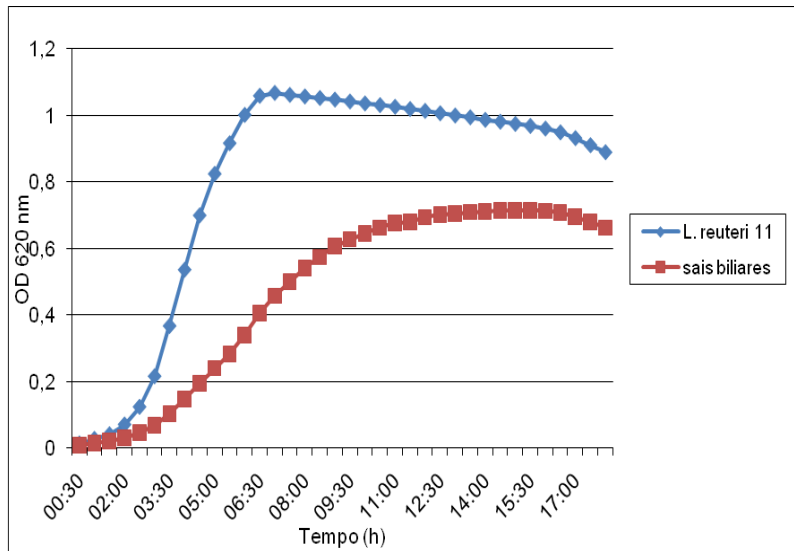
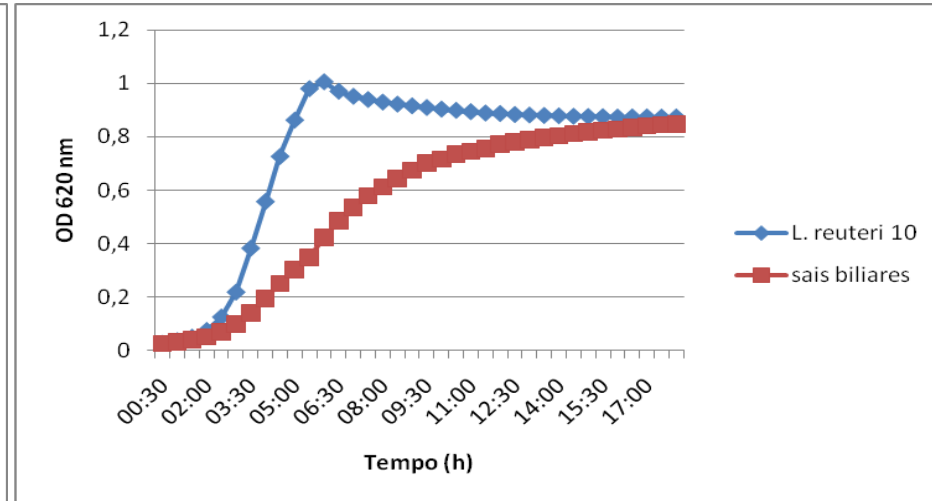
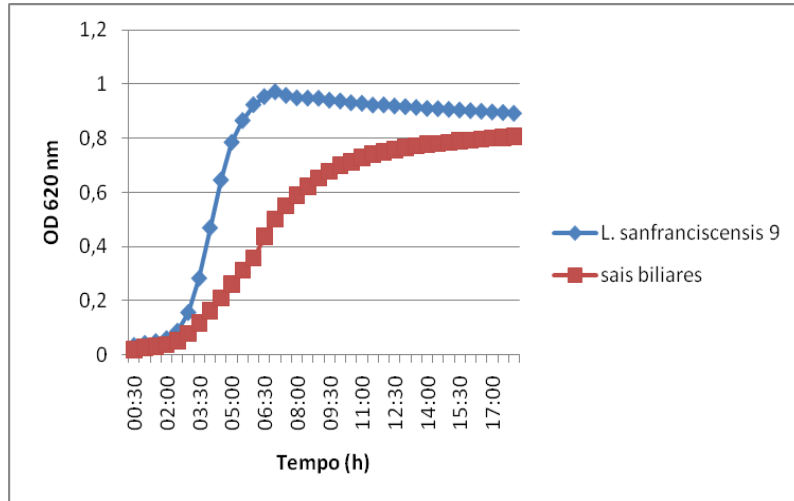


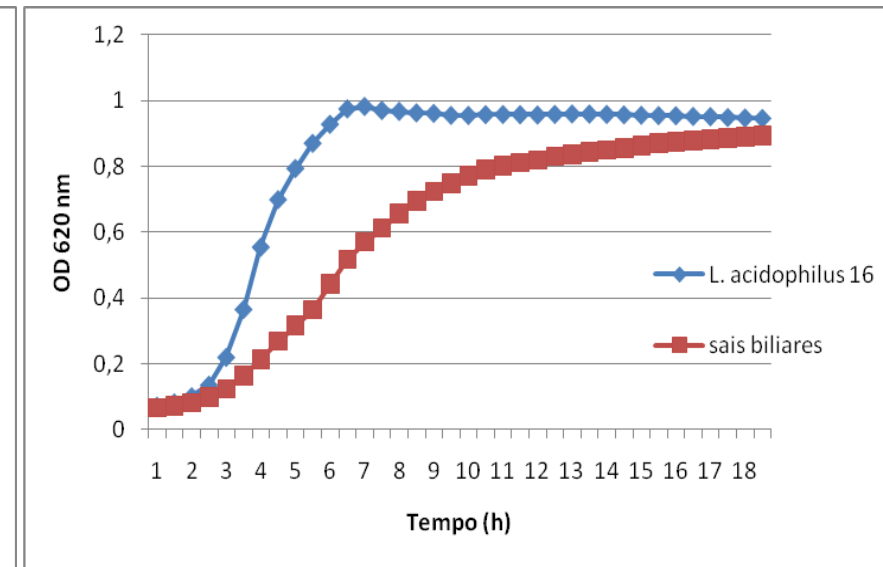
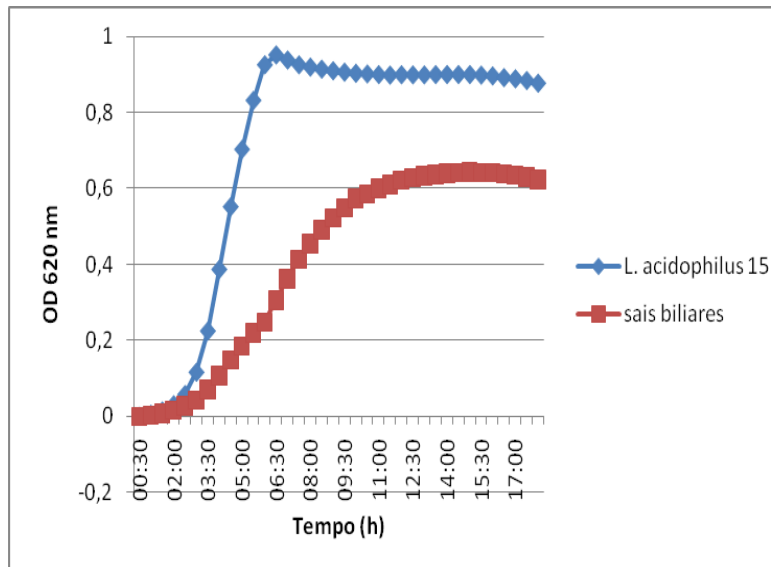
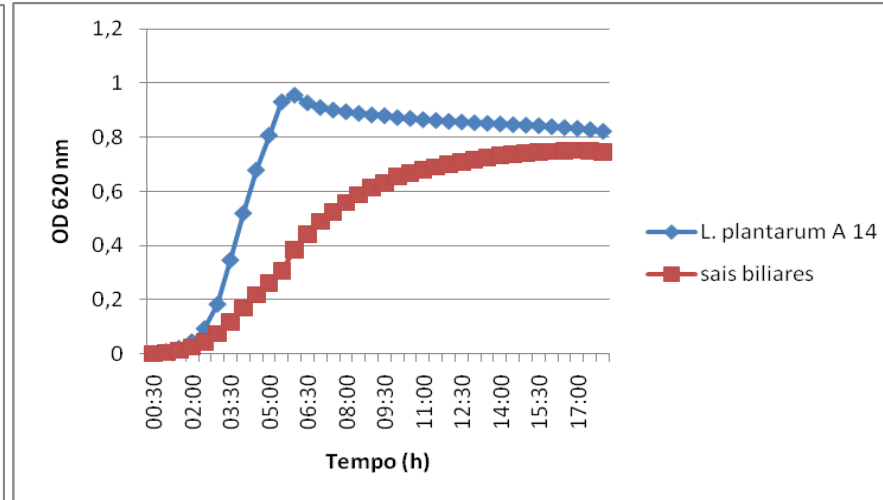
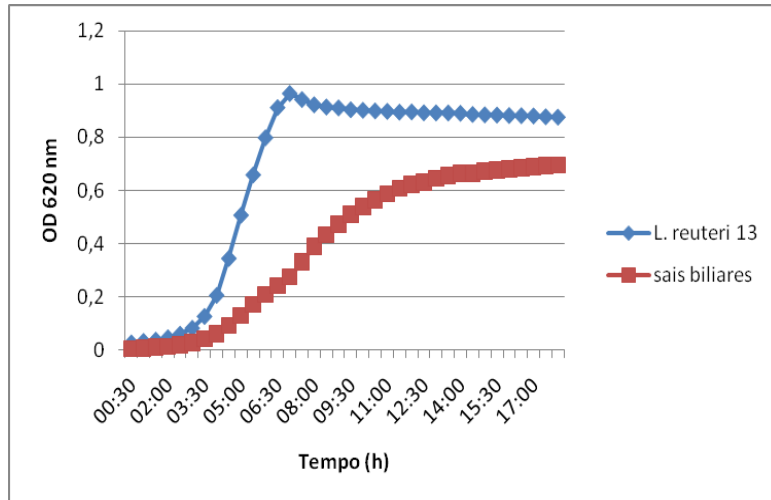
Apêndice II: Curvas de crescimento obtidas para os isolados de lactobacilos na presença de oxgall 0,3%.

