

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TESE DE DOUTORADO

MODULAÇÃO DA MICROBIOTA COLÔNICA E SANIDADE
DE LACTENTES: FATORES PRÉBIÓTICOS DE LEITE E DE
VIRULÊNCIA DE MICRORGANISMOS

GERALDO DOS SANTOS OLIVEIRA

2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**MODULAÇÃO DA MICROBIOTA COLÔNICA E SANIDADE DE
LACTENTES: FATORES PRÉBIÓTICOS DE LEITE E DE
VIRULÊNCIA DE MICRORGANISMOS**

GERALDO DOS SANTOS OLIVEIRA

Sob a Orientação da Professora Dr^a
Rosa Helena Luchese

Co-orientação do Professor Dr.
Francisco de Assis Baroni

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração em Ciência de Alimentos.

**Seropédica, RJ
Agosto de 2011**

649.33
O48m
T

Oliveira, Geraldo dos Santos, 1959-
Modulação da microbiota colônica
e sanidade de lactentes: fatores
prébióticos de leite e de virulência
de microrganismos / Geraldo dos
Santos Oliveira - 2011.
107 f.: il.

Orientador: Rosa Helena Luchese.

Tese (doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Curso de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.
Inclui bibliografia.

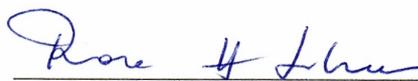
1. Amamentação - Teses. 2. Leite
humano - Composição - Teses. 3.
Leite - Bacteriologia - Teses. 4.
Lactobacilo - Teses. 5.
Bifidobacterium - Teses. I. Luchese,
Rosa Helena, 1957-. II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro.
Curso de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. III.
Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

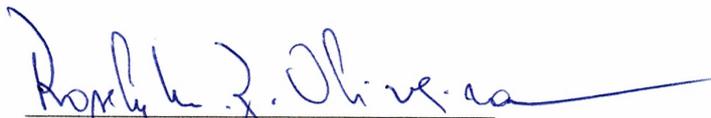
GERALDO DOS SANTOS OLIVEIRA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

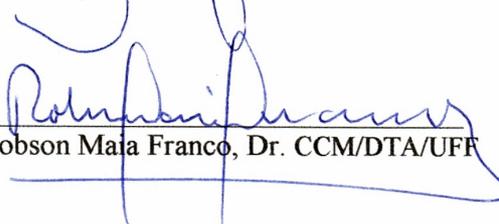
TESE APROVADA EM: 18/08/2011



Rosa Helena Luchese, PhD DTA/IT/UFRRJ
(Orientadora)



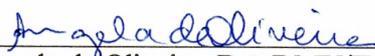
Rosely Zancopé Oliveira, Dr^a. IPEC/FIOCRUZ



Robson Maia Franco, Dr. CCM/DTA/UFRJ



Sérgio Gaspar Campos, Dr. DMV/IV/UFRRJ



Ângela de Oliveira, Dr^a. DMV/IV/UFRRJ

“Esperei confiantemente pelo Senhor; Ele se inclinou para mim e me ouviu quando clamei por socorro. Tirou-me de um poço de perdição, dum tremedal de lama; colocou-me os pés sobre uma rocha e me firmou os passos”. SALMOS 40:1-2

*À minha esposa Maria Aparecida e a Minha filha Èrika pelo apoio e
dedicação.
À memória dos meus queridos pais.*

AGRADECIMENTOS

- A Deus.
- À minha orientadora Professora Rosa Helena Luchese pela dedicação e paciência.
- Ao Professor Francisco de Assis Baroni pelo apoio.
- Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, em especial a Técnica Dina.
- À servidora Jocerlan Quintilhana do Laboratório de Patologia Clínica do Instituto Fernandes Figueira.
- Ao estudante de Engenharia e Tecnologia de Alimentos André Fioravante Guerra.
- Um agradecimento especial ao estagiário Rodrigo Batista dos Santos pela dedicação com que me ajudou nesta jornada.
- À estudante de Engenharia e Tecnologia de Alimentos Antonella Mollo.
- Ao Corpo Docente do Curso de Doutorado em Tecnologia e Engenharia de Alimentos.
- E a todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO GERAL

OLIVEIRA, Geraldo dos Santos. **Modulação da microbiota colônica e sanidade de latentes: Fatores prebióticos de leite e de virulência de microrganismos** 2011. 109 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

A microbiota do intestino desempenha papel importante na saúde humana propiciando barreira à colonização de patógenos (exclusão competitiva), por exercer funções metabólicas importantes, e por estimular o sistema imune. *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são os dois gêneros mais importantes para a manutenção da saúde. A microbiota intestinal poderá ser qualitativa e quantitativamente alterada pelo tipo de alimento ingerido, chamada modulação nutricional, e pelo uso de anti-inflamatórios, laxantes e antimicrobianos. O objetivo do trabalho foi avaliar a composição e evolução da microbiota intestinal de crianças recém nascidas e relacionar ao tipo de amamentação, de parto, com a presença de *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Clostridium* spp., *Escherichia coli* e fungos, além da determinação de aeróbios e anaeróbios totais. Foi avaliada a influência da alimentação e do tipo de parto em 68 neonatos com idade entre sete e 21 dias. Verificou-se influência do tipo de parto nas contagens de lactobacilos, que foram maiores naqueles nascidos de parto normal. Contagens de lactobacilos em lactentes alimentados com leite em pó modificado (LPM) e leite do peito (LM) e nascidos de parto normal foram significativamente superiores ($p < 0,05$) aquelas dos nascidos de parto cesariano, sugerindo uma possibilidade de transferência da microbiota da mãe para a criança. As contagens de lactobacilos estiveram abaixo do nível de detecção do método (1×10^2 UFC/g) em 44% dos indivíduos alimentados com leite do banco de leite humano (BLH) e nascidas de parto normal e em 81% daquelas nascidas de parto cesáreo. Leveduras foram encontradas em todas as amostras, independentemente do tipo de parto ou aleitamento em números que variaram de 1×10^5 a 1×10^{11} . *Candida albicans* (30%) e *C. parapsilosis* (28%) predominaram em ambos os tipos de parto independentemente do tipo de aleitamento com excessão da microbiota de lactentes que receberam LPM nascidos de parto normal, quando predominou a levedura do gênero *Trichosporon* sp. Não foi observada influência significativa do tipo de parto, nas contagens da microbiota anaeróbica. Outro objetivo do trabalho foi detectar a presença e identificar a microbiota fúngica de leite humano e de sítios anatômicos em mulheres e lactentes. A virulência das linhagens de levedura encontradas foi avaliada através de testes de determinação da atividade proteolítica. De 64 amostras avaliadas, 81% foram positivas para a presença de fungos, com prevalência de *Candida albicans* (73%) seguida de *Candida parapsilosis* (15,4%). Perfis semelhantes aos verificados no total de amostras foram encontrados no leite, nas mamas e na cavidade oral, concluindo-se que existe a possibilidade da transferência da infecção cutânea da mãe para o lactante com o leite ingerido. A virulência das espécies de *Candida* isoladas, foi determinada pelo teste de produção de proteases sendo que 100% foram fortemente positivas, indicando alto grau de infectividade. Posteriormente, investigou-se a presença de genes de virulência de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e enteroagregativa (EAEC) em 39 isolados de amostras fecais e de swabs retais dos recém nascidos através das técnicas de polimerase chain reaction (PCR) multiplex e pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Os alvos selecionados para EPEC foram os genes que codificam a adesina intimina (*eae*), fator de aderência (plasmídeo *EAF*) e

fímbria “bundle forming pillus” (*bpf*). Os genes alvo para EAEC foram o plasmídeo de aderência agregativa (*pAA*) e regulon (*AggR*). Foram identificados dois alvos de virulência para EAEC em uma das amostras (2,6%) de neonatos alimentados com leite em pó modificado preparado em lactário. Conclui-se que além do tipo de parto e aleitamento um outro determinante importante da colonização do intestino de lactentes sejam as condições higiênicas no preparo da alimentação e nos cuidados com o neonato devendo ser tomadas medidas corretivas relacionadas às condições de manipulação dos leites destinados as crianças, além de priorizar a alimentação com leite do peito especialmente nos primeiros dias de vida quando ocorre a secreção do colostro rico em anticorpos e fagócitos.

Palavras chave: Leite Humano. Leite Modificado. Prebiótico. *Bifidobacterium*. *Lactobacillus*

GENERAL ABSTRACT

OLIVEIRA, Geraldo dos Santos. **Potential prebiotic of human milk compared to milk powder modified in the modulation of colonic microbiota and sanity in infants**. 2011. 109 f. Thesis (Doctor in Food Science and Technology). Institute of Technology, Department of Food Technology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

