

JOICE DE FÁTIMA LAUREANO MARTINS

**ANTAGONISMO DE *Bifidobacterium* spp. E DE *Lactobacillus gasseri*
SOBRE *Cronobacter sakazakii***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

JOICE DE FÁTIMA LAUREANO MARTINS

**ANTAGONISMO DE *Bifidobacterium* spp. E DE *Lactobacillus gasseri*
SOBRE *Cronobacter sakazakii***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 10 de fevereiro de 2010.

Prof. Mauro Mansur Furtado
(Co-orientador)

Prof^a Regina Célia Santos Mendonça
(Co-orientadora)

Pesq. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

Pesq. Marcelo Bonnet Alvarenga

Prof^a Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira
(Orientadora)

Dedico

Este trabalho lapidado pelas dificuldades e impulsionado pelo desejo de

acertar

a DEUS,

por ter-me iluminado, guiado meus

passos e me levantado nos

momentos mais difíceis.

À minha mãe MARIA, exemplo de luta e perseverança.

Ao meu pai de coração Sebastião, fonte de ensinamentos e carinho.

Ao meu querido esposo Fabiano por ser tão especial e por estar sempre presente nos momentos mais difíceis.

Ao meu pai Raimundo e aos meus irmãos Randerson e Rainan, pelo amor dedicado.

O SONHO

Sonhe com aquilo que você quiser.

Seja o que você quer ser,

**Porque você possui somente uma vida e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que quer.**

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.

Dificuldades para fazê-la forte.

Tristeza para fazê-la humana.

E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.

**Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus
caminhos.**

A felicidade aparece para aqueles que choram.

Para aqueles que se machucam.

Para aqueles que buscam e tentam sempre.

**E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que
passam por suas vidas.**

Clarisse Lispector

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo na minha vida.

À minha querida Mãe, por lutar tanto para que meus sonhos se tornassem realidade, pelos conselhos, pela educação, pelas orações e pelos ensinamentos. Devo a ela esta conquista.

Ao meu esposo Fabiano, por não medir esforços para me ajudar, por estar sempre ao meu lado nas minhas decisões, pelo companheirismo e pela compreensão nos momentos mais difíceis.

Ao meu pai Sebastião, pelos conselhos, pelas orações e pelos ensinamentos.

À minha amiga e orientadora Professora Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira, pela oportunidade, paciência, pelos ensinamentos, pelas orientações e, sobretudo, pela amizade ao longo deste trabalho.

Ao Marcelo Bonnet Alvarenga, pesquisador da EMBRAPA Gado de Leite de Juiz de Fora, MG, pela paciência, pelos ensinamentos e pela atenção; sem ele, esta tese não teria sido possível!

Aos meus tios Antônio, Lúcia Helena, Luiz Augusto, Maria da Penha e Viviane pelas orações, conselhos e pelo amor incondicional.

Aos meus avós Oliveira e Sebastiana (*in memoriam*) por todos os ensinamentos e pelo amor incondicional.

À Maria Amélia Ramos, pelo acolhimento em Guidoal, por ter ajudado a minha mãe e a mim a não desistir, pelos ensinamentos e pelo carinho.

Ao Vicente Simões Jorge (*in memoriam*), pelas inúmeras caronas de Viçosa à Guidoal, pelos ensinamentos e conselhos.

Aos professores Evandro Marques de Oliveira, Maria do Carmo de Oliveira e Maria de Lourdes Bressan Pinto pelo grande incentivo nos estudos, pela amizade e pelos ensinamentos.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), pela oportunidade concedida para a realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa e pelo financiamento da pesquisa.

Aos Professores Regina Célia Santos Mendonça e Mauro Mansur Furtado, e à pesquisadora Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto pela contribuição no projeto de pesquisa e durante a pesquisa.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, em especial ao Célio, pelo apoio.

Aos amigos do Laboratório de Culturas Láticas, Hudsara, Éder, Karina, Carol e Luciana, pela amizade e por, desde o início, terem-se mostrado solícitos para qualquer ajuda.

À Viviane, por ter sido o meu braço direito durante a pesquisa e ajudado tanto nos momentos em que me sentia cansada.

À Lara Gabrielle, pela grande colaboração no início do trabalho.

À Heloísa Helena, nutricionista do Hospital São Sebastião, pela simpatia, pelas informações relevantes, pela disponibilização de material didático e, acima de tudo, pela amizade.

Às pesquisadoras Maria Crisolita da Silva Cabral, da Fundação Ezequiel Dias (FUNED); e Edna Froeder Arcuri, da EMBRAPA Gado de Leite de Juiz de Fora, MG, pela concessão de estipes de *Cronobacter sakazakii* utilizadas neste estudo.

Enfim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

JOICE DE FÁTIMA LAUREANO MARTINS, filha de Raimundo Martins de Paula e Maria Aparecida Laureano da Cruz, nasceu em Carangola, Estado de Minas Gerais, em 16 de maio de 1982.

Em janeiro de 2008, graduou-se em Nutrição pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

Em março de 2008, ingressou-se no Programa de Pós-Graduação, nível de Mestrado, em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFV, com realização da pesquisa na área de probióticos e culturas lácticas, submetendo à defesa da dissertação em 10 de fevereiro de 2010.

CONTEÚDO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA E HIPÓTESES EXPERIMENTAIS	3
2.1. Revisão de Literatura	3
2.1.1. Bacteriocinas	10
2.1.2. Ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio	14
2.1.3. A homeostase intestinal saudável.....	15
2.2. Hipóteses Experimentais	22
REFERÊNCIAS	24
CAPÍTULO 1	33
PERFIL DE SENSIBILIDADE DE <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Lactobacillus gasseri</i> e <i>Cronobacter sakazakii</i> AOS PRINCIPAIS ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA (UTI) NEONATAL.....	33
1. INTRODUÇÃO.....	33
2. TESTE DA PRIMEIRA HIPÓTESE EXPERIMENTAL (I).....	36
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37

	Página
3.1. Origem e manutenção dos micro-organismos	37
3.2. Ativação dos isolados de <i>Lactobacillus gasseri</i>	38
3.3. Ativação das estirpes de <i>Bifidobacterium</i> spp.....	38
3.4. Ativação das estirpes de <i>Cronobacter sakazakii</i>	38
3.5. Teste de sensibilidade aos antibióticos.....	39
4. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	40
4.1. Perfil de sensibilidade a antibióticos	40
5. CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS	50
CAPÍTULO 2.....	54
CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DE <i>Lactobacillus gasseri</i> E <i>Bifidobacterium</i> spp. SOBRE <i>Cronobacter</i> <i>sakazakii</i>	54
1. INTRODUÇÃO.....	54
2. TESTE DA SEGUNDA (II), TERCEIRA (III) E QUARTA (IV) HIPÓTESES EXPERIMENTAIS	56
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
3.1. Origem e manutenção dos micro-organismos	58
3.2. Ativação dos isolados de <i>Lactobacillus gasseri</i>	59
3.3. Ativação das estirpes de <i>Bifidobacterium</i> spp.....	59
3.4. Ativação das estirpes de <i>Cronobacter sakazakii</i>	59
3.5. Teste de atividade antagonista em meio sólido	60
3.6. Teste de atividade antagonista em meio líquido: uso de sobrenadantes livres de células.....	60
3.7. Produção de antagonistas em meio líquido: uso de culturas líquidas integrais.....	62
3.8. Exame da Natureza da Matriz de Inibição	62
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1. Teste de atividade antagonista em meio sólido	64
4.2. Teste de atividade antagonista em meio líquido: uso de células líquidas integrais e uso de sobrenadante livre de células	66

4.3. Exame da Natureza da Matriz de Inibição	67
5. CONCLUSÃO.....	73
6. CONCLUSÕES GERAIS	74
REFERÊNCIAS	76

LISTA DE ABREVIATURAS

AMI – Amicacina
AMP – Ampicilina
AMO – Amoxicilina
ATCC – *American Type Culture Collection*
BHI – Brain Heart Infusion
BLH – Bancos de Leite Humano
CDC – *Center for Disease Control*
CFE – Cefalexina
CFL – Cefalotina
CIP – Ciprofloxacina
CRO – Ceftriaxona
ERI – Eritromicina
FIPs – Fórmulas Infantis em Pó
FUNED – Fundação Ezequiel Dias
GEN – Gentamicina
IAL – Instituto Adolfo Lutz
MER – Meropenem
MRS – De Mann, Rogosa e Sharpe
MHA – Ágar Mueller-Hinton
MID – Dose mínima de infectividade

NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

NEC – Enterocolite necrosante

FDA – *Food and Drug Administration*

LCR – Líquido Cefalo-Raquidiano ou Liquor

OXA – Oxacilina

PABA – ácido p-aminobenzoico

PEN – Penicilina G

SNC – Sistema Nervoso Central

SUL – Sulfonamidas

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

RESUMO

MARTINS, Joice de Fátima Laureano, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Antagonismo de *Bifidobacterium* spp. e de *Lactobacillus gasseri* sobre *Cronobacter sakazakii*.** Orientadora: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira. Co-orientadores: Mauro Mansur Furtado e Regina Célia Santos Mendonça.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o antagonismo de estirpes de *Lactobacillus gasseri* e *Bifidobacterium* spp. sobre estirpes do patógeno *Cronobacter sakazakii*, elucidar a natureza do inibidor e verificar a sensibilidade dessas estirpes aos 14 antibióticos comumente utilizados em Unidade de Terapia (UTI) neonatal. A experimentação foi dividida em três etapas. Na primeira, foi avaliada a sensibilidade de *L. gasseri*, *Bifidobacterium* spp. e *C. sakazakii* aos antibióticos mais comumente empregados em UTI neonatal. Na segunda etapa, foi examinada a produção de antagonistas em meio sólido e a produção de antagonistas em meio líquido, que foi conduzida com o emprego de células líquidas integrais e uso de sobrenadante livre de células. Na terceira etapa, foi determinada a natureza do inibidor segundo ensaios de difusão, utilizando-se catalase e tripsina e proteinase K. Na primeira etapa dos experimentos, a sensibilidade das estirpes de *L. gasseri* aos diversos antibióticos testados variou entre 14,3 % de estirpes sensíveis a gentamicina e eritromicina, e 100 %, no caso de penicilina, ampicilina, amoxicilina, meropenem e vancomicina. A maioria

das estirpes de *Bifidobacterium* spp. apresentou-se sensível aos antibióticos, à exceção da amicacina e eritromicina, às quais todas foram resistentes. Em relação à sensibilidade de *C. sakazakii* aos quimioterápicos, somente 43 % das estirpes se apresentaram sensíveis a esses medicamentos. No segundo agrupamento experimental, estirpes de *L. gasseri* desenvolvendo-se em meio sólido antagonizaram consistentemente o patógeno *C. sakazakii*, ao passo que *Bifidobacterium* apresentaram pouco ou nenhum antagonismo sobre o patógeno. Entretanto, culturas planctônicas de *L. gasseri* e de *Bifidobacterium* não produziram inibição do patógeno em ensaios de difusão em placa, tanto na presença quanto na ausência de suas células. Os resultados dos ensaios enzimáticos evidenciaram que a matriz de inibição de *L. gasseri* inclui metabólitos ativos de, pelo menos, duas naturezas: uma delas proteica, possivelmente uma bacteriocina; e a outra representada pelo peróxido de hidrogênio. Indicaram também potencial de aplicação de estirpes *L. gasseri* como adjunto no tratamento de infecções, notadamente pela capacidade de antagonizar *C. sakazakii*, um patógeno Gram-negativo de elevada severidade e de crescente interesse mundial.

ABSTRACT

MARTINS, Joice de Fátima Laureano, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2010. **Antagonism of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus gasseri* on the *Cronobacter sakazakii*.** Adviser: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Co-Advisers: Mauro Mansur Furtado and Regina Célia Santos Mendonça.

The objectives of this study were to evaluate the antagonism of *Lactobacillus gasseri* and *Bifidobacterium* spp. strains on *Cronobacter sakazakii* strains, to elucidate the inhibitor nature, and to verify their sensitivity to 14 antibiotics commonly used in Neonatal Intensive Care Units (NICU). The experimentation was divided into three stages. At first, the sensitivity of *L. gasseri*, *Bifidobacterium* spp. and *C. sakazakii* to antibiotics most commonly used in NICU was evaluated. In the second step, the antagonists' production in solid and in liquid media was evaluated, using either integral, cultures and cell-free supernatants. In the third stage, the inhibitor nature was determined by diffusion assays, using catalase, trypsin, and proteinase K. In the first stage of the experiments, the sensitivity of *L. gasseri* strains to the tested antibiotics ranged from 14.3 % for gentamicin and erythromycin to 100 % for penicillin, ampicillin, amoxicillin, meropenem,

and vancomycin. Most *Bifidobacterium* spp. strains showed sensitivity to antibiotics, except amikacin and erythromycin, to which all of them were resistant. Regarding the sensitivity of *C. sakazakii* to chemotherapeutic agents, only 43 % of the strains were sensitive to these drugs. In the second experimental group, *L. gasseri* strains that had been cultured in solid medium antagonized *C. sakazakii* consistently, whereas *Bifidobacterium* showed little or no antagonism against the pathogen. However, planktonic cultures of either *L. gasseri* or *Bifidobacterium* produced no pathogen inhibition in well diffusion assay, regardless of the presence or the absence of their cells. The results of enzymatic assays showed that inhibition matrix of *L. gasseri* includes at least, active metabolites of two kinds: one of proteinaceous nature, possibly a bacteriocin, and the other one represented by hydrogen peroxide. These results indicate a potential application of *L. gasseri* strains to be used as an adjunct in the treatment of infections due to their ability to antagonize *C. sakazakii*, a Gram-negative pathogen of high severity and increasing global interest.

1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por micro-organismos veiculados por alimentos contaminados podem causar desde sintomas brandos e passageiros até casos que levam o paciente a óbito. Particularmente sensíveis são os indivíduos cujo estado de saúde encontra-se de alguma forma fragilizado, a exemplo daqueles acometidos de enfermidades imunocomprometedoras, idosos, gestantes, crianças e neonatos hospitalizados. Para esse último grupo, uma fonte de perigo de interesse mundial são as Fórmulas Infantis em Pó (FIPs).

O trato digestório de crianças recém-nascidas, devido à imaturidade, pode constituir importante via para invasão de patógenos e estabelecimento de infecção. Evidências bem estabelecidas indicam que leite em pó contaminado por bactérias pode causar infecções e intoxicações graves, em especial em crianças em período neonatal. Entre os patógenos mais relevantes veiculados por FIPs, considerável interesse e investigação têm sido dirigidos a *Cronobacter sakazakii*, um patógeno oportunista que pode causar enterocolite necrosante (NEC), bacteremia, meningite, abscessos e lesões permanentes no cérebro, por afetar o sistema nervoso central, o que pode levar o paciente à morte.

De forma geral, o tratamento com antibióticos de amplo espectro causa alterações negativas na homeostase da microbiota saudável presente no trato digestório de indivíduos sãos. Em neonatos e crianças, a

imaturidade do trato digestório e a fragilidade homeostática de sua microbiota aumentam ainda mais os efeitos negativos causados pela antibioticoterapia de amplo espectro, podendo levar ao estabelecimento de infecções secundárias e ao aumento de resistência ao antibiótico. De fato, questões que envolvem a redução ou eliminação da eficácia de agentes e regimes de antibioticoterapia têm representado um problema mundial crescente e criticamente preocupante para a saúde pública.

Coletivamente, os fatos apresentados indicam a necessidade de pesquisas de complementos terapêuticos ou alternativas terapêuticas que levem ao aumento da resistência orgânica e da resposta imune do paciente. Assim, os probióticos surgem como importantes candidatos para mitigação da problemática em tela. Probióticos consistem de preparações de microorganismos desejáveis isolados do trato digestório de crianças amamentadas exclusivamente ao seio materno, o que os torna capazes de estimular a maturação do sistema imune. Além disso, contribuem com o equilíbrio desejado da microbiota do trato digestório e a atividade dos microorganismos intestinais com propriedades úteis ao hospedeiro, a exemplo da síntese de substâncias microbianas com atividade antagonista sobre bactérias patogênicas. Entre essas substâncias, citam-se em especial o peróxido de hidrogênio, as bacteriocinas e ácidos orgânicos (acético e lático).

Ao mesmo tempo que a alimentação adequada é de importância crucial para bebês prematuros e ou de baixo peso, muitas dessas crianças são impossibilitadas de receber o aleitamento materno por diversos motivos. Assim, são privadas do colostro e do leite de suas mães, alimentos essenciais para a aquisição de resistência imunológica, desta forma ficam, assim, mais suscetíveis à infecções, além de ingerirem alimentos complementares possivelmente contaminados, sobretudo as FIPs.

A partir da década de 1990, vários estudos têm sido realizados em decorrência de casos severos de infecção envolvendo recém-nascidos hospitalizados e alimentados com FIPs, um potencial veículo de *C. sakazakii*.

2. REVISÃO DE LITERATURA E HIPÓTESES EXPERIMENTAIS

2.1. Revisão de Literatura

Cronobacter sakazakii (*C. sakazakii*) é um patógeno emergente oportunista que raramente causa infecção em indivíduos não hospitalizados. Nos últimos anos, esse patógeno tem chamado atenção das autoridades públicas mundiais pelo crescente número de surtos e casos de infecção que causa em recém-nascidos. Essas infecções, que ocorrem no primeiro ano de vida, constituem uma das maiores causas de mortalidade infantil, sendo sua frequência e severidade peculiarmente altas nessa faixa etária em função da imaturidade do sistema imune (DRUDY et al., 2006; NOVAK et al., 2001).

Cronobacter sakazakii foi denominado inicialmente *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*), pois até 1980 acreditava-se que essa estirpe era uma variante de pigmentação amarela de *E. cloacae*. O taxonomista japonês Riichi Sakazakii, por meio de teste de hibridização do DNA, descobriu que se tratava, de uma espécie distinta, tendo sido o micro-organismo renomeado *Enterobacter sakazakii*. Entretanto, técnicas mais recentes que utilizam hibridização de Southern, sequenciamento de RNA 16S, ribotipagem automatizada e amplificação do DNA, apresentaram diferenças taxonômicas adicionais, e sugeriu-se a criação do novo gênero *Cronobacter*, mantendo-se o epíteto específico *sakazakii* (IVERSEN et al., 2008).

Cronobacter sakazakii é bacilo Gram-negativo, não esporogênico, apresentando flagelos peritríquios (DRUDY et al., 2006). O micro-organismo é capaz de causar infecções em indivíduos de todas as faixas etárias, porém lactentes (crianças com idade inferior a 12 meses de idade) são mais atingidos, com prevalência de neonato (até 28 dias de idade), e crianças imunocomprometidas, em especial as de baixo peso ao nascer e as prematuras (BARREIRA et al., 2003; DRUDY et al., 2006; FAO/WHO, 2006; SKOVGAARD, 2007).

Fórmulas Infantis em Pó (FIPs) têm sido frequentemente implicadas como veículo de infecção em episódios infecciosos neonatais (LAI, 2001; VAN ACKER et al., 2001). Em pesquisas de outros patógenos nas FIPs não revelaram associações entre sua presença e doença, o que remete à maior atenção em relação ao patógeno *C. sakazakii* (BARREIRA et al., 2003; DRUDY et al., 2006; SKOVGAARD, 2007).

O tempo durante o qual as FIPs, reidratadas após, ficam expostas à temperatura ambiente favorece a multiplicação de *C. sakazakii*, podendo, então, aumentar o risco à saúde dos bebês (GURTLER; KORNACKI; BEUCHAT, 2005). Embora *C. sakazakii* não cresça nas FIPs, pode sobreviver nesses produtos por longo período de tempo, constituindo perigo potencial após sua reidratação. Considerando-se que esse patógeno possui ampla faixa de temperatura de crescimento de 6 a 45 °C, é necessário um controle rigoroso na temperatura de refrigeração do produto reidratado para minimizar os riscos associados ao consumo de FIPs.

Apesar do patógeno estar epidemiologicamente relacionado a infecções, não se conhecem as dose mínima de infectividade (MID), ou número mínimo de células para causar infecção (FAO/WHO, 2006). Entretanto, em função do curto tempo de geração, em torno de 19 a 21 min, a 37 °C, possivelmente gera-se, em curto intervalo de tempo, número considerável de células capazes de causar infecção (IVERSEN; LANE; FORSYTHE, 2004).

As FIPs não são alimentos estéreis e, dessa forma, podem apresentar baixas concentrações de patógenos oportunistas, incluindo *C. sakazakii*. Estudo realizado com fórmulas infantis indicou a presença de < 0,03 número mais provável em cada 100 g do produto (PALCICH et al., 2009). É

importante notar que FIPs, ainda que dentro dos padrões microbiológicos anteriormente indicados pelo *Codex Alimentarius*, poderiam veicular esse micro-organismo, o que levou à alteração desses padrões para ausência de *C. sakazakii* em 10 g do produto (UNITED STATES, 2005).

Mesmo considerando-se, que as FIPs não são produtos estéreis e conhecendo-se a existência de correlação positiva entre o consumo de FIPs e a ocorrência de infecções por *C. sakazakii*, pesquisas têm demonstrado que uma proporção substancial de recém-nascidos prematuros são alimentados com essas fórmulas. Embora o aparecimento da doença seja raro entre os casos relatados mundialmente, cerca de 65%, deles incluindo os casos suspeitos de infecção por *C. sakazakii*, estão relacionados à ingestão de FIPs, e a infecção por esse patógeno resulta em grande número de óbitos (DRUDY et al., 2006).