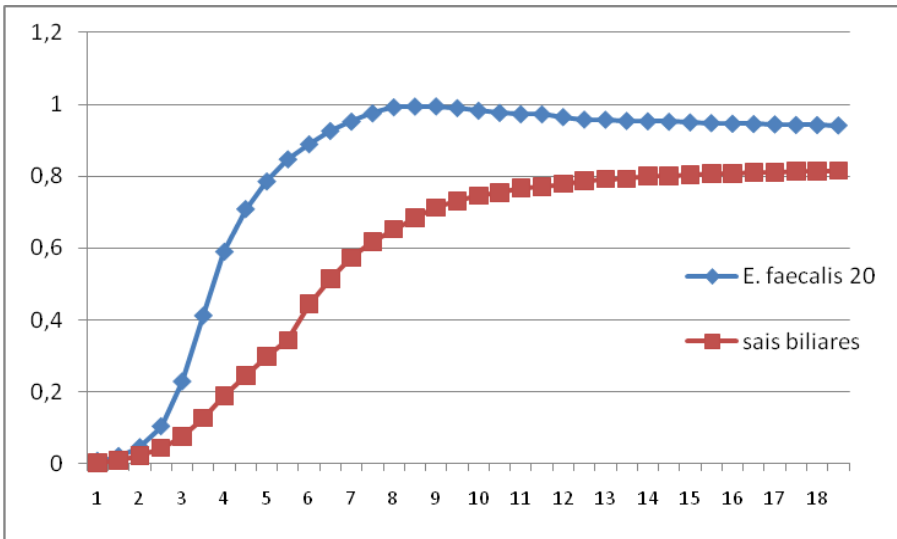
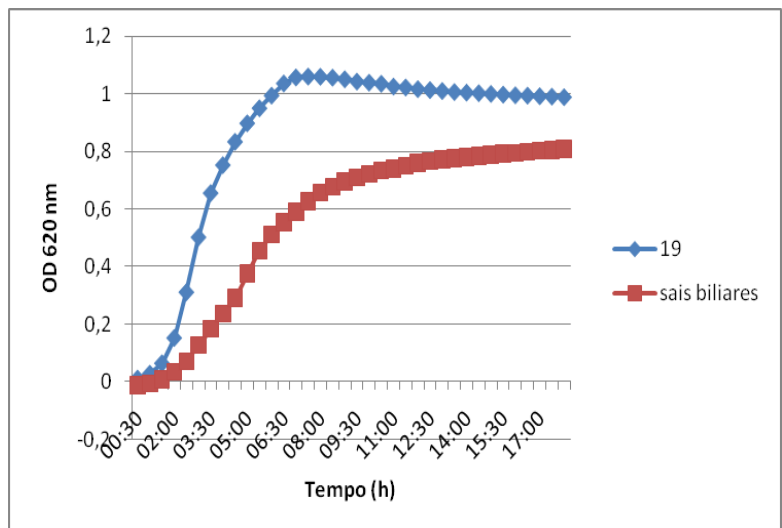
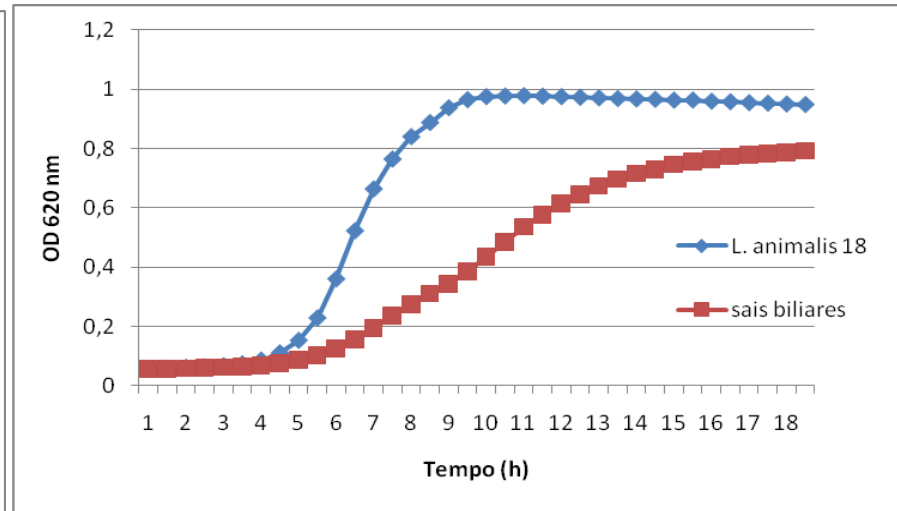
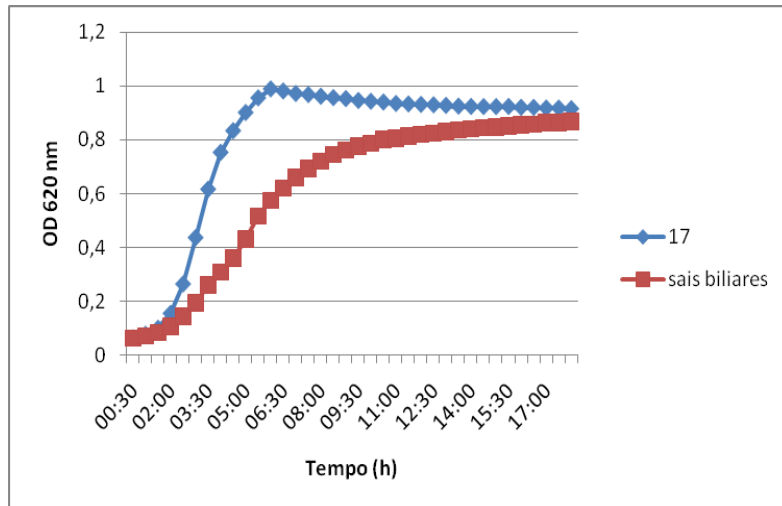
A linha azul equivale ao crescimento controle, a linha vermelha ao crescimento com oxgall 0,3%. A porcentagem de inibição é mostrada na **QUADRO 3**.