The gut microbiota plays an important role in providing human health barrier to colonization of pathogens (competitive exclusion), to exert important metabolic functions and stimulate the immune system. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are the two most important genera for the maintenance of health. The intestinal microbiota may be qualitatively and quantitatively altered by the type of food eaten, called nutritional modulation, and the use of anti-inflammatory drugs, laxatives and antibiotics. The main objective of this study was to determine the influence of either type of feeding and delivery on both composition and evolution of the gut microbiota of *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Candida spp.*, *Clostridium spp.*, *Escherichia coli*, fungi and total aerobic and anaerobic, in infants. The influence of diet and type of delivery in 68 neonates aged between seven and 21 days was evaluated. It was found that the type of delivery influence counts of lactobacilli, which were higher in those born vaginally. Counts of lactobacilli in infants fed LPM and LM and born vaginally were significantly higher ($p < 0.05$) than those born by caesarean, suggesting a possibility of transference of the micro biota from mother to child. Lactobacilli counts were below the detection level of the method (1×10^2 CFU/g) in 44% of individuals fed with BLH's milk, born vaginally and in 81% of those born caesarean section. Yeasts were found in all samples, regardless of type of delivery or feeding in numbers ranging from 1×10^5 to 1×10^{11} . *Candida albicans* (30%) and *C. parapsilosis* (28%) were predominant in both types of delivery, independently of type of feeding with the exception of the micro biota of infants who were born vaginally and were fed with LPM, when prevailed the yeast of the genus *Trichosporon sp.* There was no significant influence of type of delivery, in counts of anaerobic microbiota. Another objective was to detect the presence and identify the fungal microbiota of human milk and anatomical sites in women and infants. Eighty-one per cent of 64 samples were positive for the presence of fungi, with a prevalence of *Candida albicans* (73%) followed by *Candida parapsilosis* (15.4%). Similar profiles to those observed in the total samples were found in milk, breast and oral cavity, suggesting a relationship between the skin infection of the mother and the infant with the milk ingested. The virulence of *Candida* species isolated was determined by testing the production of proteases and 100% were strongly positive, indicating a high degree of infectivity. Afterwards, it was investigated by means of PCR and PFGE, the occurrence of *E.coli* enteropathogenic (EPEC) e enteraggregative (EAEC) virulence genes in 39 *E. coli* isolates from new-born children faecal samples and rectal swabs. The targets selected for EPEC were the genes encoding for intimin adherence protein (*eae*), adherence factor (EAF) plasmid, fimbriae bundle forming pili (*bpf*). The genes target for EAEC were the plasmid for aggregative adherence (*pAA*) and its regulon (*AggR*). Both EAEC virulence targets were identified in one of the samples (2,6%) in neonates fed with milk formula, prepared by the maternity personnel. It is concluded that besides the type of delivery and breast-feeding, another important determinant of colonization of the intestine of infants are the hygienic conditions in food preparation and in new-born cares. It should be taken corrective actions related to the conditions of manipulation of milk

for children, and prioritize the supply of breast milk especially in the first days of life when the secretion of colostrum is rich in antibodies and phagocytes.

Key words: Human Milk. Modified Milk Prebiotic. *Bifidobacterium*. *Lactobacillus*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
Justificativa.....	2
Resultados e Impactos Esperados.....	3
Análise de Risco e Benefício.....	3
OBJETIVOS	4
Objetivo Geral	4
Objetivos Específicos	4
CAPÍTULO I CONTAMINAÇÃO FÚNGICA NO LEITE HUMANO e em sítios anatômicos de lactantes e lactentes	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1. O Gênero <i>Candida</i>	9
2.2. Proteinase	10
2.3. Fosfolipase.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Coleta de Amostras.....	12
3.2. Exame Microscópico Direto e Por Cultivo	12
3.3. Análises de Virulência.....	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1. Exame Microscópico Direto.....	14
4.2. Identificação e Prevalência de Espécies Fúngicas.....	14
4.3. Produção de Proteinase.....	17
5. CONCLUSÕES	19
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPÍTULO II MODULAÇÃO DA MICROBIOTA COLÔNICA E SANIDADE DE LACTENTES.....	26
RESUMO.....	27
ABSTRACT	28
1. INTRODUÇÃO	29
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	31
2.1. Composição da Microbiota Intestinal e Importância para a Manutenção da Saúde.....	31
2.2. Probióticos	34
2.3. Prebióticos	35
2.4. Fatores que Influenciam na Modulação da Microbiota Colônica.....	36
2.5. Alimentação com Leite Materno	37
2.6. Tipo de Parto	40
2.7. Uso de Medicamentos	41
2.8. Outros Fatores	41
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1. Seleção de Indivíduos Lactentes e Amostragem.....	42
3.2. Atendimento ao Código de Ética.....	42
3.3. Informações Sobre Determinantes Potenciais	43

3.4.	Coleta e Preparo das Amostras.....	43
3.5.	Métodos de Cultivo	43
3.5.1.	Enumeração de diferentes populações bacterianas por contagem em placas ...	43
3.5.2.	Determinação de leveduras por cultivo	44
3.6.	Confirmação da Identidade dos Diferentes Grupos Microbianos Avaliados	44
3.6.1.	Gênero <i>Bifidobacterium</i>	44
3.6.1.1.	Pesquisa da enzimafrutose-6-fosfato fosfocetolase (F6PPK) em <i>Bifidobacterium</i>	44
3.6.2.	Gênero <i>Lactobacillus</i>	44
3.6.3.	<i>Escherichia coli</i>	44
3.6.4.	Gênero <i>Bacteroides</i>	44
3.6.5.	Gênero <i>Clostridium</i>	45
3.6.6.	Identificação das leveduras.....	45
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1.	Evolução da Microbiota de Lactentes	46
4.2.	Prevalência de Grupos Microbianos e Influência do tipo de Aleitamento	52
5.	CONCLUSÕES	60
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
CAPÍTULO III IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS DE VIRULÊNCIA EM LINHAGENS DE <i>E. coli</i>		69
RESUMO.....		70
ABSTRACT		71
1.	INTRODUÇÃO	72
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	73
2.1.	Métodos Moleculares	73
2.2.	Caracterização Genotípica de <i>E. coli</i> Patogênicas.....	75
2.2.1.	<i>E. coli</i> Enteropatogênica (EPEC)	76
2.2.1.1.	Principais fatores de virulência	76
2.2.2.	<i>E. coli</i> Enteroagregativa (EAEC)	78
2.2.2.1.	Principais fatores de virulência	79
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	81
3.1.	Coleta de Amostras.....	81
3.2.	Isolamento por Semeadura em Placas	81
3.3.	Extração do DNA	81
3.4.	Procedimento de PCR.....	81
3.4.1.	Oligonucleotídeos iniciadores (“primers”).....	81
3.4.2.	Execução do PCR - Condições do “mix” e programas de amplificação	82
3.5.	Teste de Aderência	86
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
5.	CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		93
ANEXOS		101

INTRODUÇÃO GERAL

Em ecologia o conjunto de microrganismos que habitam um ecossistema, como bactérias, fungos, e alguns protozoários que geralmente tem funções importantes na composição da matéria orgânica e, portanto na reciclagem dos nutrientes, denomina-se microbiota. Em medicina humana ou veterinária, pode-se considerar microbiota normal ou residente a população microbiana associada de forma estável com a pele e mucosas do hospedeiro, que permanece residente ao longo da vida, após o nascimento. As partes do corpo expostas ao ambiente externo, como a pele e mucosas, que em condições fetais são estereis, rapidamente sofrem colonização por diversos microrganismos e estes se distribuem quali e quantitativamente e de maneira não uniforme, compondo assim, a microbiota normal, que permanece se desenvolvendo sucessivamente no individuo ate o fim da sua vida (BRUM, 2006). Assim cada região habitada do organismo possui uma microbiota com características próprias.

O trato gastrointestinal do recém nascido é estéril ao nascer, sendo rapidamente colonizado por microrganismos do meio ambiente ou de sua mãe. A contaminação com bactérias comensais e outros microrganismos derivaria da vagina, intestino e pele da mãe ou do ambiente e ocorreria logo após o nascimento. Alguns autores encontraram semelhança entre a microbiota vaginal e a microbiota do recém nato. (BRANDT et al, 2008).

No desenvolvimento da microbiota intestinal, vários fatores podem exercer efeito regulador na colonização e na formação do sistema imune adaptativo. A chamada microbiota autóctone ou saprófita depende do tipo de alimento ingerido, se há amamentação com leite materno ou com leite em pó modificado e também dos alimentos líquidos e sólidos que são introduzidos na dieta. O tipo de parto (vaginal ou cesariana) também influencia.

A microbiota intestinal poderá ser qualitativa e quantitativamente alterada pelo uso de anti-inflamatórios, laxantes e antibióticos. Estes últimos poderão erradicar microrganismos susceptíveis e estimular a proliferação de oportunistas com *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Pseudomonas* spp, algumas espécies de *Clostridium* spp e *Candida* spp.

Durante a amamentação, os bebês recebem fatores bifidogênicos através do leite humano, funcionando estes como pré-bióticos e, portanto, favorecendo o estabelecimento da microbiota intestinal constituída por bactérias bífidas nestes primeiros meses de vida, respondendo por 95% da microbiota total (FOX e FLYNN, 1992). Estas bifidobactérias inibiriam o crescimento de espécies de *Candida* na biota intestinal do recém nascido. O estabelecimento da microbiota ocorre em dois estágios, sendo o primeiro por contaminação a partir da mãe ou do meio ambiente. A sucessiva colonização dos diferentes habitats bifidogênicos do neonato seria o segundo estágio, de acordo com Milkelsaar e Mandar (1993).

A modulação nutricional durante o desenvolvimento neonatal, afeta, a longo prazo, a imunocompetência do individuo. A microbiota do intestino pode ser considerada um sistema adaptável metabolicamente e rapidamente renovável, à medida que novos alimentos são introduzidos na dieta. As bactérias comensais são importantes barreiras de defesa da mucosa intestinal e impedem a colonização por microrganismos patogênicos, e quando isso ocorre, estes são rapidamente eliminados. Fruto oligossacarídeos (FOS) e Galacto Oligossacarídeos (GOS) são prebióticos cujas atividades bifidogênicas tem sido comprovada em adultos. Recentemente tem sido desenvolvida nova fórmula infantil para se reproduzir o efeito prebiótico do leite humano. Em duas experiências consecutivas, foi demonstrado que a suplementação alimentar de fórmulas infantis com uma mistura de GOS e FOS modificou a

biota fecal de bebês, incluindo os prematuros, estimulando o crescimento de bifidobacterias. Contudo nos bebês não-prematuros, o efeito bifidogênico desta mistura prebiótica dependeu da dose, mas também teve um crescimento significativo no número de lactobacilos (MORO e ARSLANOGLU, 2005).

O gênero *Candida*, levedura comensal na pele e mucosas humana e dos animais vertebrados, vem sendo objeto de estudo com relação à classificação taxonômica, virulência e quanto ao seu papel na doença cutânea e sistêmica. A presença de algumas espécies de *Candida* spp está relacionada ao abandono da amamentação e a quadros de diarreia apresentados por crianças internadas e alimentadas com leite materno e leite em pó modificado, sobretudo em pacientes imunodeprimidos.