Mediante esse problema e a falta de alternativa para atender às necessidades nutricionais dos recém-nascidos, a Food and Drug Administration – USA (FDA) sugeriu a reconstituição da fórmula infantil com água fervente, seguida de refrigeração imediata para reduzir o risco de ocorrência de infecção. No entanto, essas alternativas podem comprometer a qualidade nutricional das fórmulas, como a perda de vitaminas, a exemplo da tiamina e do ácido ascórbico (CFSAN, 2002). Tal recomendação requer análise cuidadosa de riscos e benefícios ou mesmo a busca de alternativas que excluam a administração de FIPs ou de interveções que aumentem a sua segurança.

Em seu processo de fabricação, as fórmulas são submetidas à pasteurização, o que destrói *C. sakazakii*. Contudo, a contaminação pós-pasteurização pelo patógeno poderá ocorrer durante diferentes etapas de produção das fórmulas, como: 1) por contaminação cruzada com matérias-primas e, em particular, durante a adição de nutrientes termossensíveis, como vitaminas e minerais, após a pasteurização; e 2) ambiente de processamento, equipamentos e linhas de processamento (IVERSEN; FORSYTHE, 2003).

Entre as fórmulas infantis associadas a casos de infecção causados por *C. sakazakii*, as mais comumente envolvidas são as fórmulas lácteas infantis destinadas a crianças entre 0 e 6 meses de idade. Em contrapartida,

as fórmulas lácteas em pó destinadas às crianças com idade entre 6 a 36 meses (fórmulas de segmento), possuem em especial ingredientes adicionais utilizados nessas preparações, a exemplo, daquelas para suplementação vitamínico-mineral, que têm sido as principais fontes de isolamento do patógeno (WHO, 2004; FAO/WHO, 2006). Isso indica que crianças, com idade inferior a seis meses são mais suscetíveis ao patógeno, pois as crianças acima dessa idade, por ingerirem FIPs com maior probabilidade de conter o patógeno, deveriam ser mais afetadas pela contaminação com o patógeno.

Além das fórmulas infantis, o patógeno tem sido isolado de vários ambientes, como de plantas de processamentos industriais, de ambientes domésticos e hospitalares e de diferentes alimentos, como queijos e pães (CDC, 2001).

Cronobacter sakazakii possui tropismo pelo sistema nervoso central (SNC), sendo a meningite a forma clínica mais frequente da infecção, evoluindo para abscessos cerebrais, infarto cerebral e formação de cistos, podendo, ainda, manifestar complicações como NEC e bacteremia (BARREIRA et al., 2003).

Embora a morbidade relacionada à infecção causada por *C. sakazakii* seja baixa, 1 em cada 10.660 recém-nascidos de baixo peso ao nascer (STOLL et al., 2004), a mortalidade é elevada, em torno de 80 % (FARBER, 2004), variando de 40 a 100 % (HUNTER et al., 2008). Além disso, o micro-organismo tem sido citado em surtos e casos esporádicos de doenças envolvendo recém-nascidos debilitados (BARREIRA et al., 2003). A gravidade é tão extrema que os neonatos que sobrevivem apresentam, na maioria das vezes, sequelas graves diretamente relacionadas ao sistema nervoso central (WHO, 2004; LAI, 2001; NAZAROWEC-WHITE; FABER, 1997; BARREIRA et al., 2003).

Os sintomas variam de acordo com a idade. Nos lactentes, a síndrome evolui para meningite, conjuntivites, enterocolites necrosantes (NEC), septicemia e abscessos cerebrais. Nos prematuros predomina a NEC, determinando isquemia intestinal, evoluindo para distensão abdominal, necrose intestinal, vômitos biliares, muitas vezes resultando em peritonite e choque (FORSYTHE, 2005).

O primeiro caso de infecção por *C. sakazakii* ocorreu em 1958 na Inglaterra, seguido de episódios na Dinamarca e nos EUA (Geórgia e Oklahoma) no mesmo ano. Posteriormente em 1981, na Índia, houve novamente um caso de infecção por esse patógeno, tendo ocorrido casos subsequentes em outros países, como o relatado na França, em 2004 (DRUDY et al., 2006).

Em 2003, no Hospital da Universidade de São Paulo (HU/USP) uma criança de 14 dias foi internada apresentando dificuldade de se alimentar, palidez, hipoatividade e vômito, evoluindo para choque séptico e culminando com a transferência para Unidade de Terapia Intensiva (UTI) no segundo dia de internação. No 15º dia, o paciente apresentou abaulamento acentuado da fontanela e disjunção de suturas cranianas, e culminou em óbito (BARREIRA et al., 2003) (Figura 1). Do líquido cefalo-raquidiano ou líquido (LCR) dessa criança foram isoladas estipes de *C. sakazakii* resistentes a vários antibióticos.

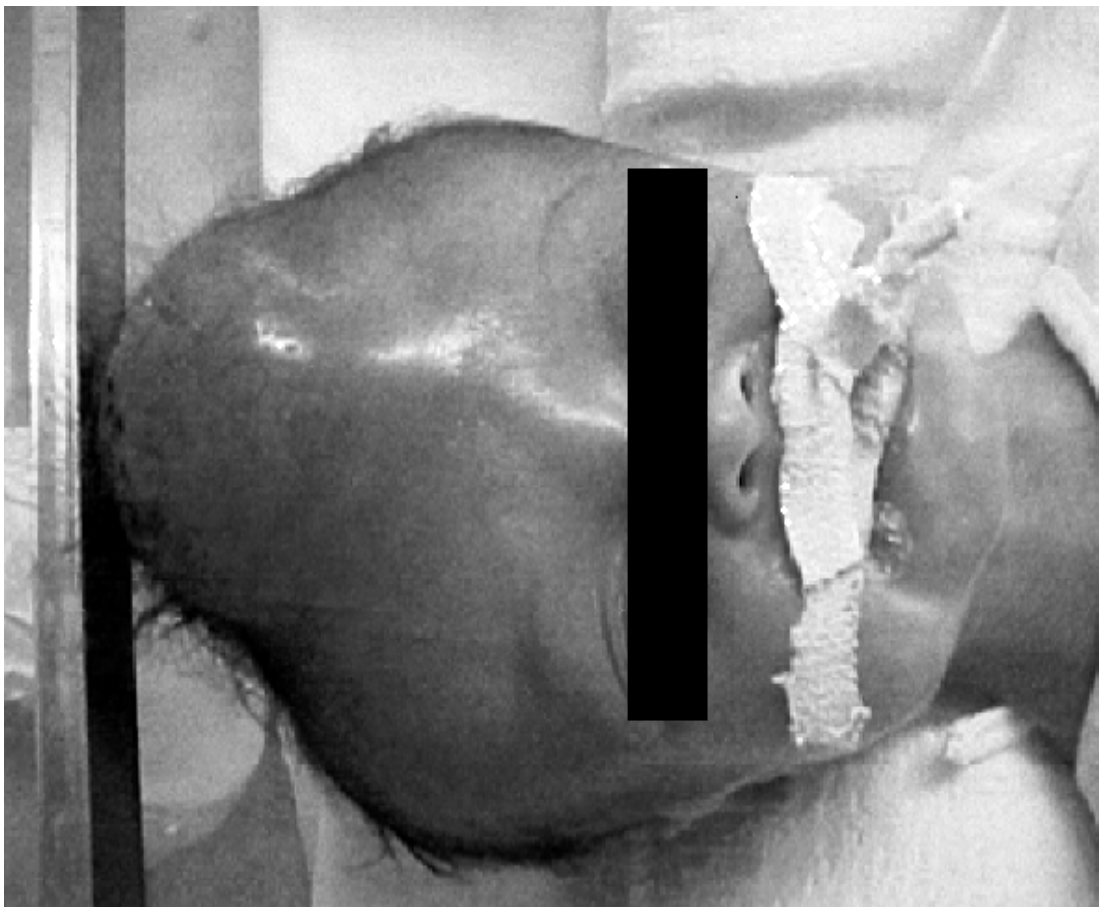


Figura 1 – Recém-nascido com meningite por *Cronobacter sakazakii*.
Fonte: Extraído e adaptado de BARREIRA et al., 2003.

Embora exista correlação positiva entre FIPs, surtos e casos de infecções por *C. sakazakii*, a referida criança estava em aleitamento exclusivo, o que chama a atenção não somente para o devido controle e preparo das FIPs, que como relatado é de extrema relevância, mas também para a necessidade de controle ambiental mais amplo, devido ser um micro-organismo ubiqüitário (IVERSEN; FORSYTHE, 2003; BARREIRA et al., 2003). Essa problemática, associada às FIPs e à necessidade de se maximizar a resposta imunitária de recém-nascidos, enfatiza a importância do aleitamento materno, à medida que propicia criticamente a maturação do trato digestório de recém-nascidos, o que evita a invasão de patógenos e o estabelecimento de infecções (BARREIRA et al., 2003).

Estudos têm indicado que a introdução de alimentos sólidos ou de fórmulas a partir da segunda semana de vida favorece o aparecimento de infecções. Além disso, a mortalidade de bebês com até três meses de idade assim alimentados é quase três vezes maior comparada com aqueles alimentados exclusivamente com o leite materno. De fato, a falta ou a insuficiência de aleitamento materno resulta em diminuição da área de superfície intestinal, em alteração do padrão enzimático da mucosa intestinal, em diminuição da resposta inflamatória e em depressão do sistema imunitário secretor das mucosas (KALLIOMÄKI, 2001). Assim, não há estímulo para o aumento de anticorpos, células *Killer*, células T, interferon e para atividade de macrófagos (PENNA et al., 2000).

O acúmulo de informações sobre a microbiota intestinal humana tem recebido crescente destaque, uma vez que apresenta importância fundamental na seleção de diferentes grupos microbianos presentes nesse habitat (SZAJEWSKA, 2007). Antes da ruptura da membrana fetal, o trato digestório é estéril, ocorrendo colonização subsequente com micro-organismos oriundos da mãe, do alimento e do ambiente (KALLIOMÄKI, 2001).

Em um estudo realizado com animais revelou que a maturação do trato digestório ocorre mais rapidamente em animais alimentados com leite da própria mãe e em animais que recebem colostro, pois ele contém altas concentrações de fatores de crescimento epidérmico (SCHANLER; SCHULMAN; LAU, 1999). O fator *bifidus* presente no leite materno é

responsável pelo crescimento de micro-organismos benéficos e mantém baixa a população de Gram-negativos (NEWMAN, 1995). Além disso, segundo Falk et al. (1998), a microbiota presente no intestino delgado e no cólon são essenciais para diferenciação do epitélio intestinal, para a síntese de mucinas pelas células caliciformes e para a distribuição e constituição do tecido linfático associado à mucosa intestinal, que comporta grande parte das células de defesa.

A microbiota intestinal apresenta, ainda, potencial para exercer respostas pró- e anti-inflamatórias. Com isso, a colonização adequada do intestino pode estar intimamente relacionada ao funcionamento adequado do sistema imunitário (HONDA; TAKEDA, 2009). Assim, é possível que alterações no desenvolvimento ou na composição da microbiota influenciem a relação entre o sistema imunitário e a própria microbiota, conduzindo a respostas imunes alteradas que, por sua vez, podem ser a base de vários processos inflamatórios e defesas imunológicas comprometidas. Por exemplo, verifica-se que animais experimentais livres de micro-organismos (*germ free*) apresentam alta suscetibilidade e mortalidade quando são desafiados por patógenos comparada com animais naturalmente colonizados (ROUND; MAZMANIAN, 2009). Essa informação reforça que a presença de micro-organismos benéficos aumenta a proporção de células fagocitárias como monócitos e neutrófilos e, conseqüentemente, o processo imunitário (Figura 2).

Recém-nascidos alimentados com leite materno são colonizados com maiores números de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Eubacterium* spp., o que torna o pH das fezes mais ácido. Em contrapartida, os neonatos alimentados com leite artificial tendem a apresentar fezes menos ácidas, o que favorece a colonização indesejada por representantes dos gêneros *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Campylobacter*, *Escherichia*, *Veillonella* e *Klebsiella*, capazes de causar infecções (SEPP et al., 2000; ROLFE, 2000).

A microbiota intestinal é um sistema complexo, com grande número de gêneros e espécies microbianas, mantidos em equilíbrio dinâmico (DELGADO et al., 2004). Após a colonização, essa microbiota contém mais de 500 espécies pertencentes a cerca de 40 gêneros, sendo apenas 20 a 30

espécies dominantes (TRABULSI; SAMPAIO, 2000). Essas populações adaptam-se de tal forma que os números em cada gênero são consistentes em seus determinados nichos (FOOKS; GIBSON, 2002). A manutenção desse equilíbrio é essencial para a saúde da criança em razão, principalmente, do importante papel que exerce na resistência à colonização por patógenos, uma vez que o metabolismo microbiano benéfico resulta em acúmulo de substâncias inibidoras, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, entre outras (QUIGLEY, 2000).

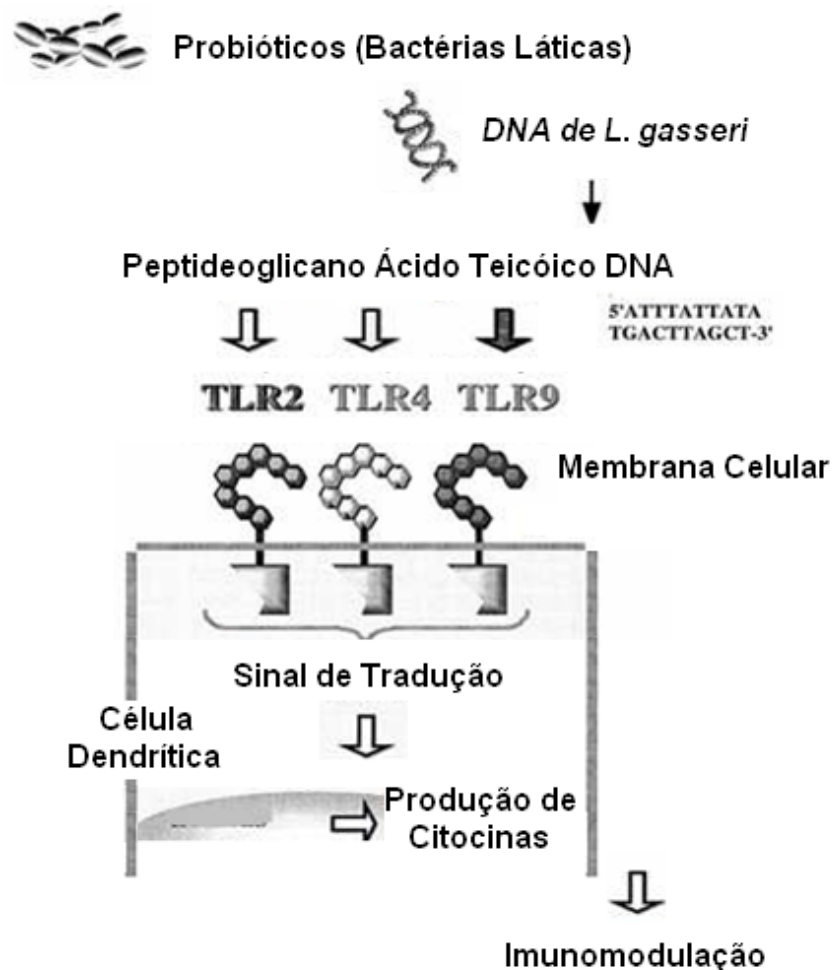


Figura 2 – Interação entre os componentes bacterianos (*Lactobacillus gasseri*) e a célula dendrítica. TLR = Receptor Similar a Toll.
 Fonte: Extraído e adaptado de AMROUCHE, 2005.

2.1.1. Bacteriocinas

Bacteriocinas são proteínas, ou complexos de proteínas, conceituadas como substâncias produzidas por bactérias e que são capazes de inibir ou destruir espécies relacionadas (TAGG; DAJANI; WANNAMAKER, 1976), normalmente agindo sobre Gram-positivos (HERNÁNDEZ; CARDELLE; ZÁRATE, 2005). Alguns autores relataram ação de bacteriocinas sobre Gram-negativos, como por exemplo a ação das colicinas, uma das primeiras bacteriocinas descritas, que possuem amplo espectro sobre *Escherichia coli* (HARDY, 1975), bem como bacteriocinas isoladas de *Campylobacter* spp., que demonstraram ação sobre o crescimento de *Salmonella* (WORKMAN et al., 2008). Entretanto, a ação de bacteriocinas sobre bactérias Gram-negativas é menos comum em função da presença da membrana externa nessas bactérias, dificultando a ligação da bacteriocina na membrana plasmática o que torna esses microorganismos menos suscetíveis à ação das bacteriocinas (DESMAZEAUD, 1997). Além disso, são efetivas em baixa concentração, por exemplo, 10 mg.kg⁻¹ (RODGERS, 2001).

São divididas em quatro classes, sendo a classe I e a II, compostas por peptídeos menores, considerados termoestáveis. As classes III e IV são representados por peptídeos maiores, termossensíveis, podendo ser proteínas hidrofílicas (KLAENHAMMER et al., 1993). No Quadro 1, encontram-se exemplos de três classes de bacteriocinas, já que a classe IV atualmente não é considerada por muitos autores (DRIDER et al., 2006).

Os mecanismos de ação das bacteriocinas são variados; a classe I apresenta como seu principal constituinte a nisina, que possui duplo mecanismo de ação, promovendo morte celular por formação de poros na membrana, que causa desequilíbrio iônico com saída de íons, K⁺ e ATP, e interferência na síntese da parede celular (BRUNO; MONTVILLE, 1993; JACK; TAGG; RAY, 1995). A formação de poros resulta na perda da força protônica (próton-motiva) e comprometendo a síntese de ATP, a fosforilação de proteínas, síntese e rotação de flagelos e o transporte de proteínas (BRUNO; MONTVILLE, 1993, GONZÁLEZ-MARTINEZ; TREVIÑO-GÓMEZ; JIMÉNEZ-SALAS, 2003).

Quadro 1 – Bacteriocinas e mecanismo de ação

Classes	Subgrupos/ Subclasses	Mecanismo de ação	Alguns exemplos de bacteriocinas e micro- organismo produtor
Classe I Lantibióticos	Tipo A (moléculas lineares)	Formação de poros na membrana de bactérias	Nisina – <i>Lactococcus lactis</i> Subtilina – <i>Bacillus subtilis</i>
	Tipo B (moléculas globulares)	Inibição de enzimas específicas e da biossíntese da parede celular.	Mersacidina – <i>Bacillus</i> spp. Mutacina II – <i>Streptococcus mutans</i>
Classe II Não Lantibióticos	Subclasse IIa (bacteriocinas tipo pediocina- antilisterial)	Espectro limitado – Mecanismo não totalmente elucidado, mas parece que sua ação é mediada por receptor	Pediocina p A-1 - <i>Pediococcus acidilactici</i> Sakacina A : <i>Lactobacillus sakei</i> Lb 706 curvacina A : <i>Lactobacillus curvatus</i> Mesentericina y 105: <i>Leuconostoc mesenteroides</i> Enterocina A: <i>Enterococcus faecium</i> Divercina V41: <i>Carnobacterium divergens</i> v41
	Classe IIb (composta por dois peptídeos)		Plantaricina E/F: <i>Lactobacillus plantarum</i> C11 Plantaricina J/K: <i>Lactobacillus plantarum</i> ST 31
	Classe IIc (outras bacteriocinas)		Acidocina B – <i>Lactobacillus acidophilus</i> M46 Carnobacteriocina A - <i>Carnobacterium piscicola</i> LV 17 ^a
Classe III (Bacteriocina s complexas)	-	Mecanismo não totalmente elucidado	Helveticina J – <i>Lactobacillus helveticus</i> Millericina B - <i>Streptococcus milleri</i> NMSCC 061

Fonte: FOEGEDING et al., 1992; CHIKINDAS et al., 1995; HOFFMANN et al., 2002; COTTER; HILL; ROSS, 2005; SCHULZ; BONELLI; BATISTA, 2005; DRIDER et al., 2006.

As bacteriocinas da classe II mais estudadas são as pediocinas e as enterocinas (NASCIMENTO, MORENO, KUAYE, 2008). Nessa classe, têm-se bacteriocinas efetivas sobre *Listeria*, apresentando uma sequência comum de aminoácidos, Tyr – Gly – Asn – Gly – Val, e duas cisteínas formando ponte dissulfeto do N-terminal no interior do peptídeo. Provavelmente essa sequência seja responsável pela aderência à célula sensível (MELO; SOARES; GONÇALVES, 2005). Geralmente possui uma estrutura helicoidal antifílica, que permite sua inserção na membrana das células sensíveis resultando em depolarização e consequente morte da célula (NASCIMENTO, MORENO, KUAYE, 2008).

Segundo Moll; Konings e Driessen (1999), dois mecanismos existem para explicar a ação das bacteriocinas sobre as células-alvo: um denominado *Barrel-stave* (A) e outro, *Wedge-like* (B) (Figura 3).