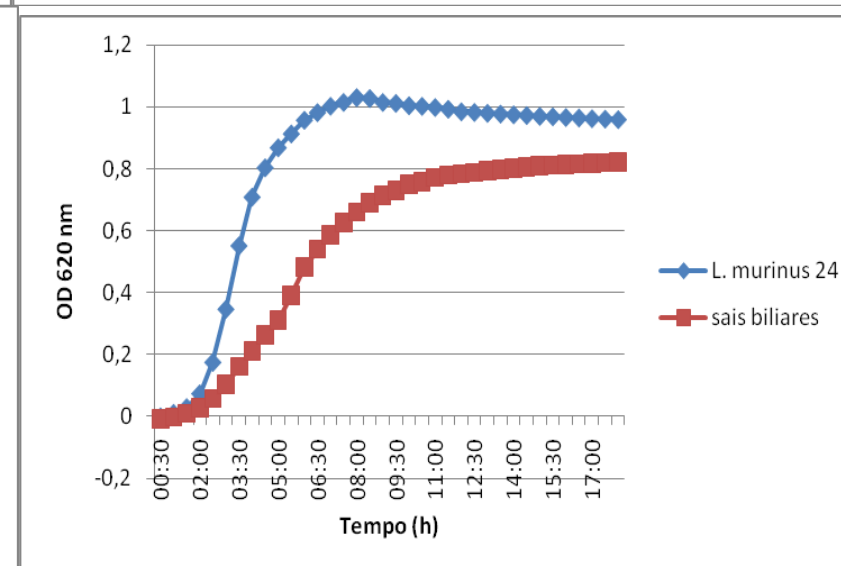
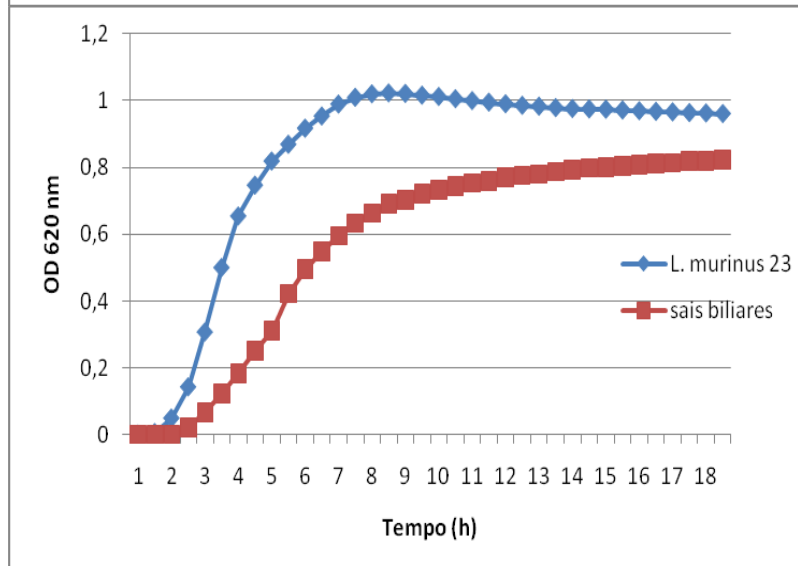
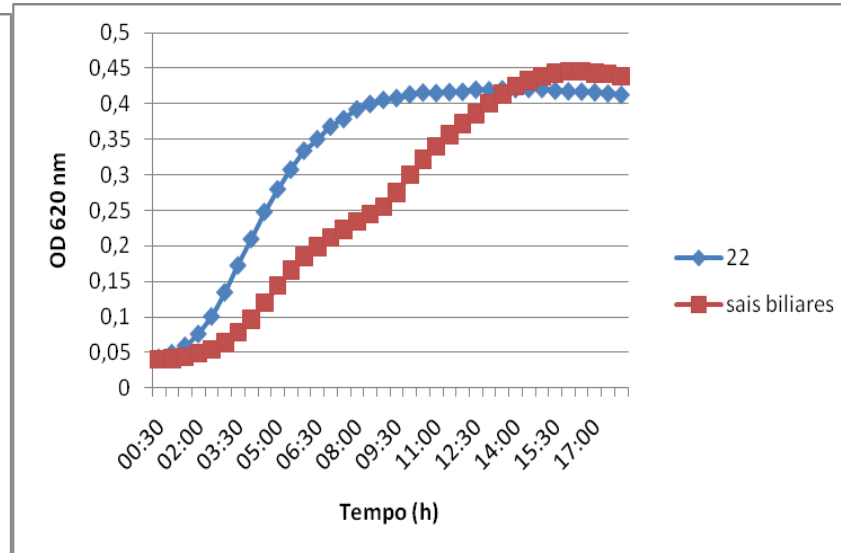
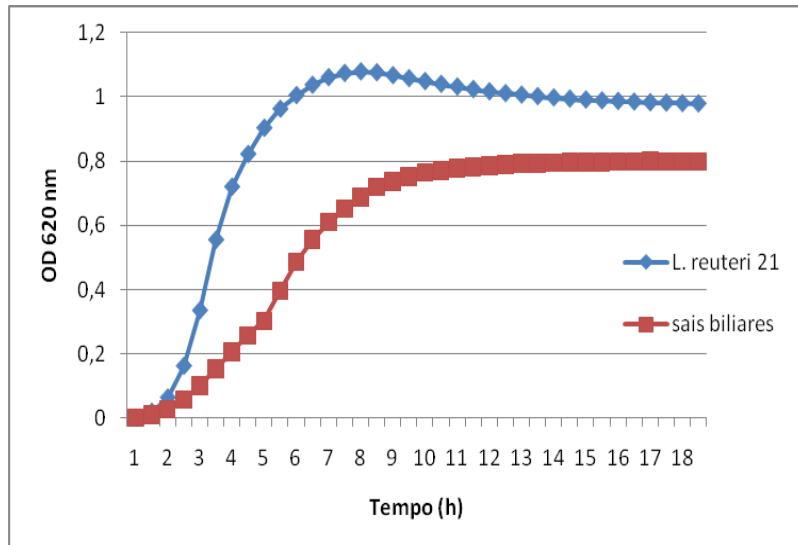