Justificativa

As bifidobactérias influenciam positivamente a saúde do lactente, inibindo patógenos e estimulando o sistema imune. O leite materno é um alimento funcional por possuir fatores bifidogênicos constituídos de glicopeptídeos e oligossacarídeos, capazes de estimular a predominância de bactérias bífidas no trato intestinal nos primeiros meses de vida. Desta forma, o fator bífido do leite humano é considerado como prébiótico e as bifidobactérias consideradas probióticos.

O conhecimento adequado dos tipos de microrganismos, assim como os eventos que influenciam a seqüência da colonização, poderá fornecer subsídios para a modulação da microbiota intestinal, quando houver a necessidade de melhorar as funções protetoras que exercem.

Os métodos clássicos usados para isolamento e identificação da microbiota intestinal são complexos e requerem muito tempo e habilidade do analista. Além disso, muitos microrganismos não são cultiváveis, o que dificulta o estudo da evolução destas populações. Entretanto o trabalho do microbiologista tem sido facilitado com o emprego de técnicas moleculares como as baseadas na caracterização dos genes 16S rRNA. O sequenciamento dos produtos re-amplificados pelo PCR diretamente de bandas já separadas permite a identificação em gênero ou espécie.

Contudo, fica claro que não existe uma única técnica apropriada para estudos da ecologia microbiana intestinal. Desta forma, muitos meios de cultivo, assim como PCR primers e sondas específicas para diferentes gêneros e espécies, tem sido desenvolvidos. A quantificação das espécies requer o uso de técnicas de hibridização (MANGIN et al., 2002) ou PCR em tempo real (MATSUKI et al., 2004).

O conhecimento adequado dos tipos de microrganismos, assim como os eventos que influenciam a ordem de colonização, poderão oportunizar a modulação da microbiota colônica quando a modulação for necessária para evitar distúrbios decorrentes do desequilíbrio desta microbiota.

Visando avaliar a influência de alguns determinantes na modulação da microbiota colônica de lactentes, foram coletadas amostras fecais de neonatos alimentados com leite do banco de leite, leite em pó modificado e leite do peito para identificação e quantificações dos principais grupos microbianos presentes. Também foi estudada a microbiota fúngica de sítios anatômicos e de leite humano ordenhado, além da identificação de genes de virulência de *E. coli* EPEC e EAEC em amostras fecais e de swabs retais de neonatos através de técnica de PCR e PFGE.

Resultados e Impactos Esperados

- Propiciar o entendimento do papel da amamentação na colonização e evolução da microbiota intestinal.

- Determinação do impacto do tipo de alimentação dos lactentes e do tipo de parto na modulação da microbiota colônica destas crianças, especialmente no que se refere a presença de microrganismos considerados probióticos.

- Estudar a prevalência de diferentes espécies de leveduras no material fecal, sítios anatômicos e leite humano, visando estabelecer métodos de controle das infecções oportunistas, sobretudo por *Candida* spp. e *E. coli*.

- O estabelecimento de como ocorre a colonização em recém nascido por fungos permitindo determinar a(s) possível(is) fonte de colonização das crianças que estão sendo amamentadas ou internadas em UTI-neonatal.

Análise de Risco e Benefício

É importante salientar que não há riscos para as populações a ser estudada, pois o material a ser amostrado são fezes de lactentes e as amostras de pele são coletadas por "swab", sendo inteiramente inócuo. O benefício será o entendimento dos fatores, e especialmente da alimentação, como profilático e preventivo na manutenção da saúde.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar o papel do tipo de aleitamento e tipo de parto na colonização e evolução da microbiota intestinal de lactentes assim como estudar a prevalência de diferentes espécies de leveduras no material fecal, sítios anatômicos e leite humano, e espécies virulentas de *E. coli*, visando estabelecer métodos de controle das infecções oportunistas.

Objetivos Específicos

Determinar e quantificar a presença de *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Lactobacillus* spp., *Clostridium* spp., *Escherichia coli* e fungos, além de bactérias aeróbias e anaeróbias nas fezes de lactentes em domicílios e acompanhados pelo Banco de Leite Humano do Instituto Fernandes Figueira (IFF, Fiocruz), além de maternidades localizadas na zona oeste (Rocha Faria) e Seropédica.

Identificar as espécies de leveduras e determinar a virulência das linhagens de *Candida* spp. isoladas.

Relacionar o tipo de alimentação (leite humano ordenhado do banco de leite, leite do peito e em pó modificado) o tipo de parto e o uso de medicamentos, na modulação da microbiota intestinal dos lactentes.

Determinar o perfil da colonização cutânea e de trato gastrintestinal e leite humano, com espécies fungicas nos lactentes.

Identificar alvos de virulência de isolados de *E. coli* do material fecal e “swabs” retais de lactentes.

CAPÍTULO I

CONTAMINAÇÃO FÚNGICA NO LEITE HUMANO E EM SÍTIOS ANATÔMICOS DE LACTANTES E LACTENTES

RESUMO

Infecções, bacterianas e/ou fúngicas podem levar ao quadro conhecido por mastite, que é relacionado com uma das principais causas de abandono precoce de amamentação. Microrganismos potencialmente patogênicos como leveduras do gênero *Candida*, quando em número elevado no intestino são responsáveis por casos de disbiose. Nesta pesquisa objetivou-se detectar a presença e identificar a microbiota fúngica de leite humano e de sítios anatômicos em mulheres e crianças atendidas pelo Banco de leite Humano do Instituto Fernandes Figueiras da FIOCRUZ. A virulência das linhagens de levedura encontradas foi avaliada através de testes de determinação da atividade proteolítica. De 64 amostras avaliadas, 81% foram positivas para a presença de fungos, com prevalência de *Candida albicans* (73%) seguida de *Candida parapsilosis* (15,4%). Perfis semelhantes aos verificados no total de amostras foram encontrados no leite, nas mamas e na cavidade oral. Observou-se que exista uma relação da infecção cutânea da mãe e do lactante com o leite ingerido. A virulência das espécies de *Candida* isoladas, foi determinada pelo teste de produção de proteases sendo que 100% mostraram-se fortemente positivas, indicando alto grau de infectividade. Conclui-se que a alta incidência de *C. albicans* nas mamas, cavidade oral de lactentes e no leite, é um fator de risco à sanidade dos lactentes.

Palavras chave: Infecções cutâneas, *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, virulência

ABSTRACT

Bacterial or fungal infections can lead to a clinical case of mastite, one of the main causes of precocious abandonment of breast-feeding. Microorganisms potentially pathogenic as yeast of the genera *Candida*, when in high number in the intestine can lead to cases of dysbiosis. This research aimed to detect and to identify fungi in human milk and anatomical sites of women and children that receive attendance at Human Milk Bank of the Institute Fernandes Figueiras, FIOCRUZ. The virulence of the isolated yeast strains was evaluated through proteolytic activity tests. Eighty-one percent of 64 samples were positive for the presence of fungi, with prevalence of *Candida albicans* (73%) followed of *Candida parapsilosis* (15.4%). Similar profiles had been found in milk, in the breasts and in the mouth cavity, suggesting a relation of mother and children cutaneous infections and the ingested milk. The virulence of the isolated *Candida* species was determined by the proteolytic activity test. All the isolates (100%) were strong positive, indicating high degree of infectivity. It is concluded that the high incidence of *C. albicans* in the breasts, mouth cavity and in milk is a risk factor the health of the lactents.

Word key: Cutaneous infections, *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, virulence

1. INTRODUÇÃO

Infecções cutâneas e de mucosas causadas por espécies de fungos, como as dermatofitoses e dermatomicose são bastante comuns. Aquelas causadas por espécies do gênero *Candida* nas mamas das nutrizes tendem a ser manifestar como lesão eritematosa e pruriginosa no sulco inframamário, levando ao quadro conhecido por mastite. Esta é uma das principais causas de abandono precoce de amamentação, com conseqüências nefastas a saúde do lactente incluindo sua exposição a fungos patogênicos.

Diversas espécies de *Candida* são naturalmente encontradas vivendo como comensais no organismo de indivíduos com sistema imunológico competente, numa proporção de 47 % na cavidade oral, 34 % na região retal e 23 % na cavidade vaginal, sem causar infecções aos seus hospedeiros, ainda que por vezes sejam detectadas em número elevado (ODDS, 1994; Pereira, 2002). A espécie isolada com mais freqüência do trato gastrointestinal é *C. albicans*, seguida por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata* (MURRAY, 1999; BORG-VON ZEPELIN et al., 1993; SULLIVAN et al., 1999; VARGAS et al., 2000). Microrganismos potencialmente patogênicos como leveduras do gênero *Candida* também podem estar presente em número elevado em caso de disbiose intestinal.

A produção das enzimas aspartil proteinase (Sap) por espécies de *Candida*, assim como a produção de fosfolipase está correlacionada com a habilidade de aderência ao tecido do hospedeiro (RUCHEL, 1992; BENNETT et al., 1998; GHANNOUM, 2000; HANNULA et al., 2000; BEIN et al., 2002, Alvares, et al, 2007.) e a adesão às proteínas da matriz celular (GUSTAFSON et al., 1991, GOES, 2009. TRONCHIN et al., 1991). Pela formação de tubo germinativo, podem aumentar o potencial de virulência nas infecções em mucosas e na pele e na disseminação endovenosa (KRETSCHMAR et al., 1999).

Tendo em vista a importância da alimentação com leite humano, nesta pesquisa objetivou-se identificar detectar e identificar a microbiota fúngica de leite humano e de sítios anatômicos de mulheres e crianças atendidas pelo banco de leite humano do Instituto Fernandes Figueiras da FIOCRUZ.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Gênero *Candida*

O gênero *Candida*, levedura comensal na pele humana e dos animais vertebrados, vem sendo objeto de estudo com relação à classificação taxonômica e virulência e quando ao seu papel na doença cutânea e sistêmica. Espécies de *Cândida* spp estão relacionadas ao abandono da amamentação e quadros de diarreia apresentados por crianças internadas e alimentadas com leite materno e leite em pó modificado, sobretudo em pacientes imunodeprimidos.