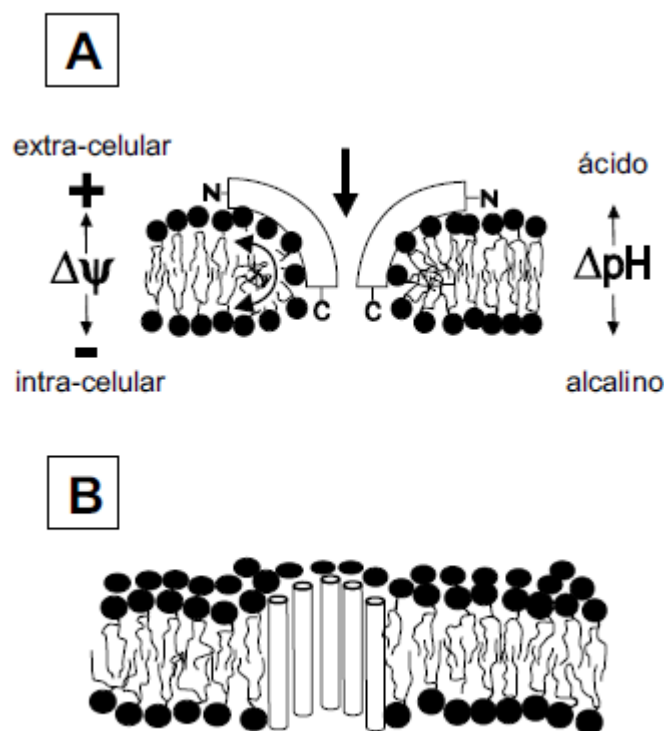


Figura 3 – Modelos da formação de poros na membrana. (A) – Poros *Wedge-Like*; (B) – Poros *Barrel-stave*.

Fonte: Extraído e adaptado de MOLL; KONINGS; DRIESSEN, 1999.

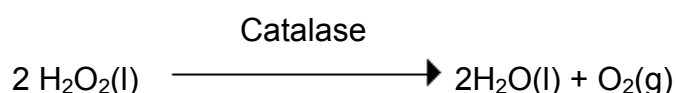
No modelo A, as moléculas de peptídeos orientam-se formando agregados cilíndricos com formação de poros na membrana, por aumentarem a sua permeabilidade, e é comum a bacteriocinas da classe II. No modelo B, ocorre ligação das moléculas de bacteriocina, inseridas na bicamada lipídica por força protônica e paralelas à orientação dos lipídios, porém não mantendo contato com a parte hidrofóbica da membrana, mecanismo comum da classe I (BRUNO; MONTVILLE, 1993; MOLL; KONINGS; DRIESSEN, 1999).

Quanto aos mecanismos da classe III de bacteriocinas, alguns autores relataram que o mecanismo não foi totalmente elucidado; possivelmente ocorre por lise de células pela formação de poros na membrana (JACK; TAGG; RAY, 1995). Outros afirmaram que somente seu modo de ação é complexo (RODRÍGUEZ et al., 2003).

2.1.2. Ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio

A atividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos, principalmente ácido acético e láctico, depende da redução do pH citoplasmático, da pequena dissociação do ácido e da toxicidade da molécula. Os ácidos fracos são mais letais que os ácidos fortes, visto que são tipicamente protonados e eletricamente neutros, são capazes de maior penetração na célula microbiana, o que acidifica o citoplasma e desencadeia outros efeitos letais (PODOLAK et al., 1996; GHADBAN, 2002; FERREIRA; ALTOLFI-FERREIRA, 2006).

O peróxido de hidrogênio, como agente antimicrobiano oxidante, possui ação letal sobre bactérias catalase-negativas, uma vez que a catalase protege seus produtores, por decompor o peróxido de hidrogênio segundo a reação (HUSAIN; CILLARD; CILLARD, 1987):



A inibição de espécies bacterianas pela presença de H_2O_2 também é um mecanismo de antagonismo importante. Alguns *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, são capazes de converter o O_2 molecular em peróxido de

hidrogênio. Esse composto é acumulado na ausência de peroxidase. O excesso desse metabólito pode ser (bacteriostático ou bactericida) inibir ou matar outros micro-organismos (ESCHENBACH et al., 1989). *L. gasseri* e *Bifidobacterium* são capazes de produzir e liberar peróxido de hidrogênio (SERVIN, 2004).

Cronobacter sakazakii é catalase-positivo (IVERSEN; FORSYTHE, 2007), entretanto essa condição não imuniza o patógeno de ser antagonizado pelo peróxido de hidrogênio, uma vez que, entre outros fatores, a catalase pode ser produzida de forma tardia, o que foi demonstrado em estudos realizados por Chester e Moskowitz (1987), avaliando estirpes de *C. sakazakii*. Esses autores constataram que todas as estirpes de *C. sakazakii* avaliadas apresentaram produção tardia de catalase, o que expõe a célula à condição de toxicidade até o momento da proteção pela catalase.

2.1.3. A homeostase intestinal saudável

Várias situações como alteração da própria dieta, condições de estresse, consumo de fármacos, entre os quais os antibióticos podem romper o equilíbrio microbiano intestinal. Esse desequilíbrio é traduzido pela diminuição de espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e pelo aumento de espécies indesejáveis ou patogênicas (FOOKS; GIBSON, 2002). Uma alternativa para promover ou repor o equilíbrio da microbiota intestinal é a ingestão de probióticos. Várias definições têm sido publicadas para o termo probiótico. Probiótico pode ser definido como “suplemento alimentar contendo bactérias viáveis de origem intestinal humana quando direcionado para consumo humano, ou de origem animal quando se destina a determinada espécie animal, o que estimula beneficemente o hospedeiro pela melhoria do balanço da microbiota intestinal” (FERREIRA et al., 1996). Observa-se que é consenso de que probiótico é um suplemento alimentar que contém micro-organismos vivos benéficos à saúde (SALMINEN; OUWENHAND; ISOLAURI, 1998). Os probióticos estão associados a uma série de benefícios para a saúde humana, sendo estes os aspectos mais enfatizados na pediatria: i) controle de diarreias agudas e infecciosas

(WALKER, 2000; MICHAIL; ABERNATHY, 2002); ii) prevenção de diarreia associada ao uso de antibiótico (HAWRELAK; WHITTEN; MYERS, 2005); iii) prevenção de diarreia nosocomial (MASTRETTA et al., 2002; CHOURAQUI; VAN EGROO; FICHOR, 2004); iv) prevenção de NEC (LIN et al., 2005; HUNTER et al., 2007), v) prevenção de alergias (KALLIOMÄKI et al., 2003; PASSERON et al., 2006; KALLIOMÄKI et al., 2007).

Prebiótico pode ser definido como todo ingrediente alimentar que estimula de maneira benéfica o organismo por estimular seletivamente o crescimento e ou, atividade de um ou um número limitado de bactérias do cólon. Tem-se como exemplos: lactulose, lactitol, xilitol, inulina e alguns oligossacarídeos não digeríveis (Frutoligossacarídeos – FOS) (SANTOS et al., 2006). É um ingrediente importante, pois possui a capacidade de modificar a composição da microbiota colônica, o que resulta em maior colonização por bactérias benéficas (CAPRILES; SILVA; FISBERG, 2005). Assim, o efeito combinado dos micro-organismos probióticos e dos ingredientes prebióticos no cólon (GIBSON; ROBERFROID, 1995) pode ser potencializado, e resulta em alimentos funcionais simbióticos, ou seja, que carregam simultaneamente um probiótico e um prebiótico.

Infecção intestinal em crianças e recém-nascidos é comum em países em desenvolvimento, onde constituem a primeira causa de morbidade e mortalidade (BARREIRA et al., 2003; COSTA et al., 2001; OLIVEIRA; SIQUEIRA; ABREU, 2008). A administração cada vez mais indiscriminada de fármacos antimicrobianos tem sido alvo de preocupação mundial em saúde pública, já que, além de promoverem o desbalanceamento da microbiota intestinal, induzem a seleção de micro-organismos resistentes. Como resultado, tem-se o aparecimento de micro-organismos multirresistentes, incapazes de serem eliminados com os medicamentos usuais (Quadro 2). Deflagra-se, então, um ciclo vicioso, aumentando as doses terapêuticas e a intensidade da administração, que por sua vez geram maior resistência e diminuição de seu efeito antimicrobiano (GERVÁS, 2000).

Crianças que receberam antibióticos ao nascerem apresentaram microbiota intestinal anormal mesmo após quatro semanas depois do término da terapia, tal o impacto negativo desses agentes. Além disso,

podem predominar nessa microbiota patógenos, em particular certas estirpes de *E. coli*, além de *Staphylococcus epidermidis*, *Clostridium perfringens* e *C. cloacae* (GEWOLB et al., 1999).

Embora relatado problemas relacionados ao uso de antibióticos, como seleção de patógenos resistentes, desbalanceamento da microbiota intestinal do hospedeiro, o que favorece o surgimento de infecções no trato digestório (DANIELSEN; WIND, 2003), sua utilização é comum no ambiente hospitalar, o que é demonstrado em diversos estudos. Pessoa-Silva et al. (2007) evidenciaram, em sete Unidades Neonatais do Brasil (Rio de Janeiro, Campinas e São Paulo), uma taxa de infecção hospitalar alta comparada com a dos estudos internacionais. A maioria foi associada à sepse tardia, ou seja, ocorreu com mais de 48 h de vida, e 28 % ocorreram nas primeiras 48 h de vida, possivelmente em função de infecção de origem materna. Entre os recém-nascidos de baixo peso (<1000 g), mais da metade tiveram infecção durante a estadia em UTI Neonatal. Cerca de 40 % das mortes foram associadas à infecção hospitalar, sendo metade por sepSES.

A utilização de antibióticos deve ser, assim, realizada com cautela, a fim de evitar a seleção de micro-organismos multirresistentes, principalmente em relação a antimicrobianos direcionados a Gram-negativos, já que o uso não racional de antibióticos faz prevalecer infecções por micro-organismos Gram-negativos. Verificou-se essa problemática em um hospital no Ceará, onde 87 % dos micro-organismos responsáveis pelas sepSES eram Gram-negativos, fato possivelmente relacionado ao uso inadequado de antibióticos (RICHTMANN, 2005).

A seleção de Gram-negativos gera um problema ainda maior, pois a partir da década de 1980 houve aumento da incidência de bactérias Gram-negativas produtoras de beta-lactamases, enzimas que inativam considerável variedade de beta-lactâmicos, incluindo cefalosporinas e monobactâmicos (JAIN et al., 2003) empregados em UTI neonatal (BRADFORD, 2001) para tratamento de infecções causadas por micro-organismos desse grupo. Entretanto, alguns estudos já sugerem a busca de alternativas que sirvam como adjuntos ou coadjuvantes no combate à infecção, principalmente por micro-organismos oportunistas, como *C. sakazakii*.

Quadro 2 – Mecanismos e espectro de ação de antibióticos utilizados no combate às infecções

Classe dos Antimicrobianos	Mecanismo de ação	Espectro de Ação	Exemplos
Penicilina (β – lactâmico)	Intervenção na síntese da parede celular	Gram-positivas, Gram-negativas e algumas fastidiosas que não produzem β – lactamase	Penicilina G, penicilina V, oxacilina, diicloxacilina, nafcilina, tircacilina, piperacilina, meticilina, ampicilina, amoxicilina, epicilina, carpecilina
Cefens (incluindo Cefalosporina)		Gram-positivas; Gram-negativas	Cefalotina, cefalexina, cefaclor, cefamandol, ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima.
Carbapenêmicos (β – lactâmico)		Bactérias Gram-negativas e Gram-positivas	Imipenem, panipenem, meropenem e ertapenem
Monobactams		Bactérias aeróbicas Gram-negativas	Aztreonam
Glicopeptídicos		Gram-positivas	Vancomicina
Aminoglicosídeos	Agentes que afetam a síntese de proteínas bacterianas	Gram-negativos aeróbios, ou Gram-positivas em combinação com outros antibióticos que agem diretamente na parede celular	Gentamicina, estreptomicina, ampicacina, tobramicina, sisomicina, canamicina, neomicina e netimicina
Macrolídios		Gram-positivas; anaeróbicas e pouca atividade contra Gram-negativas	Eritromicina, claritromicina e azitromicina
Tetraciclínas		Gram positivas; Gram negativas	Doxiciclina
Quinolonas		Agentes que afetam a síntese de ácidos nucléicos	Gram-positivas; Gram-negativas
Inibidores da Via Metabólica do Folato	Interfere na replicação celular	Gram-positivas; Gram-negativas	Sulfonamidas e trimetoprima-sulfametoxazol
Classes de Drogas Únicas	Inibe a síntese protéica		Cloranfenicol, clindamicina, linezolida e quinupristin-dalfopristin, rifampina

Fonte: Adaptado de FERREIRA, 1997; TAVARES, 2001; REESE; BETTS; GUMUSTOP, 2002; NCCLS, 2003.

O fato de *C. sakazakii* ser considerado um contaminante em leite desidratado e FIPs tem chamado a atenção de vários grupos de pesquisadores na busca de alternativas para a mitigação desse problema, dentre as quais o uso de probióticos. Ruas-Madiedo et al. (2006) avaliaram o papel de exopolissacarídeos produzidos por bactérias probióticas e por alguns patógenos, entre os quais *C. sakazakii*, em ensaios *in vitro* de adesão a muco immobilizado. Os autores concluíram que as frações de exopolissacarídeos das estirpes probióticas testadas não afetaram significativamente sua aderência ao muco intestinal humano. No entanto, nos enteropatógenos, segundo as frações de exopolissacarídeos avaliadas, a aderência ao muco intestinal humano foi favorecida. Embora o mecanismo de adesão não tenha sido elucidado nesse trabalho seminal, foi sugerido que a adesividade do patógeno estaria positivamente correlacionada a sua virulência. Surtos epidêmicos de NEC determina taxas de mortalidade em crianças entre 40 a 100 %, e *C. sakazakii* é um dos micro-organismos relacionados à essa doença. Segundo estudos *in vivo*, realizado por Hunter et al. (2007), *C. sakazakii* induz a NEC por mecanismo de expressão de IL-6 (citocinas inflamatórias) pelos enterócitos. Considerando-se essa hipótese, esses autores demonstraram que bactérias probióticas do gênero *Lactobacillus* podem conferir proteção contra NEC protegendo enterócitos de apoptose, neles induzida por *C. sakazakii*, via competição por sítios de ligação, ou pela promoção de um ambiente ácido, inadequado ao patógeno.

Outra hipótese testada, ligada ao mecanismo da NEC, foi a modulação favorável, por lactobacilos probióticos, da enzima induzível óxido nítrico sintase (iNOS) de *C. sakazakii*, responsável pela indução da apoptose dos enterócitos. Considerando-se o papel dessa enzima no estabelecimento da NEC, outro estudo demonstrou que espécies de *Lactobacillus* impediram a indução experimental da doença por meio da atenuação da produção da iNOS (YU et al., 2008). Collado, Isoulari e Salminen (2008) avaliaram *in vitro* o papel de estirpes probióticas, isoladamente ou em conjunto, nos processos de inibição, competição e reversão da adesão de *C. sakazakii* em muco immobilizado, e na agregação com o patógeno. Foi demonstrado que estirpes probióticas agregam-se às células de *C. sakazakii* por meio de exclusão competitiva, o que inibe e remove o patógeno já aderido ao muco. Esses

autores concluíram que os efeitos observados foram estirpe-dependentes, e que nesses processos vários mecanismos estariam envolvidos. Indicaram, ainda, que estirpes probióticas específicas, bem selecionadas, e suas combinações podem ser úteis no controle de contaminação de FIPs com *C. sakazakii*, tornando os FIPs alimentos mais seguros. Assim, a presença de probióticos nessas fórmulas reforçaria a desejável homeostase intestinal, aumentando a proteção contra patógenos.

Ainda que se considere o efeito positivo da colonização intestinal pelos probióticos, um estudo utilizando *B. breve* indicou que sua presença em uma FID não reduziu os números de *C. sakazakii* na fórmula reidratada e mantida por mais de 2 h a temperaturas superiores a 30 °C. Além disso, não inibiu o crescimento do patógeno a 37 °C, temperatura ótima de crescimento de *C. sakazakii*. Mais estudos utilizando outras espécies e combinações de probióticos devem ser conduzidos (OSAILI et al., 2008).

De toda forma, considerando-se que as defesas do hospedeiro e a ecologia microbiana têm importante papel na patogênese da NEC, há um sólido corpo de evidências que indicam que terapia com bactérias comensais e probióticas podem ser úteis na manutenção da barreira epitelial intestinal (PENNA et al., 2000; SILVA, STAMFORD, 2000; EMAMI et al., 2009; HONDA; TAKEDA, 2009)

No Brasil, como em algumas outras partes do mundo, o incentivo ao aleitamento materno, o aumento da disponibilidade de água tratada, e o uso mais difundido da reidratação oral tem contribuído para a redução da taxa de mortalidade infantil em crianças menores de 5 anos. Nesse contexto, a inserção de probióticos e prebióticos na clínica pediátrica tem sido direcionada para seu uso como um adjunto ou coadjuvante das medidas já amplamente aceitas como efetivas no controle e tratamento de infecções intestinais e suas consequências (MORAIS; JACOB, 2006). Além disso, os Bancos de Leite Humano (BLH), que crescem em número por todo o Brasil, tem contribuído para o restabelecimento do neonato. Nesses bancos, o leite depositado é pasteurizado, mas estudos demonstraram que esse tratamento térmico, embora seja necessário para disponibilizar um alimento seguro, elimina um fator bifidogênico (BORBA; FERREIRA, 2003). O fator bifidogênio, também chamado de fator *bífidus*, é representado por

oligosacarídeos presentes no Leite Humano, que favorecem o crescimento de *Bifidobacterium* nos recém-nascidos amamentados ao seio (SANTOS et al., 2006).

Com isso, bactérias isoladas de crianças saudáveis, que apresentam características probióticas definidas, poderiam ser adicionadas no Leite Humano em BLH para veiculação de bactérias desejáveis, importantes para a maturação do sistema de defesa da criança. Considerando-se a importância do aleitamento materno, alternativas devem ser buscadas em caso de impossibilidade de seu provimento. A primeira e mais usual consiste da administração de leite humano oriundo dos BLH. No entanto, tal alternativa pode não ser factível, seja por não existir BLH no local ou acesso a ele, ou mesmo porque a criança é prematura e necessita de um suporte energético superior ao do aleitamento materno para aquele momento. Nesses casos especiais, podem-se buscar alternativas para suplementar as necessidades nutricionais dos recém-nascidos, mantendo-se em perspectiva a importância do leite humano, e as questões de segurança associadas às FIPs, em especial em relação ao patógeno *C. sakazakii*.

2.2. Hipóteses Experimentais

A problemática anteriormente exposta neste capítulo precipitou a construção das seguintes hipóteses experimentais testadas no presente estudo:

- I) ***Cronobacter sakazakii* apresenta-se resistente à maioria dos antibióticos tipicamente utilizados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) neonatal.**

Para teste da hipótese acima, perseguiram-se os seguintes objetivos:

- Avaliar a sensibilidade de *C. sakazakii* aos antibióticos mais comumente utilizados em UTI neonatal no Brasil;
- Avaliar a sensibilidade dos micro-organismos probióticos *Lactobacillus gasseri* e *Bifidobacterium* spp. aos antibióticos mais comumente utilizados em UTI neonatal no Brasil, para obter informação acerca da eficácia e segurança do uso desses probióticos como adjuntos terapêuticos

- II) ***Lactobacillus gasseri* isolado de crianças recém-nascidas e *Bifidobacterium* spp. antagonizam *Cronobacter sakazakii*.**

A hipótese foi testada segundo os seguintes objetivos:

- Avaliar a antagonismo, e as condições conducentes ao antagonismo, de estirpes de *Bifidobacterium* spp. e *L. gasseri* sobre estirpes de *C. sakazakii*.
- Comparar o antagonismo de *Bifidobacterium* spp. e *L. gasseri*, sobre o patógeno. Exame da possível influência de ácidos orgânicos no antagonismo eventualmente observado para os organismos probióticos.

III) O antagonismo de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus gasseri* sobre o patógeno *C. sakazakii* depende principalmente de metabólitos das bactérias bífidas e de *L. gasseri* secretados no meio, ocorrendo mesmo na ausência das células produtoras desses micro-organismos.

Para teste da hipótese acima, perseguiram-se os seguintes objetivos:

- Determinar a fase de crescimento de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus gasseri* associada a produção ótima dos metabólitos antagonistas;
- Determinar eventuais especificidades para as estirpes de *Bifidobacterium* spp. e *L. gasseri* no antagonismo de *C. sakazakii*;
- Determinar a influência da pasteurização sobre a ação dos metabólitos antagonistas bífidos e de *L. gasseri* sobre o patógeno.

IV) A natureza do inibidor é ácida/protéica, o que sugere a produção de bacteriocina

- Elucidar a composição química primária dos metabólitos antagonistas de *L. gasseri*. e de *Bifidobacterium* spp.

REFERÊNCIAS

AMROUCHE, T. Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactéries: analyse in vitro et étude ex vivo des mécanismes moléculaires impliqués. Net, 2005. Doctorat en sciences et technologie des aliments – Université Laval–Québec. Disponível em: <http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede/files/5f73a576_ffd4-4557-aa82dd3ad-2002199/22772.html>. Acesso em: 31 dez. 2009.