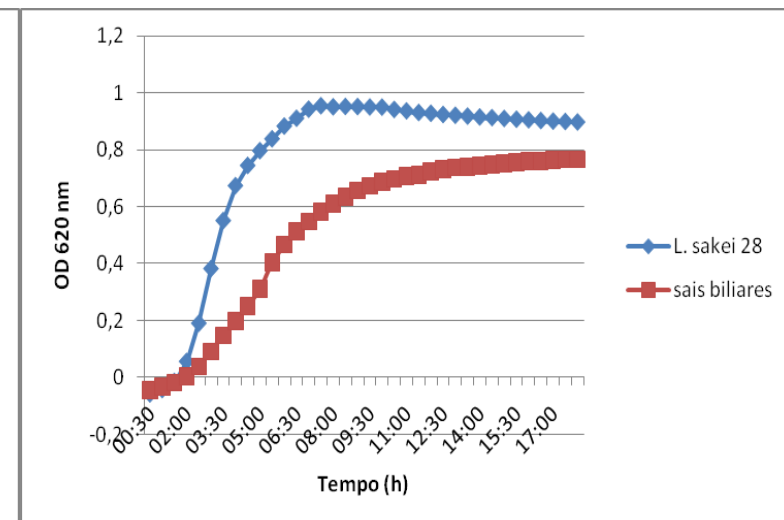
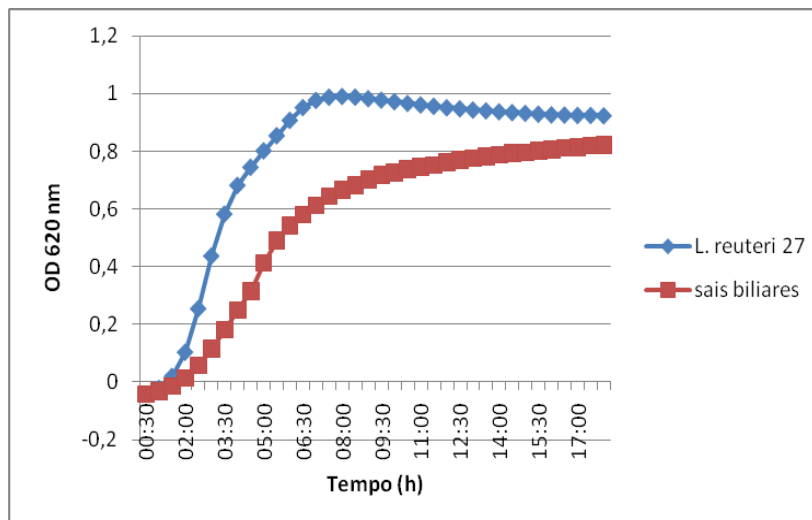
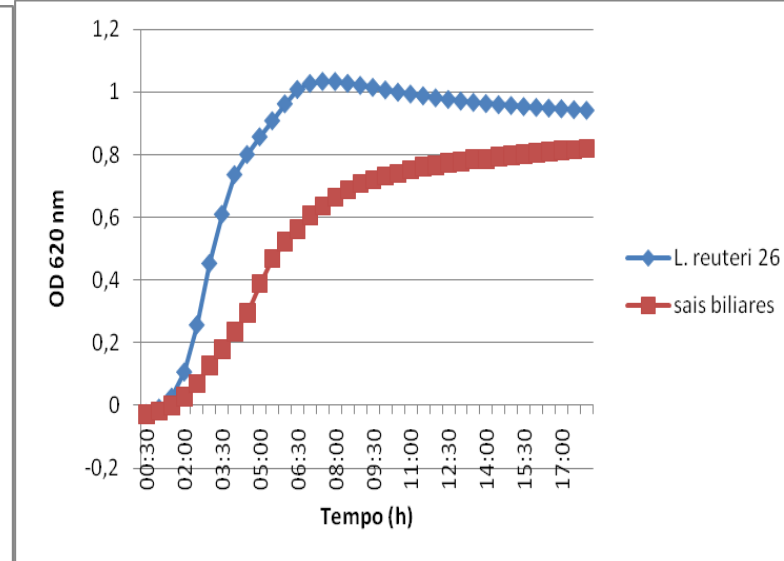
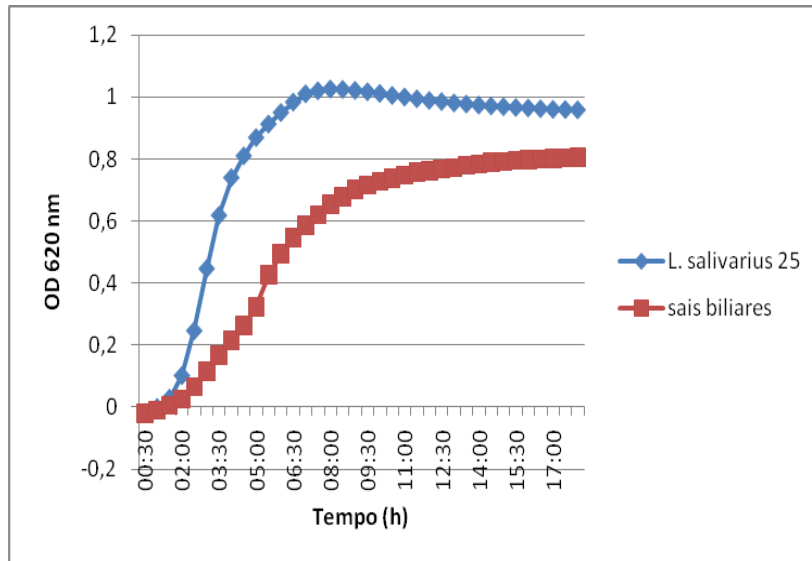


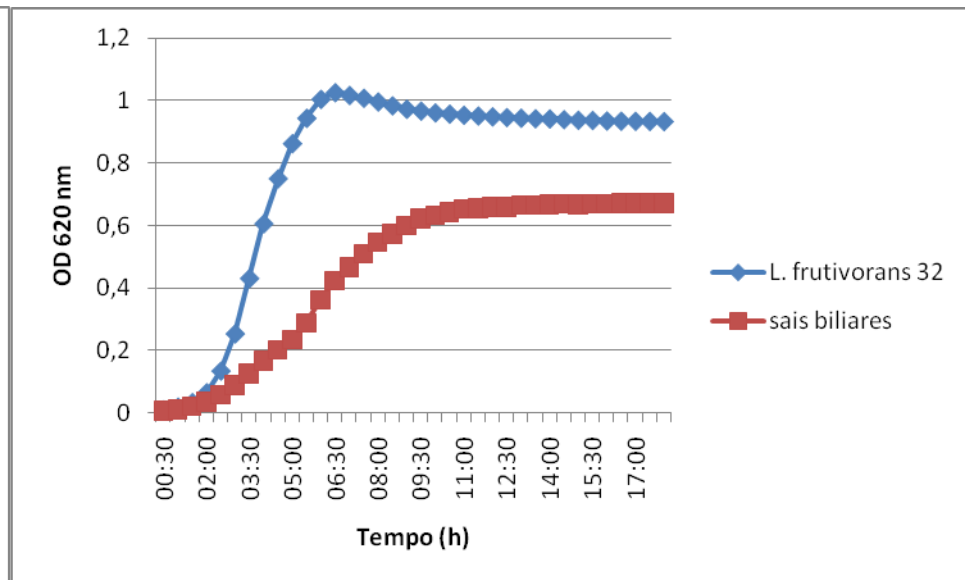
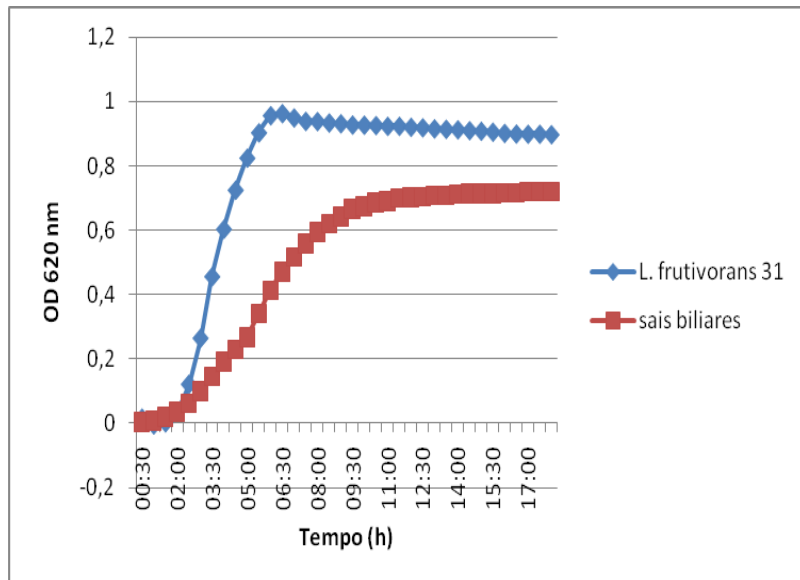
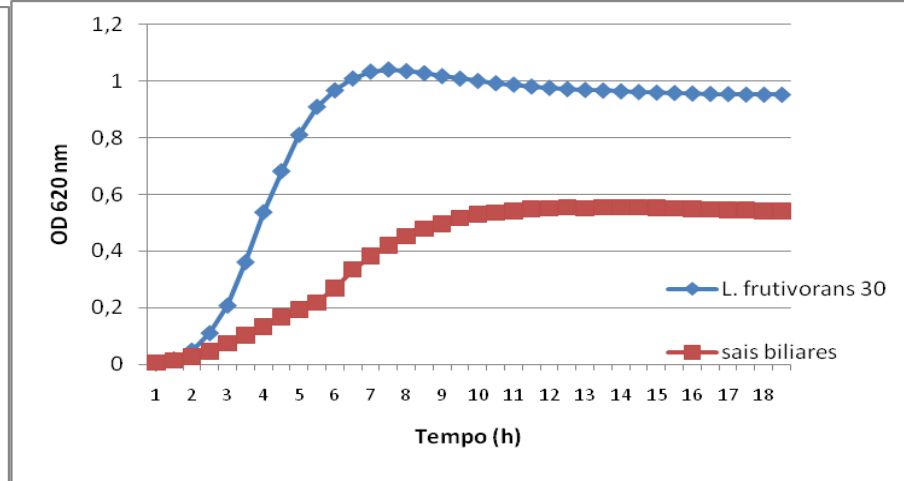
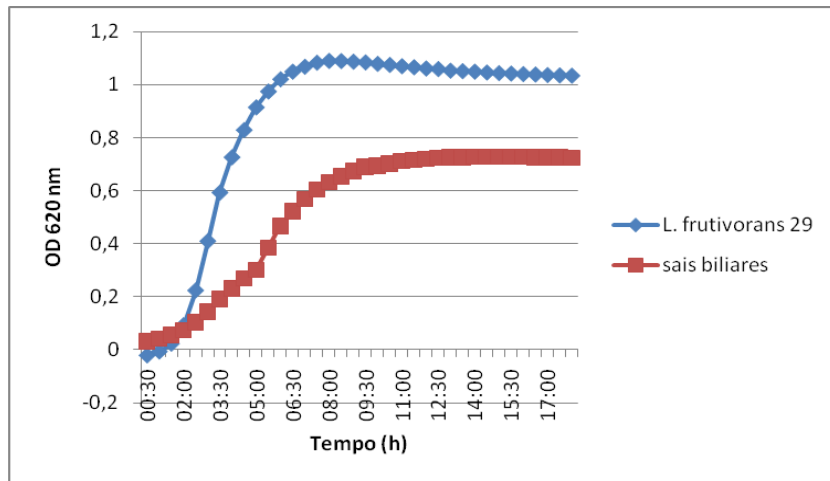