As décadas de 1980 e 1990 caracterizaram-se por um aumento do número de mães decididas a amamentar. Apesar disso, na prática um número significativo destas param de amamentar logo após o parto. Entre as várias razões para essa interrupção, pode ser citada a fissura da região mamilo-aréola, com dor e vermelhidão mamilar, consequência da *C. albicans* (MACDONALD, 1995).

A infecção mamilar é um problema que está crescendo na lactação, sendo que a causada por fungos (candidíase mamilar) ainda é pouco estudada e elucidada. A *C. albicans*, um fungo comensal encontrado frequentemente na vagina e no trato gastrointestinal de seres humanos, tem sido responsabilizada por infecção superficial e localizada das mamas em mulheres lactantes, apresentando fissuras e dor, sendo característica da infecção pela levedura e podendo ser a principal causa de abandono prematuro da lactação. *C. albicans* é a principal espécie do gênero associada à candidíase, mas outras também são relatadas, como por exemplo: *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida kefir* e *Candida guilliermondii* (FISHER E COOK, 2001).

Segundo Amir et al. (1991; 1996), as formas clínicas podem ser: mucosa, cutânea e sistêmica. Na candidíase mucosa, os tecidos mais atingidos são os da boca e da vagina; na cutânea, as áreas intertriginosas da pele das mãos, as virilhas e as axilas são comprometidas; na sistêmica, a infecção pode atingir diversos órgãos, causando candidíase pulmonar, endocardite, nefrite e fungemia. Dependendo da localização, a candidíase pode se manifestar de diferentes formas. Os achados clínicos na candidíase oral são bastante variáveis, podendo ser observados desde quadros localizados até formas extensas.

As lesões, conhecidas no Brasil pela denominação popular de *sapinho*, são mais comuns em recém-nascidos que ainda não colonizaram sua orofaringe, que por isso possui um pH baixo, condição que facilita a colonização da cavidade oral. Clinicamente inicia-se por pequenos pontos esbranquiçados na mucosa que rapidamente se tornam confluentes, para formar pseudomembranas de coloração esbranquiçada, aderidas à mucosa sobre um fundo eritematoso, que pode ser visto quando são removidas. As localizações mais comuns na cavidade oral são as mucosas que revestem bochechas, ponta da língua e palato mole. Entretanto, numa forma mais extensa, pode ser observada uma invasão maciça, com extenso comprometimento da cavidade oral, dificultando muitas vezes a deglutição, sendo esta entidade mais observada em recém-nascidos de mães portadoras de candidíase vulvovaginal (GROHMANN, 1993).

Além dos fatores inerentes do hospedeiro, tem sido postulado que existem diferenças nas patogenicidade de isolados de *Candida* (DELGADO E AGUIRRE, 1997). Características múltiplas de *C. albicans* tem sido proposta como fatores de virulência que capacitam o organismo a causar infecções hematogênicas disseminadas em hospedeiro susceptíveis. Estes prováveis fatores de virulência incluem germinação, aderência às células do hospedeiro e secreção de exoenzimas (CUTLER, 1991).

Ghannoum e Abu-Elteen (1990) propuseram um modelo de infecção no hospedeiro. A sequência seria iniciada pela aderência de *Candida* as células epiteliais da pele e das mucosas, seguida da multiplicação das leveduras com formação posterior de tubo germinativo e filamentos. A adesividade seria aumentada pela germinação das leveduras e inibida pela presença de imunoglobulina A secretora (STENDERUP, 1990). A produção de enzimas que se segue, permitiria a penetração da levedura nas células ocasionando resposta inflamatória, com dano nos tecidos subjacentes. Dependendo do estado imunológico no hospedeiro e da habilidade do microrganismo, a colonização, inicialmente superficial, pode se disseminar. Desta forma, o primeiro degrau no desenvolvimento da candidíase sistêmica é a colonização do trato gastrointestinal e genitourinário, da orofaringe, da pele e das mucosas em geral. A *Candida* pode, então, seguir três caminhos: invasão abrupta de numerosos microrganismos através da mucosa intacta, invasão através de solução de continuidade das mucosas colonizadas ou invasão vascular direta através de cateter (PFALLER et al, 1987).

A função das enzimas extracelulares microbianas na patogênese de muitas doenças bacterianas do homem tem servido como paradigma pelo quais muitos pesquisadores têm descoberto particularidades da virulência das leveduras (CUTLER, 1991). A produção de proteinases e fosfolipases é um dos fatores de virulência mais estudados do gênero *Candida*. Vários pesquisadores têm demonstrado que amostras de *C. albicans* produzem enzimas proteolíticas e fosfolipases independente do sítio do hospedeiro e das condições clínicas de onde foram isolados (OLIVEIRA, 1993; SILVEIRA et al, 1993).

2.2. Proteinase

Entre os fatores de virulência de leveduras do gênero *Candida*, a enzima com atividade proteolítica tem atraído a atenção de muitos pesquisadores desde a comprovação da sua produção pela primeira vez por Staib em 1965.

A purificação dessa enzima permitiu classificá-la como uma aspartil proteinase (Sap) de peso molecular entre 42 e 45 kDa, cuja atividade se dá em pH ácido (2,0 a 4,0) e que possui uma especificidade de substrato bastante ampla, incluindo queratina, colágeno, albumina, hemoglobina, cadeia pesada de imunoglobulinas e proteínas de matriz extracelular (RUCLEL et al, 1982). As proteinases podem ser estudadas em meios de cultivo contendo albumina bovina como única fonte de nitrogênio, verificando-se apenas diferenças quantitativas entre as espécies do gênero *Candida*. Atualmente, foram seqüenciados 10 genes (SAP1-10) que codificam a produção desta enzima (HUBE e NAGLIK, 2001).

A demonstração de uma substância microbiana no paciente e/ou de uma resposta induzida em um hospedeiro é preliminar e crucial na avaliação de um fator de virulência. Portanto, esforços particulares foram direcionados para demonstrar as Saps em soro e tecidos humanos durante uma infecção por *Candida* (DE BERNARDIS et al., 2001).

Evidenciou-se que as enzimas Saps são realmente produzidas “in vitro”, uma vez que a secreção da proteinase foi detectada através da técnica de imunofluorescência em tecidos dos hospedeiros infectados, e elevados títulos de anticorpos, anti-Sap foram encontrados em pacientes com candidíase disseminada (RUCHEL et al., 1983, 1988; RAY et al., 1988).

Vários trabalhos documentaram a correlação entre os níveis de secreção de Sap e a virulência de diferentes cepas (RUCHEL, 1983, 1992).

Kwon-Chung et al (1985) e Hube (1996) mostraram que mutantes deficientes na secreção de proteinase determinavam uma baixa mortalidade em camundongos quando comparados com as cepas parentais.

A secreção da Sap tem sido correlacionada com a habilidade de aderência ao tecido do hospedeiro. Ghannoum e Abu Elteen (1986) demonstraram que isolados altamente proteolíticos de *C. albicans* aderiam-se rapidamente ao epitélio bucal de humanos.

Borg; Ruchel (1988) observaram que amostras de *C. albicans* sorotipo A produzem mais proteinases que amostras do sorotipo B, sendo infrequente o envolvimento dessa última em patologias sistêmicas.

Oliveira et al. (1998), em estudos com amostras de *C. albicans* isoladas da mucosa bucal em pacientes com câncer, verificaram um alto nível de produção de proteinase pelas mesmas, exibindo valores semelhantes entre as várias linhagens.

Ruchel et al (1990) trataram camundongos infectados com *C. albicans* com pepstatina A, que é um inibidor das proteinases aspárticas, e verificaram que esta produziu um bom efeito protetor para os animais. Kretschmar et al. (1999), investigaram 50 amostras de *C. albicans* em modelos murinos tratados com pepstatina A. Foi observado também que houve uma redução na atividade da proteinase, indicando que esta enzima contribui na virulência do microrganismo.

Ruchel (1999) mostrou a importância da pepstatina A no aspecto terapêutico e, além disso, verificou outros substratos da proteinase em *Candida*, tais como a mucina, lactoferrina, lactoperoxidase, IgA, IgG e IgM.

2.3. Fosfolipase

As fosfolipases têm um papel essencial no processo de infecção fúngica, desfazendo a membrana celular e permitindo que a hifa penetre no citoplasma, facilitando a adesão do fungo às células do hospedeiro (SHIMIZU et al., 1996; STAIB et al., 2000), devido a capacidade de degradação dos fosfolípidos, que são as estruturas essenciais da maioria das biomembranas (MAGO & KHULLER, 1990).

Segundo GHANNOUM (2000), o processo de invasão da levedura às células do hospedeiro é iniciado pela deposição de blastoconídeos na membrana, que quase imediatamente começam a sofrer transformações celulares (NIEWWETH & KORTING, 2001). Alguns destes blastoconídeo desenvolvem hifas com alta atividade fosfolipásica em suas extremidades, quando em contato com a membrana celular do hospedeiro (BENNETT et al., 1998), estando este fator diretamente ligado a maior aderência da levedura ao epitélio bucal e vaginal (GHANNOUM, 2000). Estirpes de *Candida* spp produtoras de fosfolipases são capazes de produzir mais óbitos entre camundongos do que as deficientes na produção desta enzima, que se mostraram avirulentas (GHANNOUM, 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta de Amostras

Trinta e nove “swabs” foram coletadas de lactentes e de mães atendidos pelo banco de leite humano ordenhado do Instituto Fernandes Figueira (IFF). Dos lactentes, coletaram-se 18 amostras da cavidade oral, enquanto que das lactantes foram amostradas as mamas (mamilo e aureola) num total de 21.