BARREIRA, E. R.; SOUZA, D. C.; GÓIS, P. F.; FERNANDES, I. C. Meningite por *Enterobacter sakazakii* em recém-nascido: relato de caso. **Pediatria**, São Paulo, v. 25, p. 65-70, 2003.

BORBA, L. M.; FERREIRA, L. L. F. Probióticos em bancos de leite humano. In: FERREIRA, CLLF. **Probióticos e prebióticos**: atualização e prospecção. Visconde de Rio Rio Branco, MG: Suprema Gráfica e Editora, 2003. 206 p.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 14, p. 933-51, 2001.

BRUNO, M. E. C.; MONTVILLE, T.J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59 (9), p. 3003-3010, Sept., 1993.

CAPRILES, V. D.; SILVA, K. E. A.; FISBERG, M. Prebióticos, probióticos e simbióticos: nova tendência no mercado de alimentos funcionais. **Nutrição Brasil**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 6, p. 327-335, nov./dez. 2005.

CDC, Center for Disease Control. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula – Tennessee, 2001. CDC In: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5114a1.htm>>. Acesso em: 10 jun. 2008.

CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION. Office of nutritional products, Labeling and dietary supplements. April 11, 2002. Disponível em: <http://www.aleitamento.com/a_artigos.asp?id=x&id_artigo=438&id_subcategoria=1>.

CHESTER, B.; MOSKOWITZ, L. B. Rapid catalase supplemental test for identification of members of the family *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 439-441, 1987.

CHIKINDAS, M. L.; NOVAK, J.; DRIESSEN, A. J.; KONINGS, W. N.; CAUFIELD, K. M. Mutacin II, a bactericidal antibiotic from *Streptococcus mutans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 12, p. 2656-2660, 1995.

CHOURAQUI, J. P.; VAN EGROO, L. D.; FICHOR, M. C. Acidified milk formula supplemented with *Bifidobacterium lactis*: impact on infant diarrhea in residential care settings. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 38, p. 288-292, 2004.

COLLADO, M. C.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, S. Specific probiotic strains and their combination counteract adhesion of *Enterobacter sakazakii* to intestinal mucus. **FEMS Microbiology Letter**, v. 285, p. 58-64, 2008.

COSTA, M. C. N. A.Z.I.; P. A.; PAIM, J. S.; SILVA, L. M. V. Mortalidade infantil e condições de vida: a reprodução das desigualdades sociais em saúde na década de 90. **Cadernos de Saúde Pública**, v.17, n. 3, 2001.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews of Microbiology**, v. 3, p. 777-788, 2005.

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

DELGADO, S. A.; SUÁREZ, A.; OTERO, L.; MAYO, B. Variation of microbiological and biochemical parameters in the faeces of two healthy people over a 15 day period. **European Journal of Nutrition**, v. 43, p. 6, 2004.

DESMAZEAUD, M. Bacteriocins of lactic acid bacteria (LAB) and their interest to improve the higienic quality of products. **Cerela**, n. 8, p. 38-43, 1997.

DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HECHARD, Y.; McMULLEN, L. M.; PREVOST, H. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 70, n. 2, p. 564-582, 2006.

DRUDY, D.; MULLANE, N. R.; QUINN, T.; WALL, P. G.; FANNING, S. *Enterobacter sakazakii*: an emerging pathogen in powdered infant formula. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p. 996-1002, 2006.

EMAMI, C.N., PETROSYAN, M., GIULIANI, S., WILLIAMS, M., HUNTER, C., PRASADARAO, N.V., FORD, H.R. Role of the host defense system and intestinal flora in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. **Surgical Infection** (Laschmt), v.10, p. 407-417, 2009.

ESCHENBACH, D. A.; DAVICK, P. R.; WILLIAMS, B. L.; KLEBANOFF, S. J.; YOUNG-SMITH, K.; CRITCHLOW, C. M.; HOLMES, K. K. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27 (2), p. 251-6, 1989.

FALK, P. G.; HOOPER, L. V.; MIDTVEDT, T.; GORDON, J. I. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: What we Know and Need to Know from gnotobiology? **Microbiology and Molecular Biology**, Reviews, v. 62, p. 1157-1170, 1998.

FAO/WHO – Food and Agricultural Organization of the United Nation/World Health Organization. **Enterobacter sakazakii and Salmonella in powdered infant formula. Microbiological Risk Assessment**. Series 10 2006. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/AGN/jemra/enterobacter_en.stm>. Acesso em: 10 jul. 2009.

FARBER, J. M. *E. sakazakii*: new foods for thought? **Lancet**; v. 323, p. 5-6, 2004.

FERREIRA, C. L. L. F. Produtos lácteos de terceira geração: importância dos produtos contendo bactérias bifidas. **Leite & Derivados**, v. 29, p. 22-28, 1996.

FERREIRA, F. M. **Antibioticoterapia em pequenos animais**. São Paulo: Editora Ícone, 1997. 214 p.

FERREIRA, A. P.; ASTOLFI-FERREIRA, C. Medidas inespecíficas para o controle microbiano. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 7., 2006. **Resumos...** [S.l. : s.n.t.], p. 56-69, 2006.

FOEGEDING, P. M.; THOMAS, A. B.; PILKINGTON, D. H.; KLAENHAMMER, T. R. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during dry fermented sausage production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 884-890, 1992.

FOOKS, L. J.; GIBSON, G. R. Probiotics as modulators of the gut flora. **British Journal of Nutrition**, v. 8, p. S39-S49, 2002.

FORSYTHE, S. J. *Enterobacter sakazakii* and other bacteria in powdered infant milk formula. **Maternal and Child Nutrition**, v. 1, p. 44-50, 2005.

GERVÁS, J. La resistencia a los antibióticos, un problema de salud pública. **Atención Primaria**, v. 25, n. 8, 2000.

GEWOLB, L. H.; SCHWLBE, R. S.; TACIAK, V. L.; HARRISON, T. S.; PANIIGGRAHI, P. Stool microflora in extremely low birth infants. **Archives of Disease Childhood Fetal and Neonatal**, v. 80, p.167-73, 1999.

GHADBAN, G. S. Probiotics in broiler production – A review. **Archives of Geflugelk**, v. 66, n. 2, p. 49-58, 2002.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GONZÁLEZ-MARTINEZ, B. E.; TREVIÑO-GÓMEZ, M.; JIMÉNEZ-SALAS, Z. Bacteriocinas de probióticos. *Respyn*. **Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutricion**, v. 4 (2), 2003.

GURTLER, J. B.; KORNACKI, J. L.; BEUCHAT, L. R. *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. **International Journal of Food Microbiology**, v.104, p.1-34, 2005.

HARDY, K. G. Colicinogeny and relates phenomena. **Bacteriological Reviews**, v. 39, p. 464-515, 1975.

HAWRELAK, J. A.; WHITTEN, D. L.; MYERS, S. P. Is *Lactobacillus rhamnosus* GG effective in preventing the onset of antibiotic-associated diarrhoea: a systematic review. **Digestion**, v. 51-56, 2005.

HOFFMANN, A.; PAG, U.; WIEDEMANN, I. E.; SAHL, H. G. Combination of antibiotic mechanisms in lantibiotic. **IL Farmaco**, v. 57, p. 685-691, 2002.

HERNÁNDEZ, D.; CARDELLE, E.; ZÁRATE, V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF 711, a bactriocin like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF 711. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 99 (6), p. 77-84, 2005.

HONDA, K.; TAKEDA, K. Regulatory mechanisms of immune responses to intestinal bacteria. **Mucosal Immunology**, v. 2 (3), 2009.

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. **Phytochemistry**, v. 26, p.2489, 1987.

HUNTER, C. J.; SINGAMSETTY, V. K.; CAMENI, V.; UPPERMAN, J. S.; PRASADARAO, N. V.; FORD, H. R. *Enterobacter sakazakii* induces necrotizing enterocolitis (NEC) in vivo by upregulating enterocyte IL-6 production. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 205(3), 2007.

HUNTER, C. J.; WILLIAMS, M.; PETROSYAN, M.; GUNER, Y.; CHOKSHI, N.; UPPERMAN, J. S.; PRASADARAO, N.; FORD, H. R. *Lactobacillus* species abrogates pathogen induced experimental Necrotizing Enterocolitis (NEC) by attenuating inducible nitric oxide synthase (iNOS) production. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 207 (3), p. 54-S55, 2008.

IVERSEN, C.; FORSYTHE, S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, p. 443-454, 2003.

IVERSEN, C.; FORSYTHE, S. J. Comparison of media for the isolation of *Enterobacter sakazakii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, (1), p. 48-52, 2007.

IVERSEN, C.; LANE, M.; FORSYTHE, S. J. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 378-382, 2004.

IVERSEN, C.; MULLANE, N.; MCCARDELL, B. D.; TALL, B.; LEHNER, A.; FANNING, S.; STEPHAN, R.; JOOSTEN, H. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *Dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p.1442-1447, 2008.

JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiology Reviews**, v. 39 (2), p. 171-200, 1995.

JAIN, A.; ROY, I.; GUPTA, M. K.; KUMAR, M.; AGARWAL, S. K. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing gram-negative bacteria in septicaemic neonates in a tertiary care hospital. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 421-5, 2003.

KALLIOMÄKI, M.; KIRJAVAINEN, P.; EEROLA, E.; KERO, P.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.107, p.129-34, 2001.

KALLIOMÄKI, M.; SALMINEN, S.; POUSSA, T.; ARVILOMMI, H.; ISOLAURI, E. Probiotics and prevention of atopic disease:4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 361, p. 1869-1871, 2003.

KALLIOMÄKI, M.; SALMINEN, S.; POUSSA, T.; ISOLAURI, E. Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**; v.1, p. 19-1021, 2007.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiological Review**, Amsterdam, v. 12, n. 1-3, p. 39-85, 1993.

LAI, K. K. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children and adults. **Medicine**, v. 80, p.113-122, 2001.

LIN, H. C.; SU, B. H.; CHEN, A. C.; LIN, T. W.; TSAI, C. H.; YEH, T. F.; OH, W. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. **Pediatrics**, v. 115, p.1-4, 2005.

MASTRETTA, E.; LONG, P.; LACCISAGLIA, A.; BALBO, L.; RUSSO, R. *Lactobacillus* GG and breast feeding in the prevention of rotavirus nosocomial infection. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 35, p. 527-531, 2002.

MELO, N. R.; SOARES, F. F. S.; GONÇALVES, M. P. J. C. Nisina um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**, v. 52, n. 303, p. 921-938, 2005.

MICHAIL, S.; ABERNATHY, F. *Lactobacillus plantarum* reduces the in vitro secretory response of intestinal epithelial cells to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 35, p. 350-355, 2002.

MOLL, G. N.; KONINGS, W. N.; DRIESSEN, A. J. M. Bacteriocins mechanism of membrane insertion and pore formation. **Antonie van Leeuwenhoek, Dordrecht**, v.76, p.185-198, 1999.

MORAIS, M. B.; JACOB, C. M. A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. **Jornal de Pediatria**, v. 82, p. 1-19, 2006.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food. Technology**, Preprint Serie, n. 320, 2008.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: norma aprovada**. 6. ed. M7-A6, v. 23, n. 2, 2003.

NAZAROWEC-WHITE, M.; FARBER, J. M. *Enterobacter sakazakii*: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 34, p. 103-113, 1997.

NEWMAN, L. J. How breast milk protects newborns: some of the molecules and cells in human milk actively help infants stave off infection. **Scientific American**, New York, v. 273, n. 6, p. 58-61, 1995.

NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G.; ASENSI, M. D.; MORAES, B. A.; RODRIGUES, D. P. Resistência antimicrobiana de coliformes isolados de leite humano ordenhado. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17 (3), p. 713-717, 2001.

OLIVEIRA, A. G.; SIQUEIRA, P. P.; ABREU, L. C. Cuidados nutricionais no recém-nascido de muito baixo peso. **Revista Brasileira de Crescimento Desenvolvimento Humano**, v.18, p.148-154, 2008.

OSAILI, T. M.; SHAKER, R. R.; AYYASH, M. M.; HOLLEY, R. A. Effect of B. breve on the growth of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant milk formula. **Journal of Food Safety**, v. 98, p. 34-46, 2008.

QUIGLEY, E. M. M. Functional significance of the bowel microflora in gastrointestinal health: proceedings of a roundtable discussion. **Supplement to the American Journal of Gastroenterology**, v. 95 (1), 2000.

PALCICH, G.; MORAES, G.; ARAGON-ALEGRO, C.; CASALE, L.; PAGOTTO, F. J.; FARBER, J. M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T. *Enterobacter sakazakii* in Dried Infant Formulas and Milk Kitchens of Maternity Wards in São Paulo, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 37-42, 2009.

PASSERON, T.; LACOUR, J. P.; FONTASW, E.; ORTONNE, J. P. Prebiotics and symbiotics: two promising approaches for the treatment of atopic dermatitis in children above 2 years. **Allergy**, v. 61, p. 431-437, 2006.

PENNA, F. J.; FILHO, L. A. P.; CALÇADO, A. C.; JUNIOR, H. R.; JACQUES, N. R. Bases experimentais e clínicas atuais para o emprego dos probióticos. **Journal of Pediatrics**, v. 76, p. 209-217, 2000. Suplemento 2.

PESSOA-SILVA, C. L.; HUGONNET, S.; PFISTER, R.; TOUVENEAU, S.; DHARAN, S.; POSFAY-BARBE, K.; PITTET, DIDIER. Reduction of health care-Associated Infection Risk in Neonates by Successful Hand Hygiene Promotion. **Pediatrics**, v. 120, n. 2, p. 382-390, 2007.

PODOLAK, P. K.; ZAYAS, J. F.; KASTNER, C. L.; FUNG, D. Y. C. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef by application of organic acids. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 370-373, 1996.

RICHTMANN, R. Controle de Infecção na UTI Neonatal. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE NEONATOLOGIA DO RIO DE JANEIRO, 4., 6-28 de agosto de 2005. **Anais...** Rio de Janeiro, 2005.

REESE, R. E.; BETTS, R. F.; GUMUSTOP, B. **Manual de antibióticos**. 3. ed. Tradução por Penildon Silva. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 2002. 720 p.

ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 396-402, 2000.

RODGERS, S. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures: a review. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 12, n. 8, p. 276-284, 2001.

RODRÍGUEZ, J. M.; MARTÍNEZ, M. I.; HORN, N.; DODD, H. M. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, p.101-116, 2003.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature, Reviews Immunology**, v. 9, 2009.

RUAS-MADIEDO, P.; GUEIMONDE, M.; REYES-GAVILA, C. G.; SALMINEN, S. Short Communication: Effect of Exopolysaccharide Isolated from "Viili" on the Adhesion of Probiotics and Pathogens to Intestinal Mucus. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p.b2355-2358, 2006.

SALMINEN, S.; OUWENHAND, A.C., ISOLAURI, E. Clinical application of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, 563-572, 1998.

SANTOS, E. F.; JACOBUCCI, H. B.; QUEIROZ, M. M.; DIAS, M. F. G. P. Alimentos funcionais. **Revista de Pesquisas Biológicas da UNIFEV**, n. 1, p. 13-19, 2006.

SCHANLER, R. J.; SCHULMAN, R. J.; LAU, C. Feeding strategies for premature infants: beneficial outcomes of feeding fortified human milk versus preterm formula. **Pediatrics**, v. 103, p.1150-7, 1999.

SCHULZ, D.; BONELLI, R. R.; BATISTA, C. R. V. Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp. para conservação e processamento de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 4, p. 403-411 , out./dez. 2005.

SEPP, E.; NAABER, P.; VOOR, T.; MIKELSAAR, M.; BJÖRKSTÉN, B. Development of intestinal microflora during the first month of life in Estonian and Swedish infants. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 12, p. 22-6, 2000.

SERVIN, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **Microbiology Reviews**, v. 28, p. 405-440, 2004.

SILVA, L. L.; SATAMFORD, T. L. M. Alimentos Probióticos: uma revisão. **Higiene Alimentar**, v.14 (68/69), p. 4150, 2000.

SKOVGAARD, N. New trends in emerging pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, p.17-224, 2007.

SZAJEWSKA, H. Probiotics and prebiotics in pediatrics: where are we now? **The Turkish Journal of Pediatrics**, v. 49, p. 231-244, 2007.

STOLL , B. J.; HANSEN, N.; FARANOFF, A. A.; LEMONS, J. A. *Enterobacter sakazakii* is rare cause of neonatal septicemia or meningites in VLBW infantsw. **Journal of Pediatrics**, v. 144, p. 821-23, 2004.

TAGG, J. R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 40, p. 722-756, 1976.

TAVARES, W. Grupo da vancomicina. In: TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 627-664.

TRABULSI, L. R.; SAMPAIO, M. M. S. C. **Os probióticos e a saúde infantil: a composição e Papel da Microflora intestinal na saúde e proteção do organismo**. São Paulo: Nestlé, 2000. (Fascículo 1).

UNITED STATES. Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service. **Proposed draft revision on the recommended international code of practice for food for infants and children**. Regulations and Policies. International Affairs. *Codex Alimentarius*. Report on the U.S. Delegate, 37th Session of *Codex Alimentarius* Committee on Food Hygiene Buenos Aires, Argentina, Mar, 14-19, cap. 4, 2005. Disponível em: <[http://www.fsis.usda.gov/regulations/Delegate Report 37CCFH/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/regulations/Delegate%20Report%2037CCFH/index.asp)>.

VAN ACKER, J.; DESMET, F.; MUYDERMANS, G.; BOUGATEF, A.; NAESSENS, A.; LAUWERS, S. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 293, 2001.

WALKER, W. A. Role of nutrients and bacterial colonization in the development of intestinal host defense. **Journal of Pediatric Gastroenterology Nutrition**, v. 30, p. S2-S7, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Sites, Food Safety. Microbial Risks. JEMRA, JEMRA Meetings. Joint FAO/WHO Workshop on *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula, Geneva, 2-5, February, 2004. [Http://www.who.int/foodsafety/micro/jemra/meetings/feb2004/en/](http://www.who.int/foodsafety/micro/jemra/meetings/feb2004/en/).

WORKMAN, S. N.; BEEN, F. E.; CRAWFORD, S. R.; LAVOIE, M. C. **Bacteriocin-like inhibitory substances from *Campylobacter* spp.** [S.l.:s.n.t.], 2008. v. 93.

YU, D. H.; HUNTER, C. J.; GUNER, Y. S.; CHOKSHI, N. K.; GRISHIN, A. V.; FORD, H. R. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) mediates *Enterobacter sakazakii* (ES) – induced apoptosis of Enterocytes. **Journal of Surgical Research**, v.114 (2), p. 204, 2008.

CAPÍTULO 1

PERFIL DE SENSIBILIDADE DE *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus gasserii* e *Cronobacter sakazakii* AOS PRINCIPAIS ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA (UTI) NEONATAL

1. INTRODUÇÃO

A crescente compreensão do papel da microbiota intestinal na saúde e na doença dos indivíduos tem aumentado o interesse no desenvolvimento de estratégias para manipular essa microbiota (ZIEMER; GINSON, 1998; SZAJEWSKA, 2007).

Após o parto o trato intestinal é colonizado após poucas horas por bactérias bífidas, habitantes normais da microbiota intestinal (PENNA; ROBERT, 2001). Essa população se mantém elevada durante o período de lactação e, em seguida, se reduz e estabiliza durante a fase adulta, finalmente diminuindo na terceira idade, possivelmente em resposta ao aumento de bactérias do grupo coliforme, de *Enterococcus* e de bactérias putrefativas (MITSUOKA, 1978).

Embora a população de bactérias bífidas seja considerada relativamente estável, ela é influenciada pela dieta, leite materno ou fórmulas infantis, por situações de estresse, pela administração de antibióticos, por

radioterapia e quimioterapia (MODLER, 1994). Entre os grupos de bactérias mais comuns isolados do trato intestinal humano, citam-se as enterobactérias, a exemplo de *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (NOVERR; HUFFNAGLE, 2004). A grande diversidade da microbiota intestinal humana pode ser explicada pela variedade de carboidratos fermentáveis disponíveis na dieta. Os principais produtos da fermentação são os ácidos graxos de cadeia curta, peróxido de hidrogênio e o gás dióxido de carbono. Esses metabólitos contribuem para antagonizar patógenos oportunistas que comumente causam infecção, principalmente em recém-nascidos (TURTON, DRUCKER, GANGULI, 1993; BLAUT; CLAVEL, 2007).

Dentre as várias enfermidades intestinais que acometem crianças, em especial recém-nascidos, as enterocolites etiológicamente ligadas a *C. sakazakii* tem preocupado de maneira especial a área pediátrica em função não só ao aspecto de morbidade e mortalidade, mas também devido à incerteza de seu habitat principal (IVERSEN; FORSYTHE, 2003), o que tem desafiado não só os profissionais diretamente ligados à área da saúde, como médicos e nutricionistas, mas também os ligados à microbiologia de processos, à tecnologia, processamento e produção de alimentos.

Cronobacter sakazakii é um bacilo Gram-negativo, móvel, não esporogênico, anaeróbio fermentativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae* e apenas raramente causa infecções em humanos. As infecções, na maioria dos casos, encontram-se associadas ao uso de Fórmulas Infantis Desidratadas (FIPs) em crianças internadas em ambiente hospitalar (DRUDY et al., 2006; SKOVGAARD, 2007).