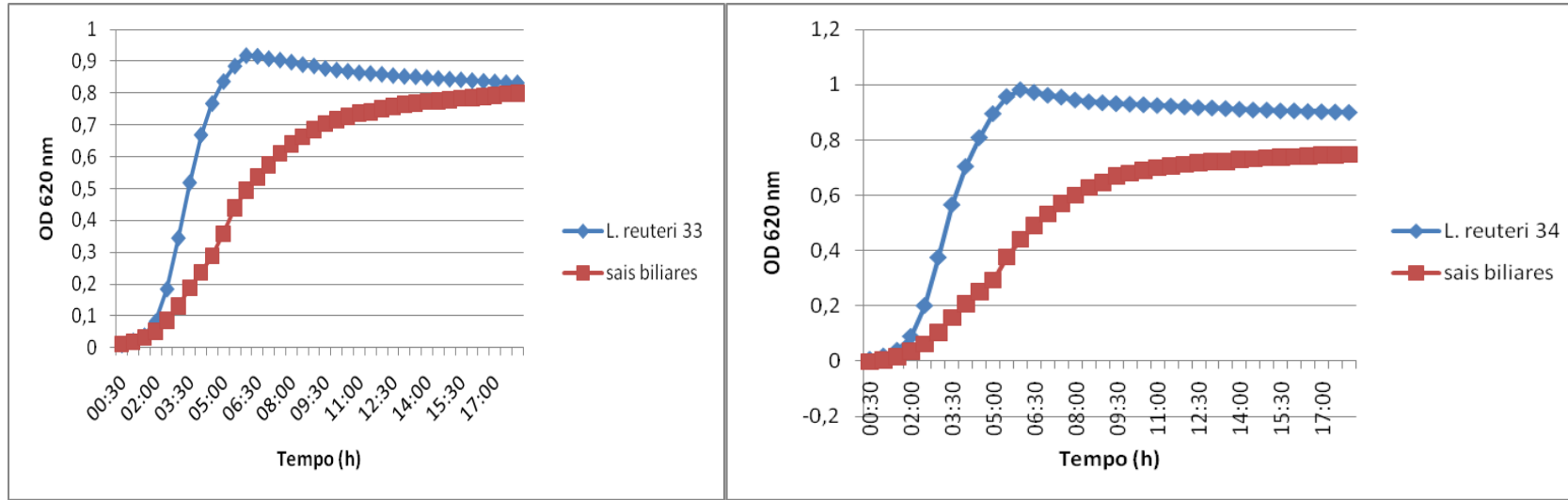


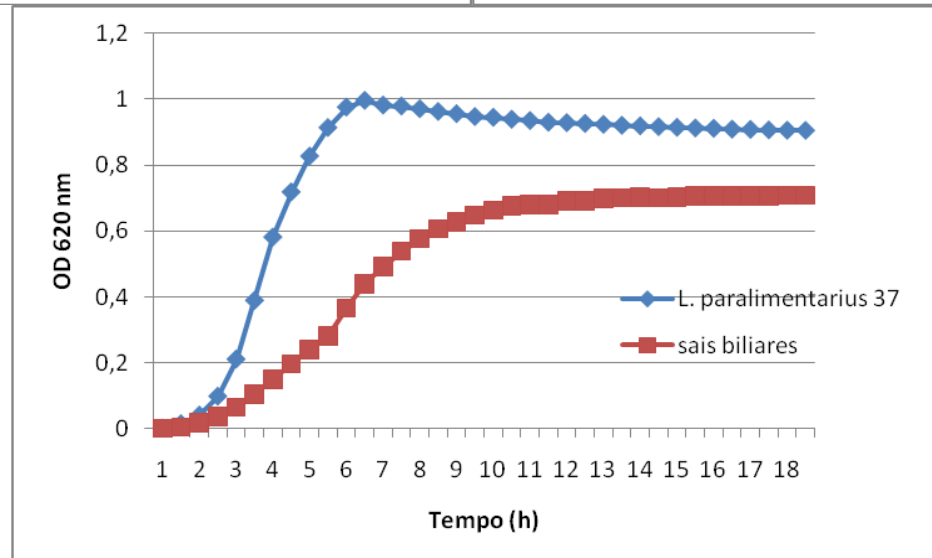
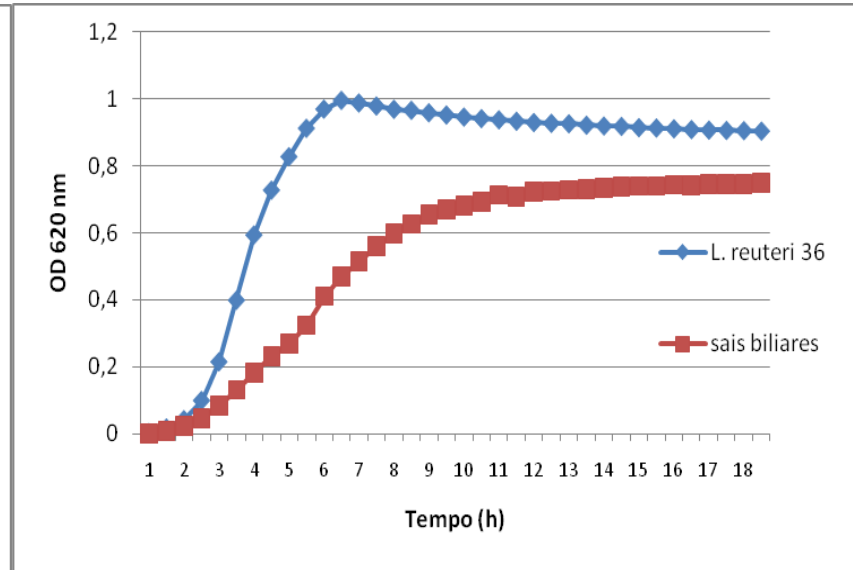
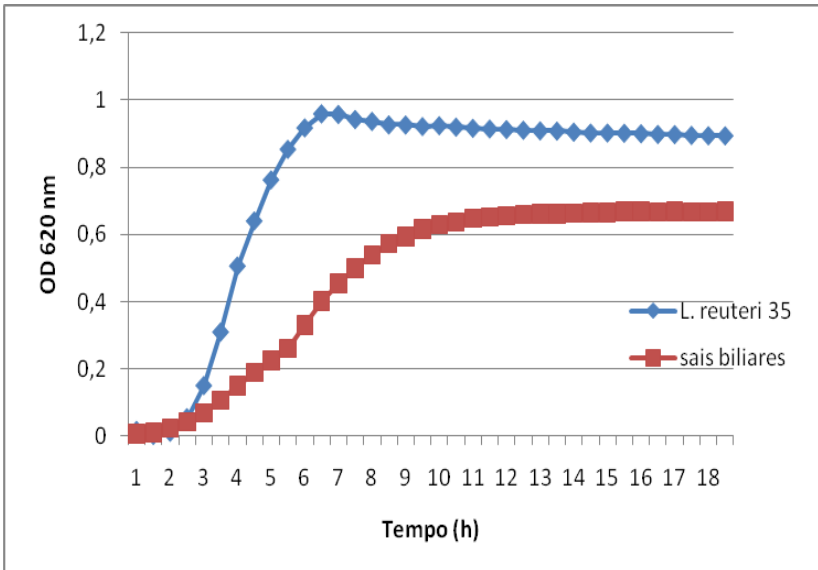












Patógenos				produtora	31	32	33	34	35	36	37
Gram (+)	Firmicutes	Bacilli	Bacilales	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	16,6	13,5	13	0
				<i>Listeria monocytogenes</i>	24,1	22,7	22,4	25,7	26,9	30,6	22,8
				<i>Staphylococcus aureus</i>	24,7	47,6	23,7	13	23,7	20,1	21,2
			Lactobacillales	<i>Enterococcus faecalis</i>	24,7	23,4	20,7	25,5	24	16,5	16,7
Gram (-)	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	<i>Escherichia coli</i>	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40
				<i>Salmonella enterica</i>	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40
			Pseudomonadales	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	23	20	20,8	21,5	17,7	18
	Spirochaetes	Spirochaetales	Leptospiraceae	<i>Leptospira interrogans</i>	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

Apêndice IV: Dados do sequenciamento das amostras não identificadas pelo PCR-ADRA.