Em adição, foram avaliadas 25 amostras de leite humano ordenhado, das quais 18 foram provenientes das mesmas mães e filhos das quais foram coletadas as amostras de mama e cavidade oral, sendo seis amostras de doadoras do banco de leite humano do IFF.

Só foram incluídos no estudo as lactantes e os recém nascidos cujos pais concordaram em participar através de consentimento livre e devidamente esclarecido, a despeito de alguma doença de base.

3.2. Exame Microscópico Direto e Por Cultivo

Inicialmente foi realizada análise microscópica direta do leite e do material proveniente dos “swabs” pelo método de Gram.

A seguir as amostras foram semeadas em meio Sabouraud e mycosel (Difco) e, após o crescimento, foram re-isoladas em meios especiais, agar batata dextrose (Difco) e Lacrimel, (SIDRIM e MOREIRA, 1999). Culturas suspeitas de *Candida albicans* foram semeadas em meio de arroz (Difco) para prova do tubo germinativo e formação de clamidoconídios. Além dos testes morfológicos os isolados de leveduras foram identificados através de testes bioquímicos com o auxílio do equipamento VITEK (Biomerieux) e por semeadura em crhomagar (Difco).

3.3. Análises de Virulência

Os isolados de leveduras foram testados para atividade de proteinase de acordo com Ruchel et al, (1982) e inoculando-se uma alçada de cada isolado no centro da placa de Petri contendo agar proteinase seguida de incubação a 36°C por quatro dias. A presença da enzima foi observada pela formação de um halo transparente devido à hidrólise da proteína ao redor da colônia. A atividade enzimática (Pz) foi medida de acordo com Price et al., (1982) (Tabela 1), calculando-se a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo transparente de hidrólise.

Preparou-se Agar proteinase como descrito por Ruchel et al, (1982) mediante preparação do meio base contendo 18 g de agar-agar para 900mL de água destilada que foi esterilizado a 121°C/15min. Separadamente preparou-se meio contendo albumina solubilizando 11,7 g de YNB (Yeast Nitrogen Base), 2 g de albumina bovina e 0,1g de tiamina em 100 ml de água destilada. A seguir foi esterilizada por filtração em membrana Milipore® (0,22µm). O meio base foi resfriado 50°C e misturado ao meio contendo albuminada e distribuído em placas estéreis.

Quadro 1: Interpretação da atividade enzimática (Price et al, 1982).

<i>P_z</i>	<i>ATIVIDADE ENZIMÁTICA</i>	<i>CÓDIGO</i>
= 1,0	Negativa	1
≥ 0,64 < 1,0	Positiva	2
< 0,64	Fortemente positiva	3

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Exame Microscópico Direto

No exame microscópico direto foi revelado apenas 5,4% de positividade. No entanto, quando as amostras foram analisadas por cultivo, foram encontradas 52 (81%) contaminadas com fungos (Figura 1), concluindo-se que o exame microscópico direto não pode ser empregado como única forma de diagnóstico.

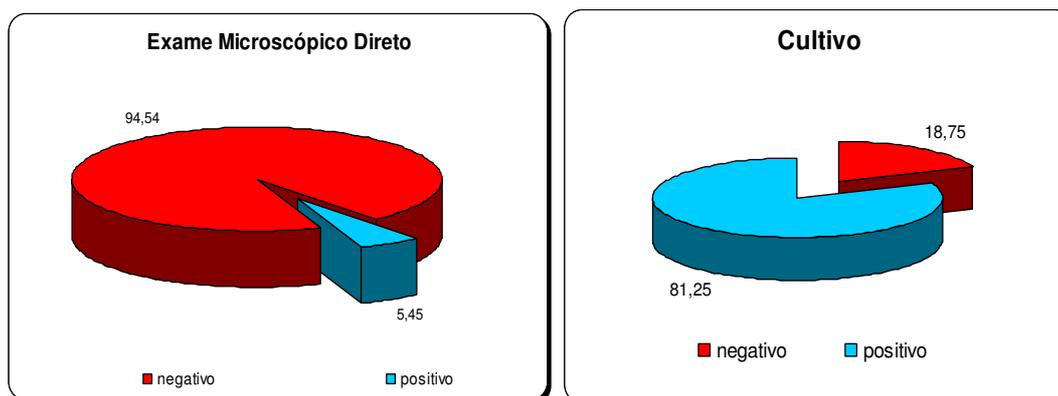


Figura 1: Porcentagem de amostras positivas para a presença de fungos pelo exame microscópico direto e por cultivo

4.2. Identificação e Prevalência de Espécies Fúngicas

O percentual das diferentes espécies encontradas no total de amostras contaminadas com fungos é mostrado na Figura 2. *Candida albicans* seguida de *Cândida parapsilosis* prevaleceram no total de amostras positivas. De maneira similar, em infecções urinárias e fungemias também foi observado que *C. albicans* foi a espécie mais comumente isolada, seguida de *C. parapsilosis* (NUCCI et al.1998, COLOMBO et al.1999, RODRIGUEZ-TUDELA e CUENCA-ESTRELLA 1999, CRUMP e COLLIGNON 2000, PFALLER et al. 2001). Entretanto, alguns trabalhos indicam *C. glabrata* como a segunda espécie mais isolada em casos de fungemia (PFALLER et al. 2001, GERMAIN et al. 2001).

Krcmery et al. (2000) verificaram em um período de 10 anos que, embora *C. albicans* permaneça como a espécie mais frequentemente isolada, houve aumento de outras espécies de *Candida* de 0% em 1991 para 46,3% em 1998. *C. albicans* representou 61,6% de todas as fungemias seguidas de *C. parapsilosis* (9,9%). *C. krusei* (5,8%), *C. tropicalis* (4,1%), *C. glabrata* (3,2%), *C. guilliermondii* (1,2%), *C. lusitaniae* (0,9%). Na presente pesquisa, foram encontrados, 73% de *C. albicans*, 15,4% de *C. parapsilosis* e 5,8% de *C. tropicalis*, sendo que fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* representaram a terceira espécie fungica de maior incidência (7,7%).

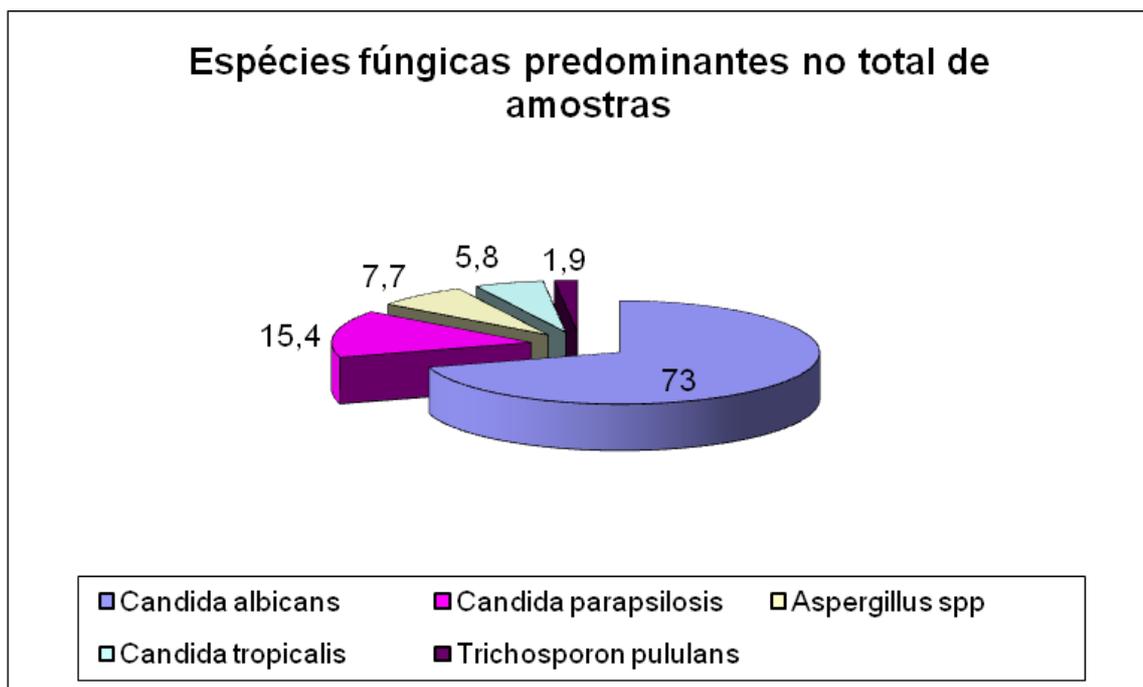
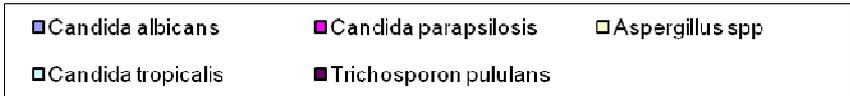
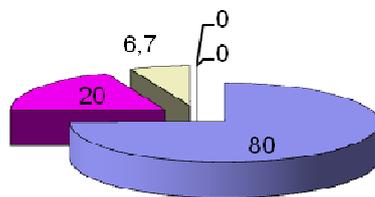


Figura 2: Percentual de espécies fúngicas em leite humano, cavidade oral de lactentes e nas mamas das lactantes, totalizando 52 positivas para fungos.

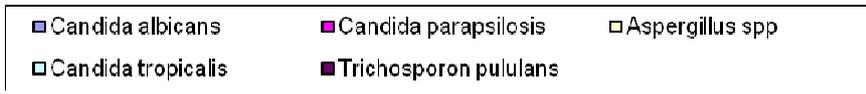
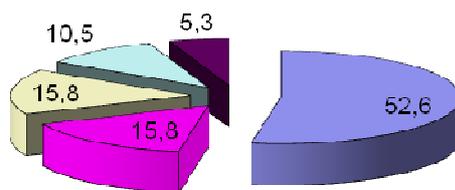
Perfis semelhantes aos verificados no total de amostras foram encontrados individualmente, no leite (Figura 3), nas mamas e na cavidade oral (Figura 4), sugerindo uma transferência da infecção das mamas das lactantes para o leite e, conseqüentemente para os lactentes.