O leite humano contém fatores bifidogênicos requeridos para a manutenção das bactérias bífidas no cólon, ao passo que as FIPs em geral não os contêm. Observa-se também que, enquanto o indivíduo se mantém saudável, os números de lactobacilos no intestino delgado e das bactérias bífidas no intestino grosso são relativamente estáveis. Todavia, em caso de diarreias, alergias, e durante antibioticoterapia, ocorre indesejável redução da presença de representantes destes organismos. Assim, a alta prevalência de espécies dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, em detrimento a

outros, são considerados indicadores de adequado equilíbrio da microbiota intestinal (KALLIOMÄKI; ISOLAURI, 2004).

Quando desbalanceada, a microbiota intestinal pode ser recuperada pela ingestão de probióticos, células microbianas viáveis e benéficas para o ecossistema intestinal (FULLER, 1992).

Segundo Leroy, Verluyten, Vuyst (2006) e Ammor e Mayo (2007), os probióticos necessitam ser ingeridos em quantidades suficientes para exercerem efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro. Ao consumo de probióticos estão associados vários efeitos benéficos, como o melhor trânsito intestinal dos alimentos, facilitando a digestão, o alívio dos sintomas de intolerância à lactose, o aumento da resposta imune, a redução dos episódios de diarreia, a prevenção ou supressão de câncer de cólon, bem como a redução do colesterol sanguíneo (HEENAN, ADAMS, HOSKEN, 2002), e a redução de infecção (SHIMIZU et al., 2002).

Esse aumento de resistência aos antimicrobianos apresenta-se hoje como um sério problema do ponto de vista clínico e de saúde pública mundial (BAYRAM; BALCI, 2006; JONES, 1997). Além disso, os protocolos clássicos de antibioticoterapia acarretam danos à homeostase saudável da microbiota intestinal, por não eliminarem apenas o patógeno alvo, mas também a microbiota desejável, o que por sua vez induz o aparecimento de micro-organismos indesejáveis resistentes (GEWOLB et al., 1999).

Diante dessa problemática, os probióticos consolidam-se como elementos que podem reduzir a necessidade, dose e tempo de antibioticoterapia, ao mesmo tempo em que mitigam os efeitos colaterais causados pelo tratamento, repondo a microbiota desejada. De forma mais ampla, podem contribuir decisivamente para mitigar os correntes problemas de saúde pública mundial que afligem a antibioticoterapia clássica. Este trabalho teve como objetivo examinar os perfis de resistência *in vitro* de dois micro-organismos probióticos e do patógeno *C. sakazakii* a antibióticos comumente utilizados em tratamento neonatal intensivo.

2. TESTE DA PRIMEIRA HIPÓTESE EXPERIMENTAL (I)¹

- I) ***Cronobacter sakazakii* apresenta-se resistente à maioria dos antibióticos tipicamente utilizados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) neonatal.**

Para teste da hipótese acima, perseguiram-se os seguintes objetivos:

- Avaliar a sensibilidade de *C. sakazakii* aos antibióticos mais comumente utilizados em UTI neonatal no Brasil;
- Avaliar a sensibilidade dos micro-organismos probióticos *Lactobacillus gasseri* e *Bifidobacterium* spp. aos antibióticos mais comumente utilizados em UTI neonatal no Brasil, para obter informação acerca da eficácia e segurança do uso desses probióticos como adjuntos terapêuticos

¹ Para maiores informações, vide Introdução, item 2.2, página 22.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nos Laboratórios de Culturas Lácticas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e no Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), ambos na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

3.1. Origem e manutenção dos micro-organismos

Foram estudadas três estirpes de *Bifidobacterium* spp., obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC: Rockville, Maryland, USA), *B. breve* ATCC 15700, *B. longum* ATCC 15708 e *B. bifidum* ATCC 29521; sete estirpes de *Lactobacillus gasseri* (*L. gasseri*) depositadas no Banco de Cultura do Laboratório de culturas lácticas do DTA/UFV, (*L. gasseri* 02, *L. gasseri* 10, *L. gasseri* 18, *L. gasseri* 22, *L. gasseri* 24, *L. gasseri* 32 e *L. gasseri* 35), isoladas de crianças amamentadas exclusivamente ao seio e sem uso de antibióticos ou outros medicamentos. Uma cultura de *Cronobacter sakazakii* ATCC 0015 foi adquirida na Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, MG), e duas outras, oriundas primariamente do *Center for Disease Control* (CDC 7006 e CDC 7008), foram adquiridas da coleção do Instituto Adolfo Lutz (IAL, São Paulo, SP), sendo denominadas, respectivamente, IAL 0138 e IAL 0139. A experimentação contemplou ainda cinco estirpes de *C. sakazakii* isoladas em hospital de Belo Horizonte, MG,

sendo três de origem ambiental (duas provenientes do enxágue de bicos e uma de enxágue de mamadeira) e duas isoladas de leite em pó integral, tendo sido então denominadas FUN 139, FUN 140, FUN 149, FUN 154 e FUN 157.

Os isolados foram mantidos sob congelamento a - 80 °C no Banco de Culturas do Laboratório de Culturas Láticas, Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO) em caldo MRS (De Mann, Rogosa e Sharpe, Difco/Beckton Dickinson) previamente modificado (ágar 0,075 %, carbonato de sódio 0,02 % e cloreto de cálcio di-hidratado 0,01 % (w/v) e 1 % (v/v) de solução 0,05 % (w/v) de L cisteína.HCl), e adicionado de 20 % (v/v) de glicerol para *Bifidobacterium* spp.; em caldo MRS previamente adicionado de glicerol 20 % (v/v) para *L. gasseri*; e Brain Heart Infusion, Michigan, EUA (BHI) acrescido de solução de glicerol (20% v/v) para *C. sakazakii*.

3.2. Ativação dos isolados de *Lactobacillus gasseri*

Antes de cada avaliação, as estirpes de *L. gasseri* foram inoculadas 1 % (v/v) por três vezes consecutivas em caldo MRS e incubadas a 37 °C, por 18 a 24 h.

3.3. Ativação das estirpes de *Bifidobacterium* spp.

Antes de cada avaliação, as culturas de *B. breve*, *B. longum* e *B. bifidum* foram inoculadas 1 % (v/v) por três vezes consecutivas em caldo MRS modificado, e incubadas a 37 °C, por 18-24 h. A solução de cisteína 0,05 % (w/v) foi esterilizada separadamente utilizando-se membrana Millipore 0,22 µm (Millipore Corporation, Medford, MA, EUA) e adicionada asépticamente ao caldo MRS modificado e esterilizado. As culturas foram incubadas anaerobicamente a 37 °C, por 18 - 24 h. (Millipore Corporation, Medford, MA, EUA)

3.4. Ativação das estirpes de *Cronobacter sakazakii*

Antes de cada avaliação as culturas do patógeno foram repicadas com auxílio de uma alça de platina, por três vezes consecutivas, em caldo BHI e incubadas a 37 °C, por 18 a 24 h.

3.5. Teste de sensibilidade aos antibióticos

A sensibilidade das estirpes aos antibióticos foi realizada pelo método de discos impregnados (Sensidisc DME[®] (Araçatuba, São Paulo, Brasil) (BAUER et al., 1966; CLSI, 2007) com os seguintes antibióticos: ceftriaxona (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), meropenem (10 µg), oxacilina (1 µg), penicilina G (10 µg), sulfonamidas (300 µg), vancomicina (30 µg), ampicilina (10 µg), amoxicilina (10 µg), ampicilina (10 µg) mcg, cefalexina (30 µg), cefalotina (30 µg).

Alíquotas de 0,1 mL de culturas previamente ativadas (com aproximadamente 10⁸ UFC/mL) foram distribuídas em placas de Petri, contendo previamente 20 mL de ágar MRS modificado para *Bifidobacterium* spp., MRS para *L. gasseri* e ágar Mueller-Hinton (MHA) para *C. sakazakii*, empregando-se a técnica de espalhamento superficial do inóculo. Após três minutos, os discos de antibióticos foram fixados com auxílio de uma pinça estéril. Após permanência em temperatura ambiente para fixação dos discos ao ágar (BAUER, 1966), as placas foram incubadas a 37 °C em aerobiose para *C. sakazakii* por 18 a 24 h; para *L. gasseri* e *Bifidobacterium* spp., as placas foram incubadas em dispositivos anaeróbicos (GasPak, BBL), empregando-se geradores de CO₂ e H₂ (Anaerobac, Probac) por 48 h a 37 °C.

Os diâmetros das zonas de inibição, foram medidos com o auxílio de uma régua milimétrica, e a sensibilidade foi verificada conforme normas NCCLS M7-A6.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Perfil de sensibilidade a antibióticos

Na Figura 1 e 2, encontram-se, respectivamente, a frequência e a sensibilidade aos antibióticos testados para as estirpes de *Lactobacillus gasseri* isoladas do trato intestinal de crianças alimentadas ao seio materno e sem uso de antibióticos e de estirpes de *Bifidobacterium* spp.

Ao avaliar a sensibilidade das estirpes de *L. gasseri* frente ao grupo de antibióticos β – lactâmicos, do grupo das penicilinas, houve resistência de todas as estirpes ao antibiótico oxacilina, ao passo que todas foram sensíveis aos antibióticos penicilina, amoxicilina e ampicilina. A sensibilidade do probiótico *L. gasseri* a esse grupo de antibióticos reforça trabalhos anteriores, que indicaram a eficácia desses antibióticos sobre bactérias Gram-positivas (REESE; BETTS; GUMUSTOP, 2002).

A resistência apresentada frente a oxacilina deve ser avaliada com cautela, pois sugere uma situação indesejável, uma vez que a estirpe resistente de *L. gasseri* pode carrear genes de resistência a antibióticos e translocá-los, ou induzir sua translocação, para micro-organismos patogênicos originalmente sensíveis, tornando-os apenas parcialmente sensíveis ou mesmo resistentes (SAARELA, 2000; DECAMP; MORYART, 2006; ALTERTHUM, 2008).

Esse fenômeno deve ser avaliado com cuidado, pois acreditava-se equivocadamente que plasmídios não seriam transferidos naturalmente de uma bactéria Gram-negativa para uma bactéria Gram-positiva. Contudo, em 1988, Trieu-Cuot e colaboradores demonstraram a transferência de genes de *E. coli* para vários micro-organismos Gram-positivos, incluindo *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* e *S. aureus* (UETANABARO; ARISTÓTELES GÓES-NETO, 2006). Estudos adicionais são necessários para elucidar os *loci* de codificação genética das culturas probióticas aqui avaliadas.

Todas as estirpes testadas de *Bifidobacterium* spp. foram sensíveis aos antibióticos do grupo das penicilinas (penicilina, oxacilina e Amoxicilina), sendo que apenas 33 % das estipes foram resistentes a Ampicilina (Figura 2).

Os resultados para β -lactâmicos cefalosporínicos de primeira geração demonstram a mesma sensibilidade aos antibióticos cefalexina e cefalotina para a maioria (85,7 %) das estipes de *L. gasseri* avaliadas. Esses dois antibióticos atuam com maior eficácia sobre bactérias Gram-positivas, apresentando menor atividade contra bactérias Gram-negativas (REESE; BETTS; GUMUSTOP, 2002). Com relação à ceftriaxona, antibiótico cefalosporínico de terceira geração, verifica-se porcentagens iguais de micro-organismos resistentes e sensíveis (42,8 %) (Figura 1). Segundo Reese; Betts; Gumustop (2002), a ceftriaxona é menos efetiva contra bactérias Gram-positivas que as contrapartes de primeira geração, mas são as mais eficazes contra bactérias Gram-negativas em comparação com os antibióticos cefalosporínicos de primeira e segunda gerações.

Na Figura 2 encontram-se os resultados de sensibilidade de estirpes de *Bifidobacterium* spp. aos β -lactâmicos cefalosporínicos, notando-se que todas as estirpes desses micro-organismos foram sensíveis à cefalexina e à cefalotina (85,9 %), e 66,6 % são sensíveis à ceftriaxona.

Todos os *L. gasseri* testados foram sensíveis ao meropenem, pertencente ao grupo dos β -lactâmicos carbapenêmicos (Figura 1). De acordo com *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003), antibióticos desse grupo apresentam alta resistência à hidrólise pela enzima β -lactamase, o que confere amplo espectro de ação tanto para

bactérias Gram-positivas quanto para bactérias Gram-negativas. Das estirpes de *Bifidobacterium* spp. (66,6 %) apresentaram sensibilidade ao meropenem (Figura 2).

De forma geral, *L. gasseri* apresentou resistência a amicacina e a gentamicina 100 % e 85,7 % das estirpes testadas, respectivamente (Figura 1). As estirpes de *Bifidobacterium* spp. também apresentaram resistência à amicacina, mas todos foram sensíveis à gentamicina (Figura 2). Excetuando-se a sensibilidade de *Bifidobacterium* spp. à gentamicina, a resistência observada em ambos os organismos a esses antimicrobianos, pertencentes ao grupo dos aminoglicosídeos, está alinhada com sua atuação preferencial sobre organismos Gram-negativos aeróbios (NCCLS, 2003).

Entre os macrolídeos, a eritromicina apresentou resistência por 57,2% dos *L. gasseri* (Figura 1) testados e por todas as estirpes de *Bifidobacterium* spp. (Figura 2). Antibióticos desse grupo são utilizados para tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Em estudos realizados por Jatobá et al. (2008), os valores de sensibilidade à eritromicina para as espécies de *Lactobacillus* isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nilo, para utilização como probióticos, apresentaram resultados similares ao das estirpes de *L. gasseri* empregadas neste estudo.

A vancomicina, do grupo dos glicopeptídeos, foi eficaz contra todos os *L. gasseri* testados (Figura 1); o mesmo ocorrendo para *Bifidobacterium* spp. (Figura 2). Segundo a NCCLS (2003), a atividade desse potente grupo de agentes antimicrobianos é dirigida às bactérias Gram-positivas, justificando-se a alta sensibilidade apresentada nos ensaios.

A sensibilidade à vancomicina representa resultado particularmente interessante, pois o amplo uso desse antibiótico gerou casos de microorganismos, como *Lactobacillus* sp. e *Staphylococcus haemolyticus*, resistentes a esse antibiótico (SCHWALBE; STAPLETON; GILLIGAN, 1987; HANDWERGER et al., 1990).

Mesmo se nesse estudo houvesse alta frequência de resistência ao antibiótico Vancomicina, ainda assim, atenção especial deveria ser dada ao fato de a resistência à vancomicina verificada em várias estirpes de *Lactobacillus* ser uma característica constitutiva, codificada cromossomicamente e, portanto, não transferível (SWENSON; FACKLAM;

THOTNSBERRY, 1990). Vancomicina, um glicopeptídeo, é um antibiótico que tem sido utilizado para tratamentos de infecções causadas por bactérias Gram-positivas, particularmente aquelas provocadas por estafilococos e enterococos. É também uma opção para tratamento de diarreia pseudomembranosa, causada por *Clostridium difficile*, situação em que o metronidazol não é eficaz para o tratamento. A vancomicina adere à estrutura de precursor do peptidoglicano, o peptídeoglicano D-alanil-D-alanina (D-Ala-D-Ala), o que inibe a síntese da parede celular. No entanto, estirpes de *Enterococcus* sp. apresentam-se atualmente resistentes a esse antibiótico, e a primeira publicação sobre resistência de enterococos a esse antibiótico surgiu em 1986, o que causa, desde então, grande impacto terapêutico (LECLERCQ et al., 1988). Essas evidências remetem à importância do consumo de probióticos contendo *Lactobacillus*, no caso particular das crianças.

A maioria (71,4 %) dos *L. gasseri* apresentou resistência às sulfonamidas (Figura 1), ao passo que todas as estirpes de *Bifidobacterium* spp. foram sensíveis (Figura 2). Esses antibióticos são inibidores competitivos da enzima bacteriana di-hidropteroato sintetase, requerida para a síntese de folato a partir de ácido p-aminobenzóico (PABA). Como resultado da inibição competitiva pelas sulfonamidas, cessa a produção de folato, necessário à produção de ácidos nucleicos, o que impede a divisão celular. Como células eucarióticas frequentemente satisfazem seu requerimento de ácido fólico a partir da dieta, nelas não existe produção de di-hidropteroato sintetase, tornando-as indiferentes às sulfonamidas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

Ao avaliar a sensibilidade dos organismos probióticos à ciprofloxacina, pertencente ao grupo das quinolonas, todas as estirpes de *L. gasseri* foram resistentes (Figura 1), o que contrastou com as estirpes de *Bifidobacterium* spp., as quais foram todas sensíveis (Figura 2).

A Figura 3 lista os dados de sensibilidade de estirpes de *C. sakazakii* frente aos antimicrobianos mais utilizados em UTI neonatal no Brasil.

Ao avaliar a sensibilidade de *C. sakazakii* aos antibióticos recomendados para tratamento de infecções por Gram-negativos aeróbios, o patógeno apresentou sensibilidade (100 % das estirpes) ao meropenem,

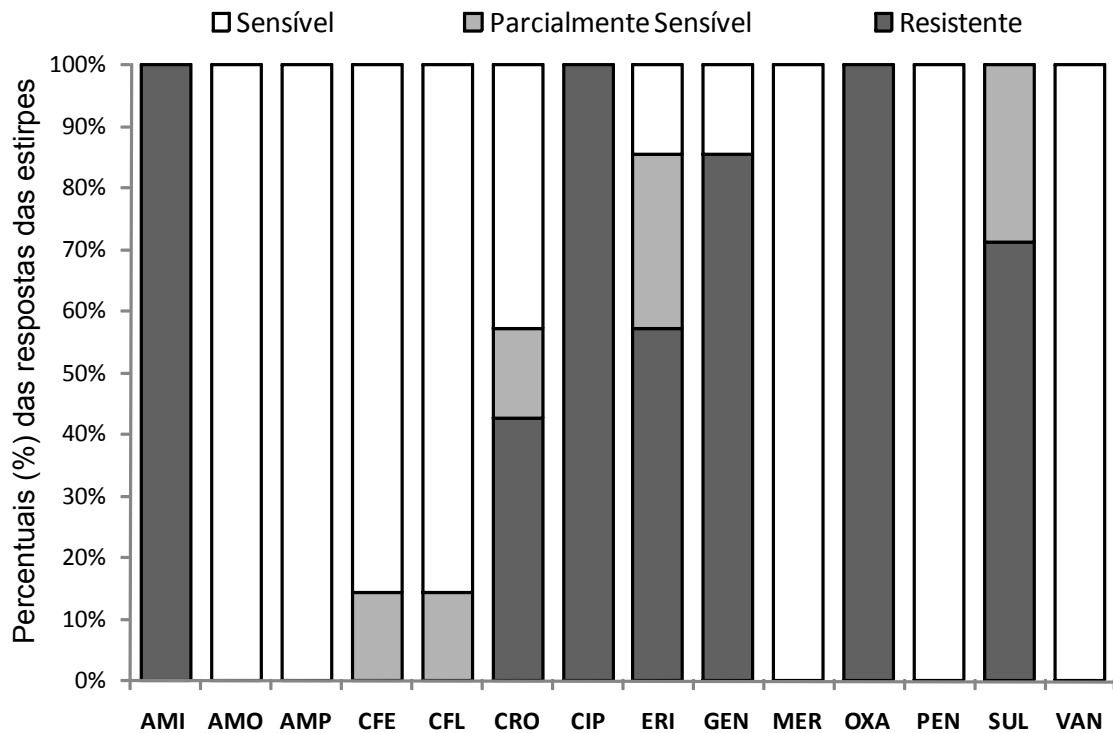
pequena frequência de resistência (12,5 %) à amicacina e 40 % de resistentes à gentamicina. Entretanto, Novak et al. (2001) reportaram sensibilidade à amicacina e à gentamicina para todos os isolados de *C. sakazakii* a partir de amostras de leite de Banco de Leite Humano (BLH). Não obstante, estudos mais recentes de Kobayashi; Sadoyama e Vieira, (2009), ao avaliarem a sensibilidade de estirpes de *Enterobacter* spp. a vários antibióticos, determinaram que a resistência à amicacina e à gentamicina foi de 40 % e 52 %, respectivamente. Coletivamente, os dados indicaram um possível e plausível aumento da resistência a antimicrobianos.

Pequena parte das estirpes testadas de *C. sakazakii* (12,5 %) apresentou resistência a amoxicilina e ampicilina (Figura 3). Novak et al. (2001) constataram a presença de resistência de todas as estirpes de *C. sakazakii* perante a ampicilina. Os resultados para ciprofloxacina, neste estudo, corroboram os resultados encontrados por Novak et al. (2001). Observou-se que a amoxicilina e ampicilina apresentaram eficácia sobre a maioria (87,5%) dos micro-organismos avaliados. Contudo, como observado em vários estudos, a resistência a antimicrobianos vem aumentando desde a década de 1960, e esse aumento ocorre mais rapidamente do que a capacidade da indústria de desenvolver novos medicamentos (BROCK; MADIGAN; MARTINKO, 1994; SOUZA, 1998). A resistência bacteriana a antibióticos é um sério e desafiante problema do ponto de vista clínico e de saúde pública. Mediante essa problemática, pesquisas devem ser incentivadas com o intuito de criar alternativas que minimizem essa resistência ou que sirvam de adjuntos no tratamento de infecções.