As amostras foram as de números 2, 17, 18, 19, 20, 21, 22.

```
17>B05 well B05 Placa160_Seq_160211 Run01 Cimarron 3.12 881 (canino amostra 2)
GTAACGCGGCGGTGTGCTAAATACATGCAAGTNGTACGCACTGGCCCAACTGATTGATGGTCTTGCACCTGATTGACGATGG
ATCACCAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCGGAGCGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAA
TACCGCATAACAACAAAAGCCACATGGCTTTTGTGTTGAAAGATGGCTTTGGCTATCACTCTGGGATGGACCTGCGGTGCATT
AGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAACCTTGAGA
CACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTG
AAGAAGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAAGCTGCGTGAGAGTAAGTGTTCACGCAGTGACGGTATCCAAC
CAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGCGTAAAGC
GAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGC
AGAAGAGGACAGTGAAGTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATTATTGGAAAGAACCAGTGGCGAAGGGCGGGCTGTC
TGGGTCTGCAACTGACCTGAGCTCGAAAGCATTGGGGTACGCGAAACAGGGATTAGATATCCCTGGTATGTCCCATGGCCGTA
AACGATAGTGCTCAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTNTCGTGTCCGGAAG
```

```
dbj|AB425917.1| Lactobacillus reuteri gene for 16S ribosomal RNA, partial
sequence, strain: TB-B11 (= KK18)
Length=1498
Score = 1461 bits (791), Expect = 0.0
Identities = 847/870 (98%), Gaps = 22/870 (2%)
Strand=Plus/Plus
```

```
Query 3 AACG-CGGCGGTGTG-CTAAATACATGCAAGTNGTACGCACTGGCCCAACTGATTGATGG 60
|||||
Sbjct 5 AACGCCGCGGTGTGCCT-AATACATGCAAGTCGTACGCACTGGCCCAACTGATTGATGG 63

Query 61 TGCTTGCACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAG 120
|||||
Sbjct 64 TGCTTGCACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAG 123

Query 121 GTAACCTGCCCGGAGCGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAAC 180
|||||
Sbjct 124 GTAACCTGCCCGGAGCGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAAC 183

Query 181 AAAAGCCACATGGCTTTTGTGTTGAAAGATGGCTTTGGCTATCACTCTTGGGATGGACCTG 240
|||||
Sbjct 184 AAAAGCCACATGGCTTTTGTGTTGAAAGATGGCTTTGGCTATCACTCT-GGGATGGACCTG 242

Query 241 CGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTT 300
|||||
Sbjct 243 CGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTT 302

Query 301 GAGAGACTGATCGGCCACAATGGAACCTTGAGACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGC 360
|||||
Sbjct 303 GAGAGACTGATCGGCCACAATGGAACCT-GAGACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGC 361

Query 361 AGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAA 420
|||||
Sbjct 362 AGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAA 421

Query 421 GGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTGCGTGAGAGTAACTGTTTCAC 480
|||||
Sbjct 422 GGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTGCGTGAGAGTAACTGTTTCAC 481

Query 481 GCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA 540
|||||
Sbjct 482 GCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA 541

Query 541 CGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTA 600
|||||
Sbjct 542 CGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTA 601

Query 601 GGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCGACTTGA 660
|||||
```

```

Sbjct 602 GGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCGACTTGA 661
Query 661 GTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGAT-TATTGGAAA 719
|||||
Sbjct 662 GTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATAT-GGAA- 719
Query 720 GAACACCAGTGGCGAAGGGCGGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAG-CTCGAAAGC 778
|||||
Sbjct 720 GAACACCAGTGGCGAAGG-CGG-CTGTCTGG-TCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGC 776
Query 779 ATTGGGGTAGCGAAACAGGGATTAGATATCCCTGGTATGTCCCATGGCCGTAACGAT-A 837
|| |||
Sbjct 777 AT-GGG-TAGCGAA-CAGG-ATTAGATA-CCCTGGTA-GTCC-ATG-CCGTAAACGATGA 828
Query 838 GTGCTCAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTT 867
|||||
Sbjct 829 GTGCT-AGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTT 857

```

21>B09 well B09 Placa160_Seq_160211 Run01 Cimarron 3.12 292 (canino amostra 17)
nada

25>C01 well C01 Placa160_Seq_160211 Run01 Cimarron 3.12 846 (canino amostra 18)
GATACGCTGGCGCGTGCTAATACTGCAGTCGAACGAACTTCTTTATCACCAGTGCTTGCACTCACCATAAAGAGTTGAG
TGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCAAAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAATC
ATAGTTACCGCATGGTAACTATGTAAGGTGGCTATGCTACCGCTTTTGGATGGGCCCGCGCGCAATTAGCTAGTTGGTGA
GGTAAAGGCTTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAACGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCT
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCTGGGTGAAGAAGGTCTTCG
GATCGTAAACCCCTGTTGTTAGAGAAGAAAGTGCCTGAGAGTAACTGTTTCAGCTTTCGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGAACCGCAGGCGGT
CTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGTAGTGCATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGT
GGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAACGAACACCAGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTTACTGAC
GCTGAGGGTTTCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGACTTTGGATCCCTGGGTAGTCCAACGCCGTTAAACGATGAATGCTAAGT
GTTGGANGGGTTCCCG

gb|HQ293063.1| *Lactobacillus animalis* strain NWL40 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1360
Score = 1445 bits (782), Expect = 0.0
Identities = 828/847 (98%), Gaps = 15/847 (1%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 4 ACGCTGGCGGCGTG-CTAATAC-TGC-AGTCGAACGAACTTCTTTATCACCAGTGCTT 60
|||||
Sbjct 1 ACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTTCTTTATCACCAGTGCTT 60
Query 61 GCACCTCACCATAAAGAGTTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCA 120
|||||
Sbjct 61 GCACCTCACCATAAAGAGTTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCA 120
Query 121 AAAGAGGGGGATAAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAATCATAGTTACCGCATG 180
|||||
Sbjct 121 AAAGAGGGGGATAAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAAACCATAGTTACCGCATG 180
Query 181 GTAACCTATGTAAGGTGGCTATGCTACCGCTTTTGGATGGGCCCGCGCGCAATTAGCT 240
|||||
Sbjct 181 GTAACCTATGTAAGGTGGCTATGCTACCGCTTTTGGATGGGCCCGCGCGC-ATTAGCT 239
Query 241 AGTTGGTGAGGTAAAGGCTTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCG 300
|||||
Sbjct 240 AGTTGGTGAGGTAAAGGCTTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCG 299
Query 301 GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAATCTT 360
|||||
Sbjct 300 GCCACATTGGGACTGAGACACGG-CCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAATCTT 358
Query 361 CCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCTGGGTGAAGAAGGTCTTCGGATCG 420
|||||

```



```

Sbjct 376194 |||||AGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGG-TGCATTAGCTAGTT 376136
Query 240 GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA 299
Sbjct 376135 |||||GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA 376076
Query 300 CACTGGGACTGAGACACG-CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCGC 358
Sbjct 376075 |||||CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCG-GC 376017
Query 359 AATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAA 418
Sbjct 376016 |||||AATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAA 375957
Query 419 ACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACGTAACGTCCCCTGACGGTATCTAA 478
Sbjct 375956 |||||ACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACGTAACGTCCCCTGACGGTATCTAA 375897
Query 479 CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT 538
Sbjct 375896 |||||CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT 375837
Query 539 GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC 598
Sbjct 375836 |||||GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC 375777
Query 599 CCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGT 658
Sbjct 375776 |||||CCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGT 375717
Query 659 GGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT-TATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC 717
Sbjct 375716 |||||GGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC 375657
Query 718 GGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGGCCTCGAAAAGCGTGGGGGAGCAAACCAGGAT 777
Sbjct 375656 |||||GGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGG-C-TCGAAAAGCGTGGGG-AGCAAAC-AGGAT 375601
Query 778 TAGATACC 785
Sbjct 375600 |||||TAGATACC 375593

```