Segundo Contreras et al. (1994), *C. albicans* representou 40% dos isolamentos (23,3% em crianças saudáveis e 82,4% naquelas com candidíase bucal) de 124 crianças acompanhadas longitudinalmente, dos 15 dias de vida até os 16 meses. Assim, a combinação destas duas características de *C. albicans*, alta incidência e longa permanência, podem comprometer severamente a sanidade de lactentes.

Espécies fúngicas predominantes nas Mamas das Nutrizes



Espécies fúngicas predominantes em Leite Humano



Especies fúngicas predominantes na cavidade oral de lactentes

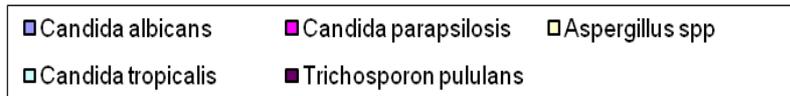
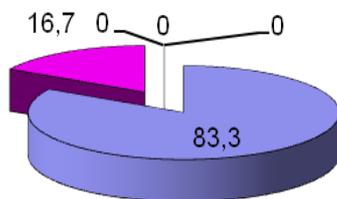


Figura 3: Percentual de espécies fúngicas nas mamas das nutrizes em leite humano e na cavidade oral de lactentes.

Tortora et al. (2000) afirmaram que a microbiota da mucosa da boca usualmente suprime o crescimento de fungos como *C. albicans*. Diferentemente, neste estudo todas as amostras da cavidade oral foram positivas para fungos com predominância de *C. albicans* (83,3%). Entretanto na cavidade oral não foram encontradas as leveduras *C. tropicalis*, *T. pululans* presentes no leite.

Almeida (1996) observou a ocorrência de bolores e leveduras em 69,4% das amostras de leite humano coletadas no Instituto Fernandes Figueira, com contagens na ordem de 10^6 UFC/ml. Após efetuar modificações na técnica de coleta e repetir as contagens este autor verificou redução na incidência desses microorganismos para 16,7% das amostras e contagens inferiores a $3,0 \times 10^2$ UFC/ml.

Embora muitos membros desse gênero sejam encontrados intraoralmente (*C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*), eventualmente causam doença, sendo a candidose bucal provocada mais frequentemente por *C. albicans* considerada a mais patogênica (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990; NEVILLE et al., 1995; NISENGARD e NEWMAN, 1997).

A alta incidência de *C. albicans* nas mamas, cavidade oral de lactentes e no leite é uma fator de risco a sanidade dos lactentes. O gênero *Candida*, levedura comensal na pele humana e dos animais vertebrados, vem sendo estudado recentemente em várias reformulações a respeito de sua classificação, taxonomia e virulência e com relação ao seu papel na doença cutânea e sistêmica. Espécies de *Candida* spp, estão relacionadas ao abandono da amamentação e quadros de diarréia apresentados por crianças internadas e alimentadas com leite materno e leite maternizado, sobretudo em pacientes imunodeprimidos. Em adição leveduras do gênero *Candida* são consideradas potencialmente patogênicas estando presente em número elevado em caso de disbiose intestinal.

4.3. Produção de Proteinase

Um dos fatores de virulência do gênero *Candida* mais estudado, é a produção de enzimas extracelulares como proteinases ácidas e fosfolipases, uma vez que exercem importante papel na patogênese. A virulência das espécies de *Candida* foi determinada pelo teste de produção de proteinase ácida, sendo observado que 100% foram fortemente positivas, indicando alto grau de infectividade (Figura 4). Foram testados 18 isolados de *C. albicans* sendo seis das mamas, seis da cavidade oral e seis do leite, que apresentaram atividade enzimática (Pz) média e desvio padrão de 0.37 ± 0.06 , 0.42 ± 0.11 e 0.35 ± 0.10 , respectivamente. De maneira similar, três isolados de *C. parapsilosis* respectivamente de mama, cavidade oral e leite apresentaram Pz de 0.54, 0.38 e 0.45, também classificados como fortemente positivas para produção de proteases. Um isolado de leite de *C. tropicalis* foi igualmente fortemente positivo para o teste de proteinase (Pz 0.37).

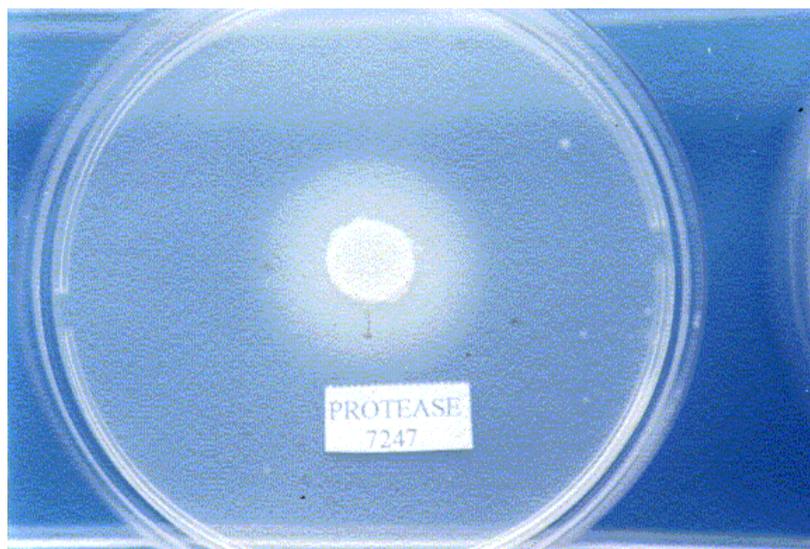


Figura 4: Produção de protease

Em estudos realizados por Ruchel et al., (1982, 1983) e Macdonald (1984), demonstraram que atividades distintas de proteinases podem ser apresentadas por diferentes linhagens de *C. albicans* e diferentes espécies de *Candida*. Também foi observado que existe uma tendência de correspondência entre quantificação de proteinases e ordem de virulência de espécies (*C. albicans* > *C.tropicalis* > *C.parapsilosis* > *C. krusei* > *C. glabrata* > *C. guilliermondii*). Diferentemente, nos resultados aqui apresentados todas as leveduras isoladas independentemente da espécie foram fortemente proteolíticas. Concluiu-se que os isolados de *Candida* spp, independentemente de serem da espécie *C. albicans* podem ser considerados potencialmente patogênicos.

Resultados semelhantes foram relatados por Penha (2000) que observaram em isolados de *C. albicans* de pacientes da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 100% fortemente positivos. Entretanto Candido et al. (2000) relataram atividade proteolítica em 66,7% de *C. albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

Holmstrup e Samaranayake (1990) relataram que o desequilíbrio da microbiota bucal e a imaturidade dos mecanismos de defesa são responsáveis pela suscetibilidade aumentada a candidíase durante o período neonatal. Dependendo do estado imunológico do hospedeiro, a colonização por *Candida*, inicialmente superficial, pode se disseminar. A infecção por espécies do gênero *Candida*, segundo Ghannoum, (2000), começaria pela aderência da levedura às células da pele e das mucosas e seguiria com a multiplicação celular, formando posteriormente tubo germinativo e hifas que produziriam proteinases e fosfolipases, permitindo a sua penetração e a conseqüente resposta inflamatória.

5. CONCLUSÕES

- *Candida albicans* seguida de *C. parapsilosis* prevaleceram em todas as amostras e apresentaram-se, potencialmente virulentas.
- Existe uma relação de transferência infecção das mamas das lactantes para o leite e, conseqüentemente para os lactentes, indicando que o aspecto com cuidados de higiene é fundamental quando da entrega da alimentação ao recém nascido, seja através da amamentação por fórmulas, leite humano ordenhado ou ao peito.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J.A.G. **Qualidade do leite Humano coletado e processado em banco de leite.** 1986. Dissertação - Universidade Federal de Viçosa, MG, 1986.
- ALVARES, C.; SUIDZZINSKI, T.E.; LOPES, M.E. Candidíase Vulvovaginal: Factores Predisponentes do Hospedeiro e virulencia. **Rev. Bras.Patol. Med. Lab.**, 2007. 43(5) 19-327.
- AMIR, L.H.; PAKULA, S. Nipple pain, mastalgia and candidíasis in the lactating breast. **Aus NZ ju obstet Gynaecol**, v.31, n.4, p.378-380; 1991.
- AMIR, L.H. et al. *Candida albicans*: is it associated wit nipple pain in lacting women? **Gynecol obstet Invest**, v.41, n. 1, p. 30-34, 1996.
- BEIN, M.; SCHALLER, M.; KORTING, H.C. The secreted aspartic proteinases as a new target in the therapy of candidiasis. **Curr. Drug. Targets.** v. 3, n. 5, p. 351-357, 2002.
- BEIN, M.; SCALLER, M.; HANS, C.K.; BAUR, S.; HAMM, G.; MONOD, M.; BEINHAUER, S.; HUBE, B. The secreted Aspartyl Proteinase Sap 1 and Sap2 Cause Tissue Damage in an Vitro Model of vaginal Candidiasis Based on Reconstituted Human Vaginal Epithelium. **Infection and Imunity**, 2003,71(6) 3227-3234.
- BENNETT, D.E.; MCCREARY, C.E.; COLEMAN, D.C. Genetis Characterization of phospholipase C Gene from *Candida albicans* : Prsence of homologus sequences in candida species other than *Candida albicans*. **Microbiology**. 1998; 144: 55-72.
- BORG,M.; RUCHEL,R.: Expressin of extracellular proteinase by proteolytic *candida spp.* During experimental infection of oral mucosa.In ; **Infect.Immu**, n. 56, p.626-631. 1988.
- BORG-VON ZEPELIN, M.; EIFERT, H.; RUCHEL, R. Changes in the spectron of fungal isolates: Results from clinical specimens gathered in 1987/88 compared with those in 1991/92 the university Hospital Gottingen.Gemany **Micoses**.1993; 36(7-8):247-253.
- BRANDT, K. G. Análise molecular da microbiota fecal de recém nascidos saudáveis. (**Tese doutorado**). São Paulo. Faculdade de Medicina. 2008.
- BRUM, R.P.: Efeito de um Aditivo prebiótico no leite e no concentrado sobre o desempenho e aspectos sanitários de bezerros de rebanhos leiteiros – **Dissertação**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – U.F.R.R.J., Seropédica, RJ, fev. 2006.
- BUDTZ-JORGENSEN; E. Etiology,pathogenesis,therapy and profilaxis of oral yeast infectionns. **Acta Odontol Scand** 1990, 48 (1), 61-9.
- CANDIDO, R.C.; AZEVEDO, R.V.P.; KOMESU, M.C. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2000: 33, (5): 437-42.
- COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; SALOMÃO, R.; BRANCHINI, M.L.M.; RICHTMANN, R.; DEROSI, A.; WEY, S.B. High rate of non- *albicans* candidemia in Brazilian Tertiary care hospitls.**Diag.Microbiol.Infect.Dis.**,1998 34(4): 281-286.
- CONTRERAS, I.; PONTON, J.; QUINDOS, G. Prevalence of *Candida parapsilosis* in the