Ao avaliar sulfonamidas, cefalotina e ceftriaxona, observou-se que esses antibióticos não são eficazes contra as estirpes selecionadas para vários estudos. Esse fato é preocupante, pois teoricamente esses antimicrobianos deveriam ser eficazes, uma vez que são utilizados no combate a infecções causadas por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, em especial a Cefalotina, que apresentam maior eficácia contra bactérias Gram-negativas (REESE; BETTS; GUMUSTOP, 2002). Os resultados deste estudo corroboram os achados por Neu (1992), que evidenciaram resistência em vários patógenos oportunistas, bem como se

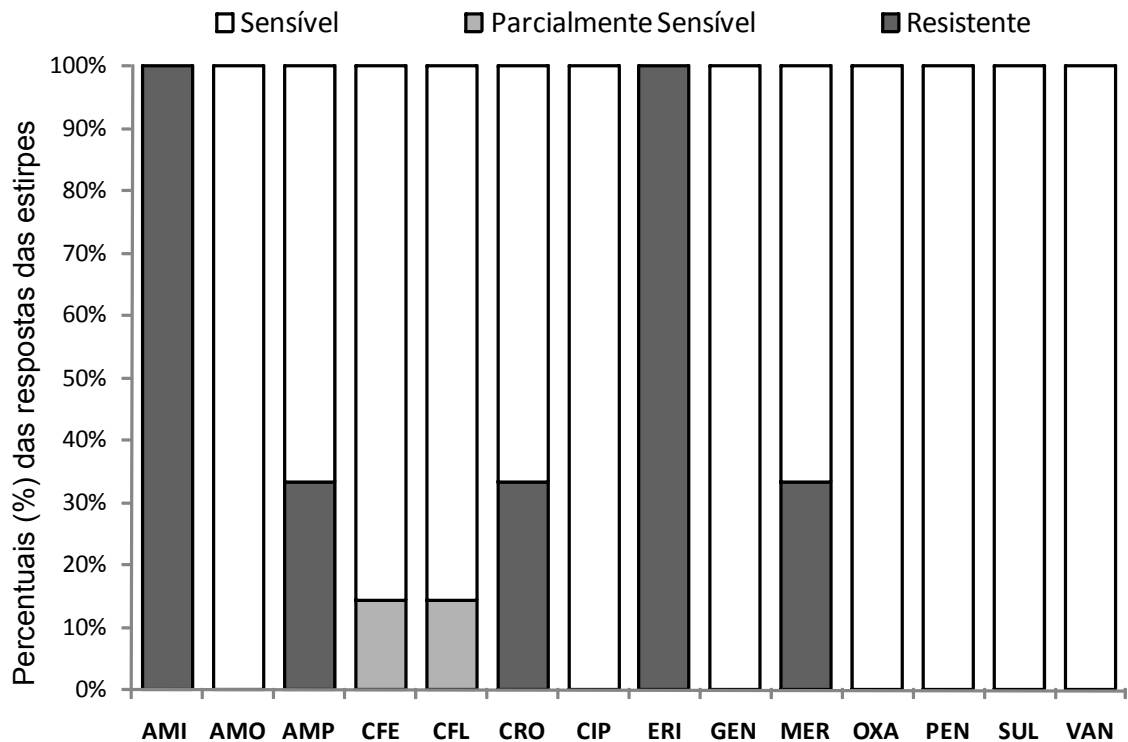
alinham aos resultados de Novak et al. (2001), ao avaliarem a sensibilidade de estirpes de *C. sakazakii* a cefalotina.

Enquanto o uso generalizado de antibióticos pode resultar em micro-organismos cada vez mais resistentes, destruição da microbiota do trato digestório e comprometimento da saúde do hospedeiro associada à perturbação da homeostase microbiana desejável, Olivares et al. (2006) demonstraram que o consumo de produtos contendo combinação de *Lactobacillus gasseri* CECT 5714 e *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711 induziu aumento nas concentrações séricas de IgA e IgGm, bem como nas concentrações fecais de IgA, principal imunoglobulina envolvida na defesa das mucosas. O consumo de probióticos aumenta a proporção de células fagocitárias como monócitos e neutrófilos e, conseqüentemente, o processo fagocitário. Tendo em vista esses benefícios, contrastados com os problemas associados ao uso generalizado de antibióticos, pesquisas estão sendo realizadas com o intuito da utilização desses micro-organismos como adjunto, ou coadjuvante, no tratamento de infecções (MORAIS; JACOB, 2006) e da diarreia (HAWRELAK et al., 2005).



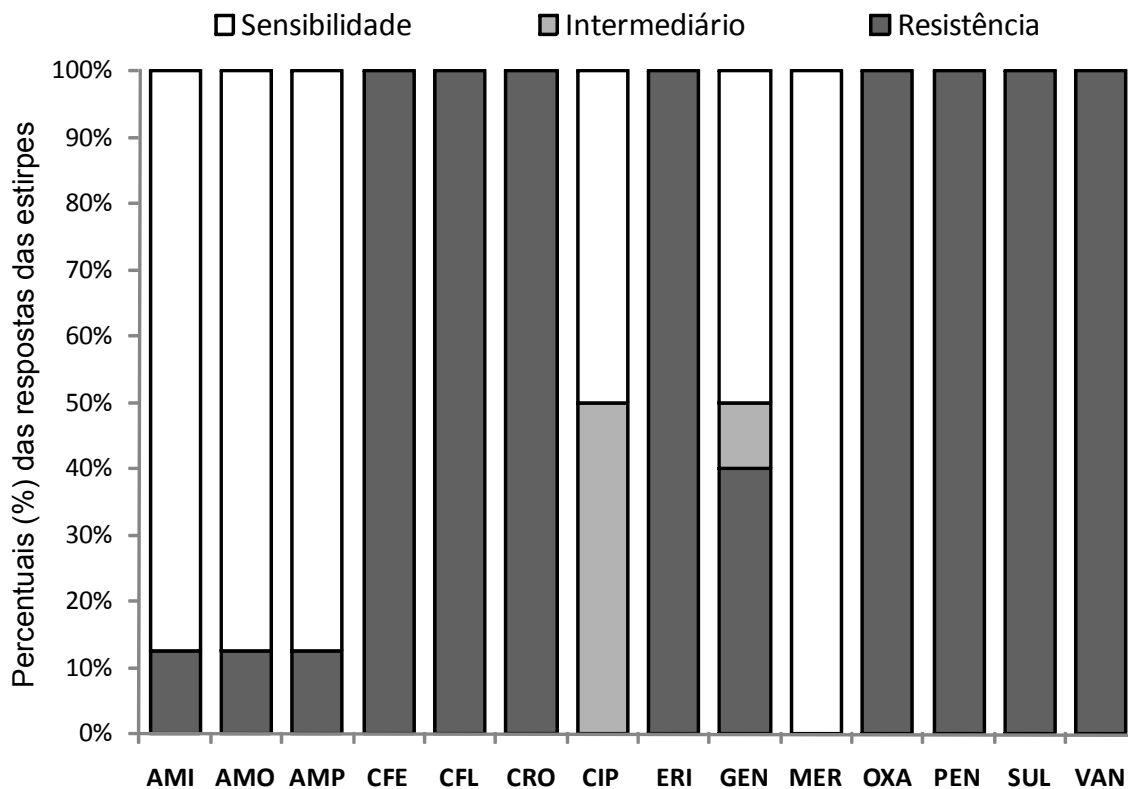
amicacina – AMI (30µg), gentamicina – GEN (10 µg), ampicilina – AMP (10 µg), oxacilina – OXA (01 µg), penicilina G – PEN (10 µg), amoxicilina – AMO (10 µg), vancomicina – VAN (30 µg), eritromicina – ERI (15 µg), meropenem – MER (10 µg), ciprofloxacina – CIP (5 µg), cefalexina – CFE (30 µg), cefalotina – CFL (30 µg), ceftriaxona – CRO (30 µg), sulfonamidas – SUL (300 µg).

Figura 1 – Perfil de sensibilidade de estirpes de *Lactobacillus gasseri* (n=7) aos antimicrobianos mais comumente utilizados em Unidade de Terapia Intensiva neonatal no Brasil.



amicacina – AMI (30 µg), gentamicina – GEN (10 µg), ampicilina – AMP (10 µg), oxacilina – OXA (01 µg), penicilina G – PEN (10 µg), amoxicilina – AMO (10 µg), vancomicina – VAN (30 µg), eritromicina – ERI (15 µg), meropenem – MER (10 µg), ciprofloxacina – CIP (5 µg), cefalexina – CFE (30 µg), cefalotina – CFL (30 µg), ceftriaxona – CRO (30 µg), sulfonamidas – SUL (300 µg).

Figura 2 – Perfil de sensibilidade de estirpes de *Bifidobacterium* spp. (n=3) aos antimicrobianos mais comumente utilizados em Unidade de Terapia Intensiva neonatal no Brasil.



amicacina – AMI (30 µg), gentamicina – GEN (10 µg), ampicilina – AMP (10 µg), oxacilina – OXA (01 µg), penicilina G – PEN (10 µg), amoxicilina – AMO (10 µg), vancomicina – VAN (30 µg), eritromicina – ERI (15 µg), meropenem – MER (10 µg), ciprofloxacina – CIP (5 µg), cefalexina – CFE (30 µg), cefalotina – CFL (30 µg), e ceftriaxona – CRO (30 µg), sulfonamidas – SUL (300 µg).

Figura 3 – Perfil de sensibilidade de estirpes (n=8) de *Cronobacter sakazakii* aos antimicrobianos mais comumente utilizados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal no Brasil.

5. CONCLUSÃO

A resistência bacteriana a antibióticos é um sério problema do ponto de vista clínico e de saúde pública que deve ser avaliado com critério. Mediante essa problemática, pesquisas devem ser incentivadas com o intuito de criar alternativas que minimizem essa resistência, ou que sirvam de adjuntos no tratamento de infecções.

REFERÊNCIAS

AMMOR, M.; MAYO, B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. **Meat Science**, v. 76, p. 138-146, 2007.

ALTERTHUM, F. Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Org.). **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2008. v. 1, p. 67-84.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-6, 1966.

BAYRAM, A.; BALCI, I. Patterns of antimicrobial resistance in a surgical intensive care unit of a university hospital in Turkey. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, p. 1-6, 2006.

BLAUT, M.; CLAVEL, T. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. **The Journal of Nutrition**, v.137, p. 751S-755S, 2007.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. S. Biology of Microorganisms. 17th Ed. Englewood Cliffs: **Prentice Hall**, 1994.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing**, Tables M100 - S17, 2007.

DECAMP, O.; MORIARTY, D. J. W. P. A segurança dos probióticos para a aquicultura. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, v. 8, n.2, p. 40-41, 2006.

DRUDY, D.; MULLANE, N.R.; QUINN, T.; WALL, P.G; FANNING, S. *Enterobacter sakazakii*: an emerging pathogen in powdered infant formula. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p. 996-1002, 2006.

FULLER, R. Probiotics, the Science basis. ed. London: Chapman & Hall, 1992.

GEWOLB, L.H.; SCHWLB, R.S.; TACIAK, V.L.; HARRISON, T.S.; PANIIGGRAHI, P. Stool microflora in extremely low birth infants. **Archives of Disease in Child Fetal Neonatal**, v. 80, p. 167-73, 1999.

HANDWERGER, S.; HOROWITZ, H.; COBURN, K.; KOLOKATHIS, A.; WORMSER, G. P. Infection due to leuconostoc species: six cases and review. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 12, p. 602-10, 1990.

HAWRELAK, J. A.; WHITTEN, D. L.; MYERS, S. P. Is *Lactobacillus rhamnosus* GG effective in preventing the onset of antibiotic-associated diarrhoea: a systematic review. **Digestion**, v. 51-56, 2005.

HEENAN, C. N.; ADAMS, M. C.; HOSKEN, R. W. Growth medium for culturing Probiotics bacteria for applications in vegetarian food products. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 35, p. 171-176, 2002.

IVERSEN, C.; FORSYTHE, S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. **Trends in Food Science & Technology**, 14, 443-454, 2003.

JATOBÁ, A.; VIEIRA, F. N.; NETO, C. B.; SILVA, B. C.; MOURIÑO, J. L. P.; JERÔNIMO, G. T.; DOTTA, G.; MARTINS, M. L. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilapia-do-nylo como probiótico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, 1201-1207, 2008.

JONES, R.N. Can antimicrobial activity be sustained? An appraisal of orally administered drugs used for respiratory tract infections. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.27, p. 21-28, 1997.

KALLIOMÄKI, N.A.; ISOLAURI, E. Probiotics and do to offwn regulation of the allergic response. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v.24, 739-52, 2004.

KOBAYASHI, C.C.B.A.; SADOYAMA, G.; VIEIRA, J.D.G. Avaliação da resistência antimicrobiana associada em isolados clínicos de *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. em um hospital público de Goiânia, GO – BRASIL. **Revista de Patologia Tropical**. v.38 (3), p.165-178, 2009.

LEROY, F.; VERLUYTEN, J.; VUYST, L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.270-285, 2006.

LECLERCQ, R.; DERLOT, E.; DUVAL, J.; COURVALIN; P. Plasmid mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. **The New England Journal of Medicine**, v. 319, p. 157-161, 1988.

MITSUOKA, T. Intestinal bacteria and health, Tokyo: Harcourt Brace Jovanovich, Japan, 1978. 208 p.

MODLER, H. W. Bifidogenics Factors – Sources, metabolism and Applications. **International Dairy Journal**, v. 4, p. 383-407, 1994.

MORAIS, M.B.; JACOB, C.M.A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. **Journal of Pediatrics**, v. 82, p. 1-19, 2006.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico**: norma aprovada. 6. ed. M7-A6, v. 23, n. 2, 2003.

NEU, H. C. The crisis in antibiotic resistance. **Science**, 257:1064-1073, 1992.

NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G.; ASENSI, M. D.; MORAES, B. A.; RODRIGUES, D. P. Resistência antimicrobiana de coliformes isolados de leite humano ordenhado. **Caderno de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v. 17, n. 3, p. 713-717, 2001.

NOVERR, M.C.; HUFFNAGLE, G.B. Does the microbiota regulate immune response outside the gut? **Trends in Microbiology**, v.12, p. 562-568, 2004.

OLIVARES, M.; DIAZ-ROPERO, M. P.; GOMEZ, N.; LARA-VILLOSLADA, F.; SIERRA, S.; MALDONADO, J. A.; MARTIN, R.; RODRIGUEZ, J. M.; XAUS, J. The consumption of two new probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT 5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, boosts the immune system of healthy humans. **International Microbiology**, v. 9, p. 47-52, 2006.

PENNA, F. J.; ROBERT, N. J. Influência do colostro na colonização bacteriana normal do trato digestivo do recém-nascido. **Jornal de Pediatria**, v.77(4), 2001.

REESE, R. E.; BETTS, R. F.; GUMUSTOP, B. **Manual de antibióticos**. 3. ed. Tradução por Penildon Silva. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 2002. 720 p.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; MATTO, J.; MATTILASANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v.84, p.197-215, 2000.

SCHWALBE, R.S., STAPLETON, J.T., GILLIGAN, P.H. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative *staphylococci*. **The New England Journal Medicine**; v.316, p.927-931, 1987.

SKOVGAARD, N. New trends in emerging pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, p.17-224, 2007.

SWENSON, J.M., FACKLAM, R.R.; THOTNSBERRY, C. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Lactobacillus* species. **Antimicrobiol. Agents Chemother.** 34, 543-549, 1990.
SOUZA, C. S. Uma guerra quase perdida. **Revista Ciência Hoje**, v. 23, n. 138, p. 27-35, 1998.

SZAJEWSKA, H. Probiotics and prebiotics in pediatrics: where are we now? **The Turkish Journal of Pediatrics** , v.49, p.231-244, 2007.

SHIMIZU, T.; HARUNA, H.; HISADA, K.; YAMASHIRO, Y. Effects of *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in children. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.50, p.611–618, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. Ed. Artes Médicas Sul, 6. Ed. Porto Alegre, 2000.

TURTON, L.J.; DRUCKER, D.B.; GANGULI, L.A. Effect of glucose concentration in growth medium upon neutral and acidic fermentation end-products of *Clostridium bifermentans*, *Clostridium sporogenes* and *Peptostreptococcus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 16, p. 61-67, 1993.

UETANABARO, A. P. T; GÓES-NETO, A. Segurança alimentar: transferência horizontal de genes e alimentos transgênicos. **Revista Sitientibus**, Feira de Santana, v.35, p.111-124, 2006.

ZIEMER, C.J., GINSON, G.R. An a overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives an future strategies. **International Dairy Journal**, 8, 473-479, 1998.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DE *Lactobacillus gasseri* E *Bifidobacterium* spp. SOBRE *Cronobacter sakazakii*

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Cronobacter* compreende seis espécies: *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonaticus*, *Cronobacter turincensis*, *Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter dublinensis* e *Cronobacter genomospecies*, e três subespécies *Cronobacter dublinenses* subsp. *dublinenses*, *Cronobacter dublinenses* subsp. *lausannensis* e *Cronobacter dublinenses* subsp. *lactaridi* (IVERSEN et al., 2008), que se encontram amplamente distribuídas na natureza. Entretanto, o patógeno *C. sakazakii* é isolado especialmente de Fórmulas Infantis em Pó (FIPs) (CDC, 2001). Ainda que a incidência de infecções por *C. sakazakii* seja considerada baixa (valor esperado de 1 em cada 10.660 recém-nascidos de baixo peso) (STOLL et al., 2004), a mortalidade tende a ser alta, varia entre de 20 a 80 % (FARBER, 2004), e os sobreviventes apresentam alteração no sistema nervoso central, podendo desenvolver sequelas severas e permanentes (BARREIRA et al., 2003). Contudo, permanece ainda pouco claro se a maior incidência de infecção de neonatos pelo patógeno é associada à virulência intrínseca do agente, ou se é resultado da oportunidade para colonizar indivíduos dessa faixa etária (ERICKSON; KORNACKI, 2002).

Estudos têm empregado micro-organismos competitivos para reduzir o crescimento de bactérias patogênicas (WALLS; BUCHANAN, 2005). Várias espécies de bactérias lácticas, entre os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, têm apresentado antagonismo a outras bactérias, incluindo as do mesmo gênero e patógenos importantes (DRIDER et al., 2006), tendo sido assim utilizadas há algum tempo como probióticos (FERREIRA, 2003).

Os mecanismos de atividade inibitória por bactérias lácticas têm sido investigados (SERVIN, 2004), e incluem competição pelo sítio de adesão, competição por nutrientes, diminuição do potencial redutor, produção de ácido láctico e de ácido acético, com redução do pH e acarretando efeitos tóxicos associado ao ânion, produção de compostos como peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, além da produção de bacteriocinas (FOOKS; GIBSON, 2002; MATSUMOTO et al., 2005; PANT et al., 2007), que são peptídios antimicrobianos, ribossomicamente sintetizados, e secretados por bactérias (KAISER; MONTVILLE, 1993; NES; EIJSINK, 1999; CINTAS et al., 1997).

Estudos revelaram que em alguns casos há maior produção de bacteriocina em meio sólido que em meio líquido (GROSS; VIDAVER, 1979; HIRSH, 1979). A não detecção de antagonismo não necessariamente remete à ausência de antagonismo, e possivelmente há falta de um fator indutor que possa ser o contato célula a célula (TOURÉ, 2003).

2. TESTE DA SEGUNDA (II), TERCEIRA (III) E QUARTA (IV) HIPÓTESES EXPERIMENTAIS²

II) *Lactobacillus gasseri* isolado de crianças recém-nascidas e *Bifidobacterium* spp. antagonizam *Cronobacter sakazakii*.

A hipótese foi testada segundo os seguintes objetivos:

- Avaliar a antagonismo, e as condições conducentes ao antagonismo, de estipes de *Bifidobacterium* spp. e *L. gasseri* sobre estirpes de *C. sakazakii*.
- Comparar o antagonismo de *Bifidobacterium* spp. e *L. gasseri*, sobre o patógeno. Exame da possível influência de ácidos orgânicos no antagonismo eventualmente observado para os organismos probióticos.

III) O antagonismo de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus gasseri* sobre o patógeno *C. sakazakii* depende principalmente de metabólitos das bactérias bífidas e de *L. gasseri* secretados no meio, ocorrendo mesmo na ausência das células produtoras desses micro-organismos.

Para teste da hipótese acima, perseguiram-se os seguintes objetivos:

² Para maiores informações, vide Introdução, item 2.2, página 22.

- Determinar a fase de crescimento de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus gasseri* associada a produção ótima dos metabólitos antagonistas;
- Determinar eventuais especificidades para as estirpes de *Bifidobacterium* spp. e *L. gasseri* no antagonismo de *C. sakazakii*;
- Determinar a influência da pasteurização sobre a ação dos metabólitos antagonistas bífidos e de *L. gasseri* sobre o patógeno.