```

37>D01 well D01 Placa160_Seq_160211 Run01 Cimarron 3.12 762 (canino amostra 21)
GTCNTACGCACTGGCCCAACTGATTGATGGTGCTTGCACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAA
CACGTAGGTAACCTGCCCGGAGCGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACAAAAGCCACATGGCTT
TTGTTTGAAGATGGCTTTGGCTATCACTCTNNGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGG
CGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGAAACTGAGACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCCACAATGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACAGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTT
GTTGGAGAAGAAGCTGCGTGAGAGTAAGTTCACGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTACCGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTG
AAAGCCTTCGGCTTAAACGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCAGCTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGC
GGTGAATCGTAGATCTATGGAAAGAACCCAGTGGCGAAGCGGCTGTCGGTCTGCAAAC TGACGCTGAGCTCGAAAGCA
TTGGGGTAAGCCGAACAGGATTTCTGATTCCCCTGGGTAGTCCATTG

```

```

dbj|AB494732.1| Lactobacillus reuteri gene for 16S ribosomal RNA, partial
sequence, strain: DF2
Length=1457
Score = 1347 bits (729), Expect = 0.0
Identities = 773/793 (98%), Gaps = 14/793 (1%)
Strand=Plus/Plus

```

```

Query 1 GTCNTACGCACTGGCCCAACTGATTGATGGTGCTTGCACCTGATTGACGATGGATCACCA 60
Sbjct 16 |||GTCGTACGCACTGGCCCAACTGATTGATGGTGCTTGCACCTGATTGACGATGGATYACCA 75
Query 61 GTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCGGAGCGGGGGATAACATT 120

```



```

Sbjct 76      |||
GTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCCGGAGCGGGGGATAACATT 135

Query 121     TGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACAAAAGCCACATGGCTTTTGTGTTGAAAGATG 180
|||

Sbjct 136     TGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACAAAAGCCACATGGCTTTTGTGTTGAAAGATG 195

Query 181     GCTTTGGCTATCACTCTNGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGC 240
|||

Sbjct 196     GCTTTGGCTATCACTCTGGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGC 255

Query 241     TTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAAACTGAG 300
|||

Sbjct 256     TTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAA-CTGAG 314

Query 301     ACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCC 360
|||

Sbjct 315     ACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCC 374

Query 361     TGATGGAGCAACAGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGG 420
|||

Sbjct 375     TGATGGAGCAACA-CCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGG 433

Query 421     AGAAGAACGTGCGTGAGAGTAACTGTTACGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTCACG 480
|||

Sbjct 434     AGAAGAACGTGCGTGAGAGTAACTGTTACGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTCACG 493

Query 481     GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATT 540
|||

Sbjct 494     GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATT 553

Query 541     GGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCG 600
|||

Sbjct 554     GGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCG 613

Query 601     AAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTG 660
|||

Sbjct 614     AAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTG 673

Query 661     TAGCGGTGGAATGCGTAGATCTATGGAAAGAACCCAGTGCGGAAGCGGCTGTCTGGTC 720
|||

Sbjct 674     TAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAA-GAACACC-AGTGGCGAAGCGGCTGTCTGGTC 731

Query 721     TGCAAACCTGACGCTGAG-CTCGAAAGCATTGGGGTAAGCCGAACAGGATTTCTGATTCCC 779
|||

Sbjct 732     TGCAA-CTGACGCTGAGGCTCGAAAGCAT-GGG-TA-GC-GAACAGGATTA--GATACC 784

Query 780     CTGGGTAGTCCAT 792
|||

Sbjct 785     -TGG-TAGTCCAT 795

```

```

40>D04 well D04 Placa160_Seq_160211_Run01_Cimarron_3.12_851_(canino_amostra_22)
GTCATCTGTCCGCCTTAGGCGGCTCCTCCATAAAGGTTAGGCCACCGACTTTGGGCGTTACAACTCCCATGGTGTGACGGGC
GGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGTAGGCGAGTT
GCAGCCTACAGTCCGAAC TGAGAACGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGTTTGGCGACTCGTTGTACCGTCCATTGT
AGCAGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATCTGACGTCGTCGCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTC
ACTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAGTAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGA
GCTGACGACGACCATGCACCACCTGTCATTGCGTCCCCGAAGGGAACGCCTTATCTCTAAGGTTAGCGCAAGATGTCAAGACC
TGGAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCCTTGAGTTTCAA
CCTTGCGGTCGTACTCCCAGGCGGAGTGTAAATGCGTTAGCTCCGGCAC TGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACCTAGCACT
CATCGTTTTACGGCATGGACTACCAGGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTACCCATGCTTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTGCGACCA
GACAGCCGCTTTTCGCGCACTGGTGTCTTCCGTTATCTACGCTTTCCACCGGPNCCATGGAGGTTCCCTGTCTCTTTCTT
GGCACTCAAGTTGCCCCGGGTTTC

```



```

Query 1395 GACAACCATGCACCACCTGTCACCTTTGCCCCGAAGGGGAAGCTCTATCTCTAGAGTGGT
1454
Sbjct 1055 GACAACCATGCACCACCTGTCACCTTTGCCCCGAAGGGGAAGCTCTATCTCTAGAGTGGT
996

Query 1455 CAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCC
1514
Sbjct 995 CAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCC
936

Query 1515 ACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTGCTACTCCCCA
1574
Sbjct 935 ACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTGCTACTCCCCA
876

Query 1575 GGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAAG
1634
Sbjct 875 GGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTA-G
817

Query 1635 CACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTT
1694
Sbjct 816 CACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGG-TATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTT
758

Query 1695 TCGAGCCTCAGCGTCAAGTTANAGACCAGAGGAGCCCGCTTTCGCCACTGGTGTTCCTC
1754
Sbjct 757 TCGAGCCTCAGCGTCA-GTTA-CAGACCAGAG-AGCC-GCCTTCGCCACTGGTGTTCCTC
702

Query 1755 CCATTATATTCTACCGGCATTTACCCCGTTAC-C-TGGAATTTCCANCTCTCCTCTTCTT
1812
Sbjct 701 C-AT-ATAT-CTAC-G-CATTTACCC-GCTACACATGGAATT-CCA-CTCTCCTCTTCT-
651

Query 1813 GC-CTCAAGGTCTCCCCACGTTTCCACNTGAACCTCCCGGTTGAGC-GGGGGCCTTTTC
1870
Sbjct 650 GCACTCAAG-TCTCCC-A-GTTTCCAA-TGACCCTCCCGGTTGAGCCGGGGGC-TTT-C
597

Query 1871 AC 1872
Sbjct 596 AC 595

```

Score = 1430 bits (774), Expect = 0.0
Identities = 879/924 (95%), Gaps = 35/924 (4%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 29  ACGCTGGCGGCGTG-CTAATAGCACTGCAGGGT-TAACGCGTTCGTTTTGTCCACCGGAG
86
      |||
Sbjct 6    ACGCTGGCGGCGTGCCTAATA-CA-TGCA-AGTCGAACGC-TTC-TTTT-TCCACCGGAG
59

Query 87  CTTGCTCCACCGGAGAAAAGAGGAGTGGCGGAACGGGTGAGTTAACACGTGGGTAACCTG
146
      |||
Sbjct 60  CTTGCTCCACCGGA-AAAAGAGGAGTGGC-GAACGGGTGAG-TAACACGTGGGTAACCTG
116

Query 147 CCCATCAGAAGGGGATAAACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCG
206
      |||
Sbjct 117 CCCATCAGAAGGGGATAAACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCG
176

Query 207  CATGGTTTNGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATT
266
      |||
Sbjct 177  CATGGTTTNGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATT
236

Query 267  AGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTG
326
      |||
Sbjct 237  AGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTG
296

Query 327  ATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
386
      |||
Sbjct 297  ATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
356

Query 387  CTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGA
446
      |||
Sbjct 357  CTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGA
416

Query 447  TCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGG
506
      |||
Sbjct 417  TCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGG
476

Query 507  TATCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
566
      |||
Sbjct 477  TATCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
536

Query 567  AAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT
626
      |||
Sbjct 537  AAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT
596