- oral cavities of infants in Spain. *Clin Infect. Dis.*, 1994. 18(3), 480-1.
- CRUMP, J.A.; COLLIGNON, P.J. Intravascular catheter-associated infection. ***Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*** 2000; 19:1-8.
- CUTLER, J.E. Putative virulence factors of *Candida albicans*. ***Annus. Rev. Microbiol.***, v.45, p.187-218, 1991.
- DE BERNARDIS, F.; SULLIVAN, P.A.; CASSONE, A. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. ***Med Mycol.***, v.39, p. 303-313, 2001
- DELGADO, W.; AGUIRRE, J.M. Las micosis orales en la era del sida. ***Ver. Iberoam Micol.***, v.14, p.14-22, 1997.
- FISHER, F.; COOK, N.B. **Fundamentos e diagnóstico** Rio de Janeiro; Revinter, p.337, 2001.
- FOX, P.F.Y., FLYN, A.F. In *Advanced Dairy Chemistry Vol 1. Proteins* (Larson, B.L. ed). P.255-281. **Elsevier Applied Science. London and New York, 1992.**
- GERMAIN, G.S.T.; LAVERDIÈRE, M.; PELLETIER, R.; BOURGAULT, A.M.; LIBMAN M.; LEMIEUX, C.; NOEL, G. Prevalence and Antifungal susceptibility of 442 candida isolates from blood and normally sterile sites : results of 2 years (1996-1998) Multicenter surveillance study in Quebec, Canada, ***J.Clin. Microbiol.***, 2001. V:39., 949-953.
- GHANNOUM, M.A.; Abu Eltem, K. Correlative relationship between proteinase production adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans* ***J Med. Vet. Mycol.***, v.4, p.228-247. 1986.
- GHANNOUM, M.A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. ***Clin. Microbiol. Rev.***, n.13, p.122-143, 2000.
- GHANNOUM, M.A. Phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. ***Clinical microbiology Reviews.*** 2000; 13(1): 124-134.
- GHANNOUM, M.A.; ABU-ELTEEN, K.H. Pathogenicity determinants of *Candida*. ***Mycoses***, v.33, p.265-282. 1990.
- GOES, V.F.F; Ação de extratos, óleos essenciais e frações isoladas de plantas Mediciniais sobre a formação do biofilme em candida SSP. Tese. 2009, Unicamp. São Paulo.
- GUSTAFSON, K.S.; VERCELLOTTI, G.M.; BENDEL, C.M.; HOSTETTER, M.K. Molecular mimicry in *Candida albicans*. *I.Clin. Invest.* 87: 1991, 1896-1902.
- GROHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulosic substrates to ethanol, In **Saddler JN, editor.** *Bioconversion of forest and agricultural plant residues.* Wallingford, UK: CAB International. P.183-209, 1993.
- HANULA, J.; SAARELA, M.; DOGAN, B.; PAATSAMA, J.; KOUKILA-KAHKOLA, P.; PIRINEN, S.; ALAKOMI, H.L.; PERHEENTUPA, J.; ASISKAINEN, S. Comparison of virulence factors of oral *Candida dubliniensis* and *Candida Albicans* isolates in healthy people and patients with chronic candidosis. ***Oral Microbiol Immunol.*** 2000, 15(4) 238-44.
- HOLMSTRUP, P.; SAMARANAYAKE, L.P. Acute and AIDS related oral candidoses. In:

- Samaranayake LP, Mac Farlane TW. **Oral Candidosis**. London: Wright; 1990. cap. 8, p. 133-55.
- KON-CHUNG, K.J.; LEHMAN,D.; GOOD, C.; MAGEE, P.T.Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, v.49, p.571-575., 1985.
- HUBE, B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl proteinases **Curr. Top. Med. Mycol**, v.7, p.55-69, 1996.
- HUBE, B.; NAGLIK, J. *Candida albicans* proteinases: Resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**, v.147, p. 1997-2005, 2001.
- KRCMÉRY, J.R.; KOVACICOVÁ, G. The Slovak Fungaemia Study Group. Longitudinal 10-year prospective survey of fungemia in Slovak Republic: trends in etiology in 310 episodes. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 2000; 36:7-11.
- KRETSCHMAR, M.; HUBE, B.; BERTSCH, T.; SANGLAARD, D.; MERKER, R.; SCHORODER, M.; HOF, H.; NICTERLEIN, T. Germ tubes and Proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. **Infection and Immunity**.1999; 67(12): 6637-6642.
- MACDONALD, H. *Candida*: The hidden Derrent to Breast-Feeding. **Can Nurse**; 9,(9) p.27-30.; 1995.
- MACDONALD, F. Secretion of inducible proteinase by pathogenic *Candida* species. **Sabourandia**, v.22, p.79-82, 1984.
- MAGO, N.; KHULLER, G.K.: Subcellular localization of enzymes of phospholipid metabolism in *candida albicans*. **J Med. Vet. Mycol**, n.28, p.355-362, 1990.
- MANGIN, I.; BOUHNNIK, Y.; SUAU, A.; . Molecular Analysis of intestinal microbiota composition to evaluate the effect of PEG and lactulose laxative in humans. **Microbiol Ecol Health Dis.**, v.14, n.54-62, 2002.
- MATSUKI,T.; WATANABE,K.; FUJIMOTO,J.; YUKITO,K.; ADA,T.; MATSUMOTO,K. e TANAKA, R.: Quantitative PCR with 16s rRNA-Gene-Targeteted Species Primers rAnalysis of Human Intestinal Bifidobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. V.70, n. 1,p.167-173.,2004.
- MURRAY, P.R. Manual of Clinical Microbiology.Washington, 1999; 85-93.
- NAGLIK, J.R.; STEPHEN, J.C.; HUBE, B., *Candida albicans* secreted Aspartyl proteinase in Virulence and Pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, n.3, p. 1092- 2172, 1988.
- NEVILLE, B.W.; DANN, D.D.; ALLEN, C.M.; BOUQUOT, J.E. fungal and Protozoal dideases. In : **Oral & Maxillofacial pathology**. Philadelphia, 1995.
- NIEWRTH, N.; KORTING, C. Phospholipase from *Candida albicans*, **Mycoses**, p.361-367, 2001.
- NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G., Microbiologia oral e imunologia ed.. Rio de Janeiro:

Guanabara Kooga; 1997; 102-9,246-54,264-5.

NUCCI, M. Candiduria in Hospitalized Patients: A review the Brasil. *J. Infect. Dis.* 2000, 4 :168-172.

OLIVEIRA, E.E.; SILVA, S.C.; SOARES, A.J.; ATTUX, C.; CRUVINEL, B.; SILVA, M.R. "Killer" toxin sensitivity and production of enzymes by *Candida albicans* isolated from the oral mucosa of patients with cancer, **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.31, p.523-527, 1998.

OLIVEIRA, J.M.; CRUS, A.S.; FONSECA, A. F.; VAZ, C. P.; RODRIGUES, A.; AUREA, F.; SOUSA, J.A.; MAIA, J. Prevalence of *Candida albicans* in vaginal fluid of asymptomatic portuguese women. **J Reprod méd.**, v. 38, n.1, p.41-42, 1993.

OLIVEIRA, M.T.B. Estudo da mucosa bucal de pacientes imunocomprometidos no Estado de Rio Grande do Norte. **Dissertação** (mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1993.

ODDS, F.C. Pathogenesis of Candida infections. **Journal of the American Academy of Dermatology.**1994; 31(3): S2-S5.

PENHA, S.S. Frequency and Enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients with and without denture stomatitis. **Pesq Odont Bras.** 2000, v:14(2), 119-22.

PENHA, S.S. et al. Frequency and enzymatic activity (Proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients, with and without denture stomatitis. **Pesq Odont Bras.** v.14, n.2, p.119-122, abr/jun, 2000.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; JONES, R.N.; SADER, H.S.; FLUIT, A.C.; HOLLIS, R.J.; MESSER, S.A. and THE SENTRY PARTICIPANT GROUP International surveillance of bloodstream infections due to *Candidas* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the Sentry antimicrobial surveillance program. **J clin. Microbiol.** v.39, p.3254-3259, 2001.

PFALLER, M.; CABEZUDO, I.; BALE, M.; GINGRICH, R. Predictive value of surveillance cultures for systemic infection due to *Candida* species. **Eur J Clin Microbiol.** v.6, p.628-633, 1987.