IV) A natureza do inibidor é ácida/protéica, o que sugere a produção de bacteriocina

- Elucidar a composição química primária dos metabólitos antagonistas de *L. gasseri*. e de *Bifidobacterium* spp.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nos Laboratórios de Culturas Lácticas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e no Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), ambos na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

3.1. Origem e manutenção dos micro-organismos

Foram estudadas três estirpes de *Bifidobacterium* spp., obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC: Rockville, Maryland, USA), *B. breve* ATCC 15700, *B. longum* ATCC 15708 e *B. bifidum* ATCC 29521; sete estirpes de *Lactobacillus gasseri* (*L. gasseri*) depositadas no Banco de Cultura do Laboratório de culturas lácticas do DTA/UFV, (*L. gasseri* 02, *L. gasseri* 10, *L. gasseri* 18, *L. gasseri* 22, *L. gasseri* 24, *L. gasseri* 32 e *L. gasseri* 35), isoladas de crianças amamentadas exclusivamente ao seio e sem uso de antibióticos ou outros medicamentos. Uma cultura de *Cronobacter sakazakii* ATCC 0015 foi adquirida na Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, MG), e duas outras, oriundas primariamente do *Center for Disease Control* (CDC 7006 e CDC 7008), foram adquiridas da coleção do Instituto Adolfo Lutz (IAL, São Paulo, SP), sendo denominadas, respectivamente, IAL 0138 e IAL 0139. A experimentação contemplou ainda cinco estirpes de *C. sakazakii* isoladas em hospital de Belo Horizonte, MG,

sendo três de origem ambiental (duas provenientes do enxágue a de bicos e uma de enxágue de mamadeira) e duas isoladas de leite em pó integral, tendo sido então denominadas FUN 139, FUN 140, FUN 149, FUN 154 e FUN 157.

Os isolados foram mantidos sob congelamento a - 80 °C no Banco de Culturas do Laboratório de Culturas Láticas, Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO) em caldo MRS (De Mann, Rogosa e Sharpe, Difco/Beckton Dickinson) previamente modificado (ágar 0,075 %, carbonato de sódio 0,02 % e cloreto de cálcio di-hidratado 0,01 % (w/v) e 1 % (v/v) de solução 0,05 % (w/v) de L cisteína.HCl), e adicionado de 20 % (v/v) de glicerol para *Bifidobacterium* spp.; em caldo MRS previamente adicionado de glicerol 20 % (v/v) para *L. gasseri*; e Brain Heart Infusion, Michigan, EUA (BHI) acrescido de solução de glicerol (20% v/v) para *C. sakazakii*.

3.2. Ativação dos isolados de *Lactobacillus gasseri*

Antes de cada avaliação, as estirpes de *L. gasseri* foram inoculadas 1 % (v/v) por três vezes consecutivas em caldo MRS e incubadas a 37 °C, por 18 a 24 h.

3.3. Ativação das estirpes de *Bifidobacterium* spp.

Antes de cada avaliação, as culturas de *B. breve*, *B. longum* e *B. bifidum* foram inoculadas 1 % (v/v) por três vezes consecutivas em caldo MRS modificado, e incubadas a 37 °C, por 18-24 h. A solução de cisteína 0,05 % (w/v) foi esterilizada separadamente utilizando-se membrana Millipore 0,22 µm (Millipore Corporation, Medford, MA, EUA) e adicionada assepticamente ao caldo MRS modificado e esterilizado. As culturas foram incubadas anaerobicamente a 37 °C, por 18 - 24 h.

3.4. Ativação das estirpes de *Cronobacter sakazakii*

Antes de cada avaliação as culturas do patógeno foram repicadas com auxílio de uma alça de platina, por três vezes consecutivas, em caldo BHI e incubadas a 37 °C, por 18 a 24 h.

3.5. Teste de atividade antagonista em meio sólido

Foi utilizado o ensaio de toque em superfície sólida ("spot-on-lawnassay"), segundo Fleming, Etchells e Costilow et al. (1975), para exame da produção de antagonistas sobre o patógeno quando o produto é cultivado em meio sólido. Resumidamente, cultura ativa de bactérias probióticas (com aproximadamente 10^9 UFC/mL) foi aplicada em um toque sobre o centro de placas contendo ágar MRS 1,5 % (w/v) de ágar. As placas foram incubadas a 37 °C/48 h em jarras de anaerobiose (GasPak, BBL, Cockeysville, Maryland, EUA) contendo geradores de CO₂ e H₂ (Anaerobac, Probac, São Paulo, Brasil). Após a formação de colônias visíveis, foram vertidos sobre a placa 10 mL de ágar BHI semissólido (0,7% w/v ágar) previamente inoculado e uniformizado (45 °C) com aproximadamente 10^6 UFC/mL com cada estirpe de *C. sakazakii*. As placas foram, então, incubadas a 37 °C/ 18 a 24 h em aerobiose. A atividade antagonista foi verificada por meio da formação de zonas claras (halos) de inibição do patógeno ao redor da massa da zona de crescimento do organismo probiótico. Para excluir a possível inibição por mero efeito de redução de pH, o antagonismo foi testado também utilizando-se MRS previamente neutralizado com 2 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio (TOURÉ et al., 2003). O diâmetro dos halos de inibição foi medido com régua milimétrica.

3.6. Teste de atividade antagonista em meio líquido: uso de sobrenadantes livres de células

Cultura ativa de *L. gasseri*, ou de bactérias bífidas, foram preparadas na concentração de 1 % (v/v), em MRS ou MRS modificado, respectivamente. Depois do crescimento em diferentes intervalos de tempo (6 h, 12 h, 18 h e 24 h) a 37 °C em anaerobiose, 80 mL de cada cultura

foram utilizados para a produção de sobrenadantes livres de células, segundo Bonnet e Montville (2005), com adaptações. Assim, cada cultura foi centrifugada 5900 x g por 20 min a 4 °C (Beckman GS-6R, Beckman Instruments, Fullerton, CA, EUA). Após a centrifugação, os sobrenadantes foram esterilizados através de membrana filtrante 0,45 µm (Millipore Corporation, Medford, MA, EUA) e, subsequentemente, de 0,22 µm, e mantidos assepticamente sob refrigeração até o momento de uso. Para avaliar a termoestabilidade dos inibidores eventualmente produzidos, porções (40 ml) de cada sobrenadante livre de células foram submetidas à 121 °C por 15 min. Cada uma das oito estirpes de *C. sakazakii* receberam separadamente o tratamento com sobrenadante livre de células originado de cada bactéria probiótica segundo diferentes intervalos de incubação em meio líquido, segundo 8 (estirpes de *C. sakazakii*) x 5 (tratamentos e controle) x 7 (estirpes de *L. gasseri*) x 2 (esterilizado e sem esterilizar) = 560 combinações de tratamento para *Lactobacillus*; e 8 (estirpes de *C. sakazakii*) x 5 (tratamentos e controle) x 3 (estirpes de *Bifidobacterium*) x 2 (esterilizado/não-esterilizado) = 240 combinações de tratamento para *Bifidobacterium* spp. .Para o ensaio de difusão em placa, orifícios de 5 mm foram produzidos, com auxílio de cânulas plásticas estéreis, em placas contendo 20 mL de ágar de BHI previamente preparadas contendo aproximadamente 10⁶ UFC/ mL de cada cultura de *C. sakazakii*, tendo sido aplicados 50 µL de cada sobrenadante livre de células nos orifícios de difusão. Ensaio de controle negativo foram conduzidos utilizando caldo MRS ou caldo MRS modificado, sem inoculação de *L. gasseri* ou *Bifidobacterium* spp. respectivamente. Simulando a acidificação do meio advinda do ácido produzido pelo crescimento da cultura (pH 3,8), os controles foram acidificados assepticamente a pH 3,8 com ácido láctico 30 % (v/v) previamente filtrado em membrana 0,22 µm. Após a aplicação dos sobrenadantes nos orifícios, as placas foram mantidas sob refrigeração por cerca de 12 h, para permitir a difusão dos sobrenadantes contendo eventuais inibidores, sendo em seguida incubadas invertidas a 37 °C/ 18 a 24 h em aerobiose. Eventuais halos de inibição tiveram seus diâmetros medidos com auxílio de régua milimétrica.

3.7. Produção de antagonistas em meio líquido: uso de culturas líquidas integrais

Para investigar o possível papel das células probióticas na eventual inibição do patógeno, procedeu-se ao ensaio como descrito anteriormente, agora com uso da cultura integral no lugar de sobrenadante livre de células. As culturas probióticas foram também preparadas conforme descrito anteriormente, com a ressalva de que dois diferentes tempos de incubação, 6 e 24 h foram avaliados.

3.8. Exame da Natureza da Matriz de Inibição

A determinação da natureza das substâncias componentes da matriz de inibidores produzidos pelas bactérias lácticas probióticas foi conduzida por ensaios de negação de inibição em placa. Para tanto, o protocolo básico descrito no item 3.5 acima foi empregado, suplementado com o uso de soluções de enzimas adicionadas em orifício no interior do halo de inibição presumido. Foram empregadas duas enzimas proteolíticas, proteinase K (Pierce Rockford, IL, EUA) e tripsina (Sigma, St. Louis, MO, EUA), além da catalase (Sigma, St. Louis, MO, EUA), todas preparadas em tampão Tris-EDTA 50 mM, pH 7,4, resultando em soluções de trabalho em concentrações de 2 mg.mL⁻¹, para proteinase K, e 5 mg.mL⁻¹, para catalase e tripsina. As soluções enzimáticas foram preparadas no momento da análise e esterilizadas em membrana filtrante de 0,22 µm (Millipore Corporation, Medford, MA, EUA). Após a formação de colônias visíveis, 10 µL de uma das soluções enzimáticas foram depositados em pequeno orifício de 2 mm de diâmetro feito, com auxílio de cânula plástica estéril, no interior do halo presumido de inibição. Para favorecer a atividade enzimática, as placas foram incubadas em condições ótimas para a atividade de cada enzima: as placas com proteinase K foram incubadas por 60 min, a 55 °C e as placas com catalase e tripsina, incubadas a 37 °C, por 30 min. Após esse procedimento, 10 mL de ágar BHI semissólido 0,7 % (w/v) em ágar previamente inoculado com, aproximadamente, 10⁶ UFC/mL de *C. sakazakii* foram vertidos sobre as placas, que foram refrigeradas e, então, incubadas tal como descrito no item 3.5. A negação total ou parcial de inibição, ou seja,

qualquer crescimento detectável do patógeno na região do halo de inibição em que foi aplicada a solução enzimática indica clivagem e, portanto, inativação de pelo menos uma das substâncias componentes da matriz de inibição do produtor. Nesse caso, como essa substância inibidora clivada constitui substrato específico para a enzima aplicada, a matriz de inibidores pode ser caracterizada inequivocamente mediante o uso das diferentes enzimas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Teste de atividade antagonista em meio sólido

Os resultados da atividade antagônica das estirpes de *L. gasseri* cultivadas em meio sólido sobre o patógeno *C. sakazakii*, estão apresentados na Tabela 1. Todas as estirpes de *L. gasseri* avaliadas apresentaram atividade antagônica contra todas as estirpes de *C. sakazakii*, tendo o diâmetro do halo de inibição entre 5 mm (L 35 contra FUN 139, L 02 contra FUN 157 e L 18 e L 35 contra CDC 7006) a 23 mm (L 32 contra FUN 147) (Tabela 1). L 22 foi a estirpe que apresentou a maior frequência de antagonismo sobre o patógeno *C. sakazakii*.

Esses resultados corroboram os resultados de estudos de Lavermicocca et al. (2008), em que avaliaram a capacidade antagonista de estirpes de *Lactobacillus* spp. contra o Gram-negativo *Yersinia enterocolítica*, e verificaram que todas as estirpes testadas dessa bactéria foram antagonizadas por *Lactobacillus* spp. Além disso, outros autores demonstraram o papel, em particular de ácidos orgânicos, na inativação e/ou inibição de *Y. enterocolítica*, produzidos por estirpes de *Lactobacillus sakei* (VERECKEN et al., 2003; JANSSEN et al., 2006).

Entretanto, a maioria dos estudos (BRUNO; MONTVILLE, 1993; MAZO et al., 2002; OTERO; NADER-MACÍAS, 2006; VORAVUTHIKUNCHAI BILASOI, SUPAMALA, 2006; ANAS; EDDINE; MEBROUK, 2008),

demonstraram o antagonismo de espécies de *Lactobacillus* sp. contra Gram-positivos, sendo o antagonismo sobre Gram-negativos fenômeno substancialmente mais raro e alvo de menor massa de estudos. De fato, a segunda membrana celular existente nos Gram-negativos parece ter papel importante em sua resistência às bacteriocinas e possivelmente a outras substâncias dependentes de membranas para exercer antagonismo ou destruição da célula alvo. Ademais, além de menor sensibilidade ao antagonismo por probióticos, bactérias Gram-negativos também tendem a apresentar maior resistência a antibióticos, segundo o espectro de ação de cada antibiótico (NCCLS, 2003; REESE; BETTS; GUMUSTOP, 2002). Assim, no presente estudo, o antagonismo de *L. gasseri* sobre *C. sakazakii*, um patógeno Gram-negativo oportunista e extremamente severo, representa um avanço inédito para subsidiar intervenções candidatas para controle do patógeno *C. sakazakii*.

A neutralização prévia do ágar MRS resultou em ausência de halo de inibição ou diminuição do diâmetro dos mesmos. Ainda que seja tentador inferir que os ácidos produzidos são os únicos responsáveis pela inibição, essa conclusão seria simplista e errônea, por desconsiderar a interação entre fatores conhecidos e examinados em experimentos subsequentes deste trabalho.

Posto isso, excluída a capacidade de inibição do patógeno somente pelo efeito do pH reduzido *per se*, a redução ou eliminação dos halos de inibição observada após a neutralização do meio sugere um evento mais complexo: a influência do pH sobre a produção e/ou ação da matriz de inibidores. De fato, a natureza protéica das bacteriocinas, componentes candidatos da matriz de inibição observada, justifica a dependência do pH para sua produção, secreção e atividade (TODOROV; DICKS, 2005; BROMBERG et al., 2006, GOMES et al., 2006).

Bactérias bífidas apresentam atividade antagonista frente aos patógenos associada à secreção de metabólitos (SERVIN, 2004). Alguns autores têm atribuído essa atividade antagonista ao abaixamento do pH do meio, em função de produção de ácidos orgânicos (NAKAYA, 1984; OKAMURA et al., 1986). Os experimentos conduzidos no presente estudo demonstraram antagonismo somente de *B. longum* contra as estirpes de *C.*

sakazakii FUN 154 e FUN 157, e da estirpe *B. bifidum* contra as estirpes FUN 157 e CDC 7006; os demais não apresentaram capacidade antagônica. Para *B. longum*, o halo de inibição variou de 5 mm a 10 mm, mas a adição prévia de bicarbonato de sódio ao meio impediu completamente a formação de halos, em todas as situações. Collado; Isolauri e Salminen (2008) ao avaliarem 24 estirpes de *Bifidobacterium* spp. quanto à eventual produção de compostos antimicrobianos, observaram que algumas dessas estirpes apresentavam efeito antagônista sobre Gram-negativos. Entretanto, Botelho (2005) ao avaliar antagonismos de 32 estirpes de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* sobre bactérias patogênicas Gram-negativas e Gram-positivas, constataram que uma estirpe *L. rhamnosus* inibiu *Listeria monocytogenes* e outra estirpe de *L. rhamnosus* antagonizou *L. monocytogenes* e *S. aureus*, não observando inibição de bactérias Gram-negativas, o que indicou o caráter estirpe-específico da inibição observada, corroborando as observações feitas nesse estudo.

No presente estudo, as estirpes de *L. gasseri* avaliadas, além de terem sido previamente selecionadas segundo seus atributos de segurança (DUNNE et al., 2001), já haviam apresentado interessante capacidade de antagonizar patógenos como *C. difficile*, *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* (CUNHA, 2006).

4.2. Teste de atividade antagonista em meio líquido: uso de células líquidas integrais e uso de sobrenadante livre de células

Uma vez detectado o antagonismo de *L. gasseri* e de algumas bactérias bífidas, cultivadas em meio sólido, sobre o patógeno *C. sakazakii*, procedeu-se ao exame do fenômeno inibitório em condições planctônicas de cultivo, ou seja, em meio de cultivo líquido. Para tanto, as culturas foram preparadas apropriadamente em seus caldos de cultivo, que por sua vez foram aplicados, em forma de seus sobrenadantes livre de células como, posteriormente, a cultura integral, em ensaios de difusão em placa. Apesar dos baixos valores de pH atingidos pelas culturas, em torno de 3,8, nenhum sobrenadante livre de células causou inibição detectável do patógeno nos ensaios de difusão. Este resultado indicou a ausência de produção de

inibidores em concentração detectável quando os micro-organismos testados foram cultivados planctonicamente. No entanto, em virtude dos resultados negativos nesse ensaio, não houve conclusão acerca do eventual papel da presença *in situ* das células produtoras na inibição. Com o intuito de examinar também esta questão, o mesmo teste foi realizado empregando-se a cultura integral do micro-organismo probiótico, obtendo-se novamente ausência de inibição. Por meio desses resultados verifica-se que o cultivo planctônico não permite a detecção dos inibidores, ou se permite, suas concentrações são insuficientes para detecção de inibição. Além disso, indicam que mesmo a presença das células do produtor no ensaio não gerou inibição na situação relatada. Coletivamente, a experimentação conduzida permite então inferir que, para os micro-organismos testados, a produção detectável da matriz inibidora ocorre apenas sob cultivo em meio sólido, e que a inibição detectada do patógeno é associada a substâncias antimicrobianas produzidas pelos produtores.

Esse resultado é semelhante aos de Touré et al. (2003), Bevilacqua et al. (2003) e Çadirci e Çitak (2005) que afirmam que, a falta de atividade inibitória detectável em células cultivadas em meio líquido pode ser explicada pela perda do contato célula-célula, o que remete, entre outras possibilidades, ao fenômeno conhecido como *quorum sensing* ou sensoriamento populacional (KLEEREBEZEM, 2004; MILLER; BASSLER, 2001; NYHOLM; MCFALL-NGAI, 1988; STRAUME et al., 2007).

4.3. Exame da Natureza da Matriz de Inibição

A maioria das estirpes de *L. gasseri* testadas tiveram pelo menos parte de seus halos de inibição de *C. sakazakii* negados pela aplicação de enzimas proteolíticas, proteinase K ou tripsina, ou de catalase. As colônias que desenvolveram na zona de negação do halo foram confirmadas morfológica, fenotípica e microscopicamente como sendo do patógeno presente na placa (dados não indicados). Na Figura 1 são apresentados os halos de inibição para duas estirpes de *L. gasseri*, e suas áreas de negação próximas ao local de aplicação de cada uma das três enzimas.

Em conjunto, os resultados indicaram que a matriz de inibição de *L. gasseri*, tendo *C. sakazakii* como indicador, inclui fundamentalmente uma ou mais substâncias de natureza protéica, bem como o peróxido de hidrogênio, e a fração protéica e o peróxido são ativos isoladamente. Além disso, a produção de ácido parece ser importante para ação da matriz inibidora que é cancelada pela adição prévia de bicarbonato. Entretanto, não foi possível determinar possíveis relações de aditividade ou sinergia entre os componentes detectados na matriz inibitória (HOLZAPFEL, GEISEN, SCHILLIGER, 1995; CLEVELAND et al., 2001).

Lactobacillus acidophilus M46 (TEN BRINK et al., 1994), posteriormente classificado como *L. gasseri*, produz a bacteriocina acidocina B, que segundo Van der Vossen et al. (1994), é codificada por genes localizados em plasmídeo (pCV461). A acidocina B apresenta espectro de ação somente sobre Gram-positivos, não tendo sido detectada ação antagônica sobre Gram-negativos, segundo estudos de Barefoot e Klaenhammer (1983) e Tabasco et al. (2009).

Assim, o presente estudo precipita a necessidade da realização de mais investigações para identificação específica do componente protéico da matriz de inibição das estirpes de *L. gasseri* aqui estudadas, todas capazes de antagonizar o patógeno *C. sakazakii*.

Nesse estudo observou-se que o efeito inibitório também ocorre em função do peróxido de hidrogênio. No passado recente, a produção de peróxido de hidrogênio era de certa forma considerada menos interessante que a produção de bacteriocinas, já que muitos estudos relatavam que a inibição observada ocorria devido à produção de ácidos orgânicos e/ou bacteriocinas, ao mesmo tempo que enfatizavam a ausência de peróxido de hidrogênio na matriz inibitória (JUILLARD et al., 1987; MONTVILLE; WINKOWSKI; LUDESCHER, 1995; ANAS; EDDINE; MEBROUK, 2008). Entretanto, atualmente parece haver entendimento que a produção desse composto é importante para os efeitos fisiológicos desejáveis dos *Lactobacillus*. Estudos realizados por Beigi et al. (2005) relataram a capacidade de *Lactobacillus* produzir e liberar o peróxido de hidrogênio, e esse fenômeno, foi associado à diminuição da incidência de infecções no trato genital feminino. Ainda que *C. sakazakii* seja reportado como catalase

positivo, os resultados demonstraram que a adição de catalase à zona de inibição permite a negação da inibição, o que sugere que a atividade de catalase de *C. sakazakii* parece não ser suficiente para decompor todo o peróxido sintetizado por *L. gasseri*. De fato, Chester e Moskovitz (1987) constataram que todas as estirpes testadas de *C. sakazakii*, apenas produzem reação tardia de decomposição do peróxido de hidrogênio. Os resultados do presente estudo também alinham-se com os de Otero e Nader-Macías (2006), em que verificaram diminuição parcial da ação de *L. gasseri* sobre o crescimento de *S. aureus* na presença da enzima catalase, o que demonstra que a produção de peróxido de hidrogênio por *L. gasseri*. Além disso, esses autores verificaram que das 72 culturas de *Lactobacillus* sp. avaliadas, apenas de 5 % não produziam peróxido de hidrogênio.