```

```

Query 627 GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGA
686
      |||
Sbjct 597 GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGA
656

Query 687 GGAGAGTGAATTCATGTGTAAGCGGTGACATGCGTAGATATATTTGGAGGAACACCAGT
746
      |||
Sbjct 657 GGAGAGTGAATTCATGTGTA-GCGGTGAAATGCGTAGATATAT-GGAGGAACACCAGT
714

Query 747 GGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAACTGACGCTGAAGCCTCGAAAAGCGTGGGGAGCA
806
      |||
Sbjct 715 GGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAA-CTGACGCTGAGGC-TCGAAA-GCGTGGGGAGCA
771

Query 807 AACAGGGATTAGATACCCTTGGGTAGTCCACGCCCGTAAAACGATGAGTGCCTTAAGTGT
866
      |||
Sbjct 772 AACAGG-ATTAGATACCCT-GG-TAGTCCACGCC-GTAAA-CGATGAGTGC-T-AAGTGT
824

Query 867 TGGACGGGTT-CCGCC-TTCNGTGCTTGGCNGTTAACGCATTAAGGCCACTCCCGGCCTG
924
      |||
Sbjct 825 TGGA-GGGTTTCCGCCCTTCAGTGCT-G-CAGCTAACGCATTAAG-C-ACTCC-G-CCTG
877

Query 925 GGGGAGTCCGACCGCAGGGGTTG 948
      |||
Sbjct 878 GGG-AGTAC-GACCGCAAGG-TTG 898

```

19

>[gb|GU385351.1](#) Enterococcus faecium strain Probio-48 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1430

Score = 1317 bits (713), Expect = 0.0
Identities = 815/859 (95%), Gaps = 32/859 (4%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 33 CTGGCGGCGTG-CTAATACCTGCAGGTTGAACGCTTCTTTNCTTCCACCGAGAGCTTGCT
91
      |||
Sbjct 9 CTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCTTCTTT--TTCCACCG-GAGCTTGCT
65

Query 92 CCCACCAGGANNAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATC
151
      |||
Sbjct 66 -CCACC-GGA-AAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATC
122

Query 152 AGAAGGGGATAAACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAAGTCGAAACCGCATGG
211
      |||
Sbjct 123 AGAAGGGGATAAACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAA-TCGAAACCGCATGG

```

181

Query 212 TTTCAGAGTATTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAG
271

Sbjct 182 TTT-TGA-T-TTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAG
238

Query 272 CTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
331

Sbjct 239 CTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
298

Query 332 CGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT
391

Sbjct 299 CGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT
358

Query 392 TCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTAGAAGAAGGTTTTCGGAT
451

Sbjct 359 TCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGT-GAAGAAGGTTTTCGGAT
417

Query 452 CGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAACGAACAAGGATGAGAGTAACGTTCNTCCCTTGACGG
511

Sbjct 418 CGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAA-GAACAAGGATGAGAGTAACGTTCATCCCTTGACGG
476

Query 512 TATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
571

Sbjct 477 TATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
536

Query 572 AAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT
631

Sbjct 537 AAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT
596

Query 632 GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGTCGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAG
691

Sbjct 597 GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGG-GAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAG
655

Query 692 GAGGAGCAGGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT-TATGGAGGAACACCA
750

Sbjct 656 -AGGAG-AG-TGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCA
712

Query 751 GTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGGTCTGTTAACTGACGCTAGAGGCTCGAAAGCGTTGGGGA
810

Sbjct 713 GTGGCGAAGGCGGCTCTCTGG-TCTGT-AACTGACGCT-GAGGCTCGAAAGCGT-GGGGA


```

Query 1373 CCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAA
1432
      |||
Sbjct 1169 CCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAA
1110

Query 1433 TAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAAC
1492
      |||
Sbjct 1109 TAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAAC
1050

Query 1493 CATGCACCACCTGTCACCTTTGCCCCGAAGGGGAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGG
1552
      |||
Sbjct 1049 CATGCACCACCTGTCACCTTTGCCCCGAAGGGGAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGG
990

Query 1553 ATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTTCGAATTAAAACCACATGCTCCCACCG
1612
      |||
Sbjct 989 ATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTTCGAATTAAA-CCACATGCTCC-ACCG
932

Query 1613 CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTTCGTACTCCCCAGGCG
1672
      |||
Sbjct 931 CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTTCGTACTCCCCAGGCG
872

Query 1673 GAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTC
1732
      |||
Sbjct 871 GAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTC
812

Query 1733 ATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGC
1792
      |||
Sbjct 811 ATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGC
752

Query 1793 CTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGC-TTCGCCACTGGTGTTC-TCCATATATCTA
1850
      |||
Sbjct 751 CTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGC-TTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTA
692

Query 1851 CGC-TTTCACCGGTTACACATGGAATTCCACTCTCCCTCTTCTTGCACTCCAAGTCTCCC
1909
      |||
Sbjct 691 CGCATTTACCGCT-ACACATGGAATTCCACTCTCC-TCTTCT-GCACTC-AAGTCTCCC
636

Query 1910 CAGTTTCCAATGACC-TCCCCGGTTGAGCCGG 1941
      |||
Sbjct 635 -AGTTTCCAATGACCCTCCCCGG-TTGAGCCGG 605

```

Score = 1351 bits (731), Expect = 0.0
Identities = 799/829 (96%), Gaps = 23/829 (3%)

Strand=Plus/Plus

```

Query 28 AACNCTGGCGGCGTG-CTAATAGCACTGCAGGTTGAACGCTTCTTTTGTCCACCGGAGCT
86
      ||| ||||||||||| ||||| | ||||| | ||||||||||| |||||||||||
Sbjct 5 AACGCTGGCGGCGTGCCTAATA-CA-TGCAAGTCGAACGCTTCTTTT-TCCACCGGAGCT
61

Query 87 TGCTCCACCGGAGNAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCA
146
      ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| |||||||||||
Sbjct 62 TGCTCCACCGGA-AAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCA
120

Query 147 TCAGAAGGGGATAAACACTTGAAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATG
206
      ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| |||||||||||
Sbjct 121 TCAGAAGGGGATAAACACTTGAAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATG
180

Query 207 GTTTNGATTTGAACAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGC
266
      |||| ||||||| ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| |||||||||||
Sbjct 181 GTTTNGATTTGAA-AGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGC
239

Query 267 TAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATC
326
      ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| |||||||||||
Sbjct 240 TAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATC
299

Query 327 GGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
386
      ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| |||||||||||
Sbjct 300 GGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
359

Query 387 CGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCG
446
      ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| |||||||||||
Sbjct 360 CGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCG
419

Query 447 TAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTAT
506
      ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| |||||||||||
Sbjct 420 TAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTAT
479

Query 507 CTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
566
      ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| |||||||||||
Sbjct 480 CTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG-CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
538

Query 567 GCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTCAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTG
626
      ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| |||||||||||

```

```

Sbjct  539  GCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGT-AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTG
597

Query  627  AAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGA
686
      |||
Sbjct  598  AAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAA-ACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGA
656

Query  687  GGAGAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGGAAATGCGTACGATATATGGAGGAACACCAGT
746
      |||
Sbjct  657  GGAGAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTG-AAATGCGTA-GATATATGGAGGAACACCAGT
714

Query  747  GGCGAAGGCCGGGCTCTCTGGTCTGTAACTTGACGCTTGAGGCTCGAAAAGCGTGGGGA
806
      |||
Sbjct  715  GGCGAAGGC-GG-CTCTCTGGTCTGT-AACT-GACGCT-GAGGCTCGAAA-GCGTGGGGA
768

Query  807  GCAAAAACCAGGATTAGATAACCTTGGGTANTCCACGCCGTTAAAACGAT  855
      |||
Sbjct  769  GCAAAA-C-AGGATTAGATACCCT-GG-TAGTCCACGCCGT-AAA-CGAT  811

```