Considerando os presentes resultados para antagonismo de *C. sakazakii*, este estudo consolida o potencial de uso de estirpes selecionadas de *L. gasseri* para serem adicionadas as FIPs, após hidratação das fórmulas, a fim de antagonizar *C. sakazakii*, e possivelmente outros patógenos (Otero; Nader-Macías, 2006). Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados, com intuito de se verificar o antagonismo *in vivo* nesses produtos e elucidar as diversas variáveis relevantes para o desenvolvimento de novos produtos.

Tabela 1 – Antagonismo de estirpes de *Lactobacillus gasseri* isolados de recém-nascidos sobre estirpes de *Cronobacter sakazakii*

<i>Lactobacillus gasseri</i>	Diâmetros do Halos de inibição															
	FUN 139		FUN 140		FUN 147		FUN 154		FUN 157		ATCC 0015		CDC 7006		CDC 7008	
	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T
L 02	0,8	0,5	1,0	0,0	0,6	0,0	1,5	0,0	0,5	0,0	1,2	0,3	0,9	0,0	1,2	0,0
L 10	0,9	0,0	0,8	0,0	0,8	0,0	1,2	0,0	0,7	0,0	1,3	0,0	1,8	0,0	2,0	0,0
L 18	1,5	0,0	1,2	0,2	1,3	0,0	0,7	0,0	1,0	0,0	1,6	0,3	0,5	0,0	1,0	0,6
L 22	2,1	0,0	0,6	0,2	1,5	0,0	0,7	0,0	0,9	0,0	1,4	0,0	1,2	0,0	1,2	1,0
L 24	1,5	0,0	2,2	0,0	1,0	0,0	0,3	0,0	0,5	0,0	0,7	0,3	0,5	0,0	0,7	0,5
L 32	0,8	0,0	1,1	0,0	2,3	0,0	0,7	0,0	1,5	0,0	1,0	0,2	0,7	0,0	0,7	0,0
L 36	0,5	0,0	1,3	0,0	1,1	0,0	1,7	0,0	0,7	0,0	0,7	0,0	1,0	0,0	1,3	0,0

N – Agar MRS

T – Agar MRS (adicionado de Bicarbonato)

FUN – Fundação Ezequiel Dias (FUNED)

Tabela 2 – Antagonismo de estirpes de *Bifidobacterium* spp. contra estirpes de *Cronobacter sakazakii*

<i>Bifidobacterium</i>	Diâmetros dos Halos de inibição (cm)																
	FUN 139		FUN 140		FUN 147		FUN 154		FUN 157		ATCC 0015		CDC 7006		CDC 7008		
	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	
<i>B. breve</i> ATCC 15700	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. longum</i> ATCC 15708	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. bifidum</i> ATCC 29521	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

N – Agar MRS

T – Agar MRS (adicionado de Bicarbonato)

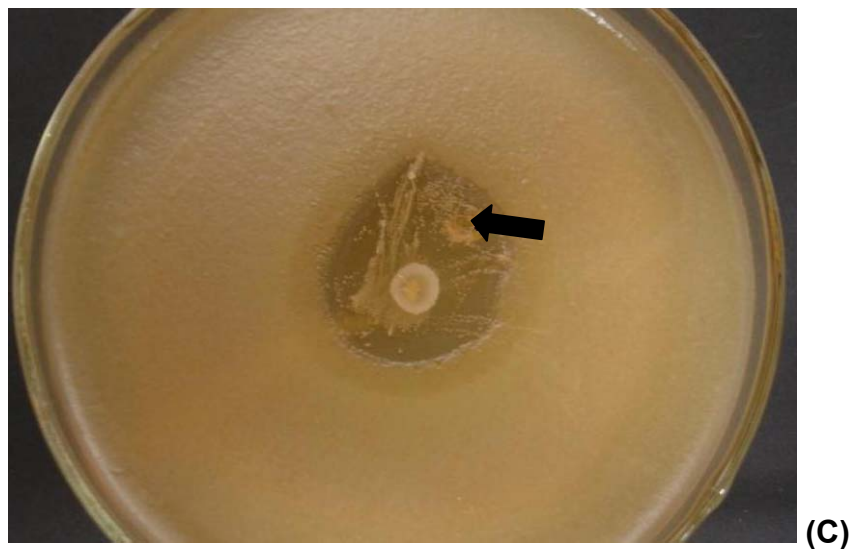
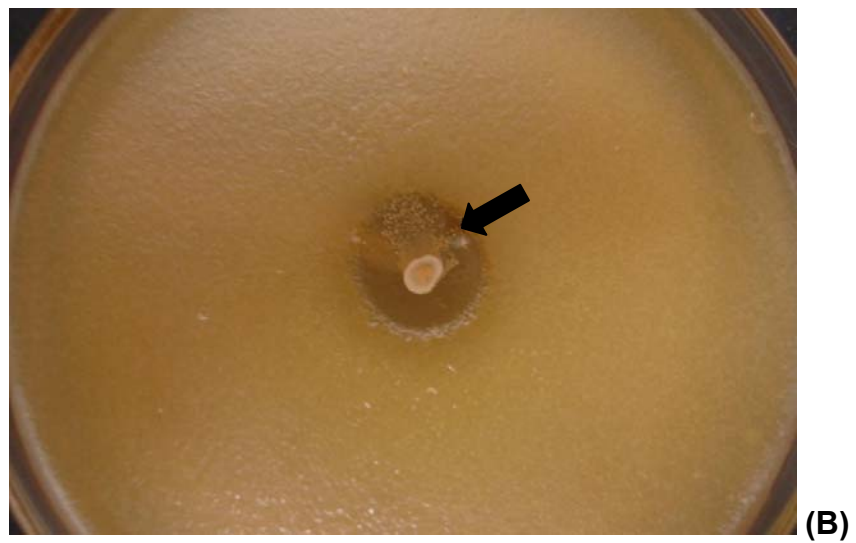
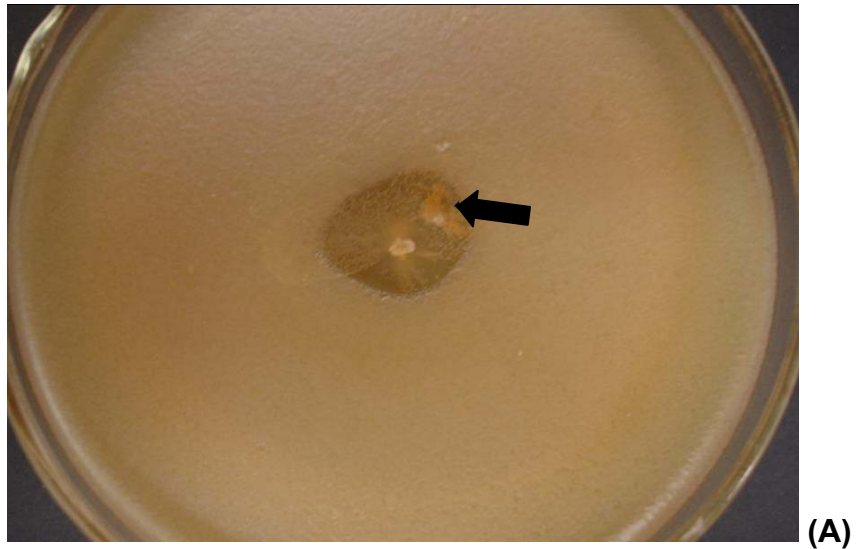


Figura 1 – Zonas de negação por catalase (A), proteinase K (B) e tripsina (C) no halo de inibição de *L. gasseri* (L 18 – A, L 22 – B e L 22 - C) sobre o patógeno *C. sakazakii*. A seta indica o local de aplicação da enzima e origem de difusão da solução enzimática.

5. CONCLUSÃO

Todos os isolados de *L. gasseri* e algumas estirpes de *Bifidobacterium* spp. apresentaram capacidade de antagonizar *C. sakazakii* .

Os resultados de antagonismo do experimento são promissores, tanto do ponto de vista que uns dos candidatos da matriz inibitória é o peróxido de hidrogênio, como pela primeira vez um estudo relata a ação de um composto de origem protéica, produzido por *L. gasseri*, possivelmente bacteriocina, antagonizando patógeno Gram-negativo.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Mediante os resultados de antibiograma, observou-se que a maioria das estirpes de *L. gasseri* e *Bifidobacterium* spp. foram sensíveis aos antibióticos.

Pelo fato de se trabalhar com bactérias sensíveis aos antibióticos, a forma de maximizar a chance de o probiótico resistir ao antibiótico e se estabelecer na microbiota, seria por meio da utilização de um *pool* de bactérias, podendo, assim, desempenhar seus efeitos benéficos e atuar como adjunto no tratamento de infecções.

Os *L. gasseri* proporcionaram maior capacidade de antagonizar *C. sakazakii* que as estirpes de *Bifidobacterium* spp. Assim essas estirpes apresentam-se como candidatas a serem utilizadas como adjunto no tratamento das infecções por *C. sakazakii*.

A ausência de inibição do patógeno em ensaios de inibição em placa usando sobrenadantes livre de células ou culturas integrais, ambos de baixo pH, indica que os ácidos por si sós não são capazes de antagonizar o patógeno segundo o ensaio empregado, entretanto, os ácidos são indispensáveis para que ocorra o fenômeno de antagonismo, pois nos ensaios em que houve neutralização do meio de cultura o fenômeno de antagonismo não foi observado, ou quando observado o mesmo foi em menor proporção.

Os resultados indicaram que a matriz de inibição de *L. gasseri*, tendo *C. sakazakii* como indicador, possui uma ou mais substâncias de natureza protéica, bem como o peróxido de hidrogênio, e a fração protéica e o peróxido são ativos isoladamente.

O presente estudo precipita a necessidade da realização de mais investigações para identificação específica do componente protéico da matriz de inibição das estirpes de *L. gasseri* aqui estudadas, todas capazes de antagonizar o patógeno *C. sakazakii*.

REFERÊNCIAS

ANAS, M.; EDDINE, H. J.; MEBROUK, K. Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Isolated from Algerian Raw Goat's Milk Against *Staphylococcus aureus*. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, v.3 (2): p.39-49, 2008.

BARREIRA, E.R.; SOUZA, D.C.; GÓIS, P.F.; FERNANDES, I. C. Meningite por *Enterobacter sakazakii* em recém-nascido: relato de caso. **Pediatria**. v.25, p.65-70, 2003.

BAREFOOT, S. F.; KLAENHAMMER, T. R. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45(6), p.1808-1815, 1983.

BEIGI R.H.; WIESENFELD H.C.; HILLIER S.L.; STRAW T.; KROHN M.A. Factors associated with absence of H₂O₂- producing *Lactobacillus* among women with bacterial vaginosis. **The Journal of Infectious Disease**, v.191(6), p.924–929. (Erratum in: J. Infect. Dis. 191(10) 1785), 2005.

BEVILACQUA, L.; OVIDI, M.; DI MATTIA, E.; TROVATELLI, L. D.; CANGANELLA, F. Screening of Bifidobacterium strains isolated from human faeces for antagonistic activities against potentially bacterial pathogens. **Microbiological Research**, v.158, p.179-185, 2003.

BONNET, M.; MONTVILLE, T.J.. Acid-tolerant *Listeria monocytogenes* persist in a model food system fermented with nisin-producing bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v.40, 237–242, 2005.

BOTELHO, L. **Isolamento e identificação de lactobacilos e bifidobactérias em alimentos probióticos disponíveis no mercado brasileiro**, Campinas, 2005. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição). Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R.R.; CINTRA, H.C. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* ctc 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciências e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v.26(1): p.135-144, 2006.

BRUNO, M. E. C.; MONTVILLE, T. J. Common Mechanistic Action of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59(9), p. 3003-3010, 1993.

ÇADIRCI, B. H.; ÇITAK, S. A Comparison of Two Methods Used for Measuring Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.4 (4): p.237-241, 2005.

CDC, Center for Disease Control. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula - Tennessee, 2001. CDC <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5114a1.htm>(em 10/7/2008).

CHESTER, B.; MOSKOWITZ, L. B. Rapid catalase supplemental test for identification of members of the family *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 439-441, 1987.

CINTAS, L. M.; CASAUS, P.; HAVARSTEIN, L. S.; HERNANDEZ, P. E.; NES, I. F. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec -dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, (1), p. 4321-4330, 1997.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 1-20, 2001.

COLLADO, M.C.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, S. Specific probiotic strains and their combination counteract adhesion of *Enterobacter sakazakii* to intestinal mucus. **FEMS microbiology Letters** , v.285, p.58-64, 2008.

CUNHA, L. R. **Parâmetros de segurança e funcionalidade de bactérias bífidas isoladas de recém-nascidos, com indicação de uso como probiótico em bancos de leite humano**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

DUNNE, C.; O'MOHONY, L.; MURPHY, L.; THORNTON, G.; MORRISSEY, I.D.; O'HALLORAN, S.; FEENEY, M.; FLYNN, S.; FITZGERALD, G.; DALY, G.; KIELY, B.; O'SULLIVAN, G.C.; SHANAHAN, F.; COLLINS, J.K. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 386-392, 2001.

DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HECHARD, Y.; McMULLEN, L. M.; PREVOST, H. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 70, n. 2, p. 564-582, 2006.

ERICKSON, M. C.; KORNACKI, J. L. *Enterobacter sakazakii*: An Emerging Food Pathogen. 2002. Acessado em Fev. 25, 2009. Disponível em: <<http://www.ugacfs.org/faculty/Erickson/EBWhitePaper.mpd.PDF>>.

FARBER, J.M. *E. sakazakii*: new foods for thought? *Lancet*; 323:5-6, 2004.
FERREIRA, C. L. L. F. Grupo de Bactérias Lácticas – Caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: FERREIRA, C. L. F. Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. p. 7-34.

FLEMING, H. P.; ETCHELLS, J.L.; COSTILOW, R.N., Microbial inhibition by the isolate of *Pediococcus* from cucumber briner. **Applied Microbiology**; v. 30, n. 6, p.1040-2, 1975.

FOOKS, L. J.; GIBSON, G. R. Probiotics as modulators of the gut flora. **British Journal of Nutrition**, v. 8, p. S39-S49, 2002.

GOMES, F. M.; PAULA, A. V.; SILVA, G.; CASTRO, F. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por Carbonildiimidazol. **Química Nova**, v. 29 (4), 710-718, 2006.

GROSS, D. C.; VIDAVER, A. K. Bacteriocins of phytopathogenic *Corynebacterium* species. **Canadian Journal of Microbiology**, v.25, p.367-374, 1979.

HIRSH, P.R. Plasmid-determined bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, v.3, p.219-228, 1979.

HOLZAPFEL, W.H.; GEISEN, R., SCHILLINGER, U. Biological preservation of food with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, p. 343-362, 1995.

IVERSEN, C.; MULLANE, N.; MCCARDELL, B. D.; TALL, B.; LEHNER, A.; FANNING, S.; STEPHAN, R.; JOOSTEN, H. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *Dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p.1442-1447, 2008.

JANSSEN, M.; GEERAERD A.H.; LOGIST F.; DE VISSCHER, Y., VEREECKEN, K.M.; DEBEVERE, J.; DEVLIEGHIERE, F., VAN IMPE, J.F. Modelling *Yersinia enterocolitica* inactivation in coculture experiments with *Lactobacillus sakei* as based on pH and lactic acid profiles. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 59-72, 2006.

JUILLARD, V.; SPINLER, M.; DESMAZEAUD, M.J.; BOUQUIEN, C.Y. Phenomenon of co-operation and inhibition between the lactic acid bacteria used in milk industry. **Dairy Science and Technology**, v. 67, p. 149-172, 1987.

KAISER, A. L.; MONTVILLE, T.J. The influence of PH and growth rate on production of the bacteriocin, bavaricin MN, in batch and continuous fermentations. **Journal of Applied Microbiology**. v.75, p.536-540, 1993.

KLEEREBEZEM, M. *Quorum sensing* control of lantibiotic production: nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis, **Peptides**, v.25, 1405-1414, 2004.

LAVERMICOCCA, P.; VALERIO, F.; LONIGRO, S. L.; DI LEO, A. VISCONTI, A. Antagonistic Activity of Potential Probiotic Lactobacilli Against the Ureolytic Pathogen *Yersinia enterocolitica*. **Current Microbiology**, v. 56, p.175-18, 2008.

MATSUMOTO, S.; HARA, T.; HORI, T.; MITSUYAMA, K.; NAGAOKA, M.; TOMIYASU, N.; SUZUKI, A.; SATA, M. Probiotic *Lactobacillus*-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. **Clinical Immunology**, v. 140, (3), p. 417–426, 2005.

MAZO, J. Z.; SANT'ANNA, E. S.; FRANCO, B. D. G. M.; PORTO, A. C. S.; FIORENTINI, A. M. Detecção de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* BN em melão de cana-de-açúcar sob fermentação submersa. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 20, n. 1, 2002.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. *Quorum sensing* em bacterias. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 165-199, 2001.

MONTVILLE, T.J.; WINKOWSKI, K.; LUDESCHER, R.D. Models and mechanisms for bacteriocin action and application. **International Dairy Journal**, v.5, p. 797-814, 1995.

NAKAYA, R. Role of *bifidobacterium* in enteric infection. **Bifidobacteria Microflora**, v.3, p. 3-9, 1984.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico**: norma aprovada. 6. ed. M7-A6, v. 23, n. 2, 2003.

NES, I. F.; EIJSINK, V. G. H. Regulation of group II peptide bacteriocin synthesis by quorum-sensing mechanisms. In: DUNNY, G. M.; WINANS, S. C. (Eds.). Cell-cell signalling in bacteria. Washinton: **American Society for Microbiology**, p. 175-192. 1999.

NYHOLM, S. V.; MCFALL-NGAI, M. J. Sampling the light-organ microenvironment of *Euprymna scolopes*: description of a population of host cells in association with the bacterial symbiont *Vibrio fischeri*. **The Biological Bulletin**, 195:89–97, 1998.

OKAMURA, N.; NAKAYA, R.; YOKOTA, H.; YAMA, N.; KARIASHIMA, T. Interaction of *Shigella* and *Bifidobacteria*. **Bifidobacteria Microflora**, v.5, p.51-55, 1986.

OTERO, M. C.; NADER-MACÍAS, M. E. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. **Animal Reproduction Science**, v.96, p.35–46, 2006.

PANT, N.; MARCOTTE, H.; BRUSSOW, H.; SVENSSON, L.; HAMMARSTRÖM, L. Effective prophylaxis against rotavirus diarrhea using a combination of *Lactobacillus rhamnosus* GG and antibodies. **Microbiology**, Edinburgh, v. 7 (86), p. 1-9, 2007.

REESE, R. E.; BETTS, R. F.; GUMUSTOP, B. **Manual de antibióticos**. 3. ed. Tradução por Penildon Silva. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 2002. 720 p.

SERVIN, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **Microbiology Reviews**, v.28, p.405-440, 2004.

STOLL, B.J.; HANSEN, N.; FARANOFF, A.A.; LEMONS, J.A. *Enterobacter sakazakii* is rare cause of neonatal septicemia or meningites in VLBW infantsw. **Journal of Pediatrics**, v.144, p.821-23, 2004.

STRAUME, D.; KJOS, M.; NES, I. F.; DIEP, D. B. *Quorum-sensing* based bacteriocin production is down-regulated by n-terminally truncated species of gene activators, **Molecular Genetics and Genomics**, v.278, p.283-293, 2007.

TABASCO, R.; GARCÍA-CAYUELA, T.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. Volume 132 (30), p.109-116, 2009.

TEN BRINK, B.; MINEKUS, M.; VAN DER VOSSEM, J.M.B.M.; LEER, R.J.; HUIS IN 'T VELD, J. H. J. Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 140-148, 1994.

TODOROV S.D.; DICKS, L.M.T. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, p. 318-326.2005.

TOURÉ, R.; KHEADR, E.; LACROIX, C.; MORONI, O.; FLISS, I. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 1058-1069, 2003.

VAN DER VOSSEN, J. M. B. M.; VAN HERWIJNEN, M. H. M.; LEER, R. J.; TEN BRINK, B.; POUWELS, P. H.; HUIS IN 'T VELD, J. H. J. Production of acidocin B by a bacteriocin of *Lactobacillus acidophilus* M46 is a plasmid encoded trait : plasmid curing, genetic marking by in vivo plasmid integration, and gene transfer. **FEMS Microbiology Letter**, v. 116, p. 333-340, 1994.

VERECKEN, K.M.; DEVLIEGHERE, F.; BOCKSTAELE, A.; DEBEVERE, J.; VAN IMPE, J.F. A model for lactic acid-induced inhibition of *Yersinia enterocolitica* in mono- and coculture with *Lactobacillus sakei*. **Food Microbiology**, v.20, p.701–713, 2003.

VORAVUTHIKUNCHAI, S.P.; BILASOI, S.; SUPAMALA, O. Antimicrobial susceptibility: Antagonistic activity against pathogenic bacteria by human vaginal lactobacilli. **Anaerobe**, v.12, p.221–226, 2006.

WALLS, I.; BUCHANAN, R. L. Use of food safety objectives as a tool for reducing foodborne listeriosis. **Food Control**, v. 16 (9), p. 795-799, 2005.