PEREIRA, R.C.; OLIVEIRA, M.T.R.; LEMOS, G.C.J. Plantas utilizadas como medicinais no Município de Camps dos Goitacazes-RJ. **Rev. Bras. de Farmagognosia**, v.14; Supl 01, p. 37-40, 2002.

PRICE, F.M.; GENETRYS, I.O., WELACINSON, I.P. Plate method for detection for phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabourandia**, 1982. 20 : 27-34.

RAY, T.L.; PAYNE, C.D. Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: a role for *Candida* acid proteinase. **Infect. immune.**, n.56, p.1942-1949, 1988.

RAY, T.L.; PAYNE, C.D.; SOLL, D.R. Variable expression of *Candida* acid proteinase by "switch-phenotypes" of individual *Candidas albicans* strains. **Clin. Res.**, v.36, p. 687-A, 1988.

RODRIGUEZ-TUDELLA, J.L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Fungemia by yeast: a

multicenter study in Spain. **Rev.Clin.Esp.** 1999; 199: 356-361.

RUCHEL, R.; BONNING-STTZER, B; MARI, A. A synoptical approach to the diagnosis of candidosis relying on serological antigen and antibody tests, on culture and on evaluation of clinical data. **Mycoses**, v.31, p.87-106.; 1988.

RUCHEL, R.; RITTER, B.; SCHAFFRINKI, M.; Modulation of experimental systemic murine candidosis by intravenous pepstain. **Zentrabl Bakteriologie**, v.273, n.3 p.391-403, 1990.

RUCHEL, R.; DE BERNARDIS, F.; RAY, T.L.; SULLIVAN, P.A.; COLEG, G.T. Candida acids proteinases, **J Med. Vet. Mycol**, v.30 (suppl.1), p.123-132, 1992.

RUCHEL, R., TEGELER, R., TROST, M. A comparison of secretory proteinase from different stains of *Candida albicans*. **Saborandia**, 1982; 20: 233-234.

RUCHEL, R.; UHLEMANN, K.; BONING, B. Secretion of acid proteinase by different species of the genus *Candida*. **Zbl. Hyg. I Abst. Orig**, v.255, p.237-248, 1983.

SGARBIERI, V. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de nutrição**. 2004; 17(4):397-409.

SIDRIM, J.J.C., MOREIRA, J.L.B. Fundamentos clínicos e Laboratoriais de Micologia Médica, **Guanabara Koogan**, 287; 1999.

SHIMIZU, M.T.; ALMEIDA, N.Q.; FANTINATO, V.; UNTERKIRCHER, G.S. Studies on hyaluronidase, chondroitin sulphatase, proteinase and phospholipase secreted by *Candida* species. **Mycoses**, v.39, p.161-167, 1996.

SILVEIRA, F.R.X.; BIRMAN, E. G.; BATISTA, J.M. Proteinase and phospholipase activity of *Candida albicans* isolated from oral mucosa of healthy carriers (smokers and non smokers) **Rev. Iber. Micol.**, v.10, p.105-108, 1993.

STENDERUP, P.A. Oral Mycology. **Acta Odontol. Scand**, v.48, p.3-10, 1990.

STAIB, P.; KRETSCHMAR, M.; NICTERLEIN, T.; HOF, H. & MORSCHHÄUSER, J. Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 97, n. 11, p. 6102-6107, 2000.

GERMAIN, G.; LAVERDIERE, M.; PELLETIER, R.; BOURGAULT, A.M.; LEMIEUX, C.; NOEL, G.; Prevalence and antifungal susceptibility of 442 *Candida* isolates from blood and other normally sterile sites : results of a 2-years (1996-1998) multicenter Surveillance study in Quebec, Canada. **J Clin Microbiol**, n.39, p.949-953.2001.

STENDERUP, P.A. Oral Mycology. **Acta Odontol. Scand**, v.48, p.3-10, 1990.

SULLIVAN, D.J.; MORAN, G.; DONNELLY, S.; GEES, PINJON, E.; MCCARTAN, B.; SHANLEY, D.B. *Candida dubliniensis* sp. **Rev. Iberoam Micol.** 1999; 16: 72-76.

TORTORA, G.F.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia. 6. Ed. Porto Alegre: **artemédicas Sul**, 2000. 394-6,544-5, 573.

TRONCHIN, G.; BOUCHARA, I.P.; ANNAIX, V.; ROBERT, T.; SENET, J.M.; Fungal Cell adhesion in *Candida albicans*. **Eur. J. Epidemiol.** 1991. 7: 23-33.

VARGAS, R.A.; GARAIZAR, J.; PONTÓN, J.; QUINDÓS, G. Utilidad de la amplificación

aleatoria de ADN en la diferenciación de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*. **Rev. Iberoam. Micol.** v. 17, p. 10-13, 2000.

VARGAS, K.G.; JOLY, S. Carriage Frequency, intensive of Carriage, and Strains of Oral Yeast Species Vary in the Progression to Oral Candidiasis in Human Immunodeficiency Virus-Positive Individuals. **Journal of Clinical Microbiology**, 2002; 40(2): 341-350.

CAPÍTULO II

MODULAÇÃO DA MICROBIOTA COLÔNICA E SANIDADE DE LACTENTES

RESUMO

A microbiota do intestino desempenha papel importante na saúde humana propiciando barreira à colonização de patógenos (exclusão competitiva), por exercer funções metabólicas importantes, e por estimular o sistema imune. *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. são os dois gêneros mais importantes para a manutenção da saúde. A microbiota intestinal poderá ser qualitativa e quantitativamente alterada pelo tipo de alimento ingerido, chamada modulação nutricional, e pelo uso de anti-inflamatórios, laxantes e antibióticos. Objetivou-se neste trabalho avaliar a composição e evolução da microbiota intestinal de crianças recém nascidas e relacionar ao tipo de amamentação, de parto, com relação à presença de *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., fungos *Clostridium* spp., *Escherichia coli*, além da determinação de aeróbios e anaeróbios totais. Inicialmente foi avaliada a evolução da microbiota intestinal de três lactentes a cada sete dias, por 12 semanas consecutivas. No momento da primeira coleta as crianças denominadas P2, P8 e P10 estavam respectivamente com 23, 10 e 30 dias de vida, e foram submetidas à alimentação com leite materno juntamente com leite formulado, com leite materno exclusivo e a criança P10, com leite de vaca. Todas as crianças nasceram de parto do tipo cesariano. Não foi detectada diferença significativa ($p > 0,05$) na média do número de bifidobactérias e de bacteroides dos três lactentes, enquanto a colonização por lactobacilos foi maior no lactente P2 alimentado com leite materno e leite em pó modificado quando comparado aos demais ($p < 0,05$). Ademais, a colonização por *E. coli* e por leveduras neste lactente, foi significativamente menor ($p < 0,05$), embora as contagens de *Clostridium* spp. tenham sido maiores. Também não foi detectada diferença significativa na comparação entre as contagens dos diferentes grupos microbianos entre os lactentes P8 (alimentado com leite materno exclusivo) e o P10 (alimentado com leite de vaca exclusivo) com exceção da contagem de lactobacilos que foi significativamente menor neste último lactente quando comparado aos demais. Em adição avaliou-se a influencia da alimentação e do tipo de parto em 68 neonatos com idade entre sete e 21 dias. Verificou-se influencia do tipo de parto nas contagens de lactobacilos, que foram maiores naqueles nascidos de parto normal. Contagens de lactobacilos em lactentes alimentados com leite em pó modificado (LPM) e leite do peito (LM) e nascidos de parto normal foram significativamente superiores ($p < 0,05$) aquelas dos nascidos de parto cesariano, sugerindo uma possibilidade de transferência da microbiota da mãe para a criança. As contagens de lactobacilos estiveram abaixo do nível de detecção do método (1×10^2 UFC/g) em 44% dos indivíduos alimentados com leite do banco de leite humano (BLH) e nascidas de parto normal e em 81% daquelas nascidas de parto cesáreo. Leveduras foram encontradas em todas as amostras, independentemente do tipo de parto ou aleitamento em números que variaram de 1×10^5 a 1×10^{11} . *Candida albicans* (30%) e *C. parapsilosis* (28%) predominaram em ambos os tipos de parto independentemente do tipo de aleitamento com exceção da microbiota de lactentes que receberam LPM nascidos de parto normal, quando predominou a levedura do gênero *Trichosporon* sp. Não foi observada influencia significativa do tipo de parto, nas contagens da microbiota anaeróbica. Verificou-se que a população de bifidobactérias em 36% das amostras fecais de lactentes nascidos de parto normal e em 30% das nascidas de parto cesáreo foi inferior a 1×10^5 por grama. Também foi observado que esta proporção foi menor em crianças alimentadas ao peito (LM), sendo de 10% e 18% das amostras de crianças nascidas de parto normal e cesárea, respectivamente. Conclui-se que além do tipo de parto e aleitamento um outro determinante importante da colonização do intestino de lactentes sejam as condições higiênicas no preparo da alimentação e nos cuidados com o neonato.

Palavras chave: leite humano, leite modificado, prebiótico, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*

ABSTRACT

The gut microbiota plays an important role in providing human health barrier to colonization of pathogens (competitive exclusion), exerting important metabolic functions and stimulating the immune system. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are the two most important genera for the maintenance of health. The intestinal microbiota may be qualitatively and quantitatively altered by the type of food eaten, called nutritional modulation, and the use of anti-inflammatory drugs, laxatives and antibiotics. The objective of this study was to determine the influence of either type of feeding and delivery on both composition and evolution of the gut microbiota of *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Candida spp.*, *Clostridium spp.*, *Escherichia coli*, fungi and total aerobic and anaerobic, in infants. Initially, the evolution of the intestinal microbiota of the three infants, was assessed every seven days, for 12 consecutive weeks. At the time of the first collection the infants, called P2, P8 and P10 were respectively with 23, 10 and 30 days old, and underwent breastfeeding with milk formula, breastfeeding exclusively and cow's milk, respectively. The three children were born by caesarean delivery. There was no difference ($p>0.05$) in the average number of bifidobacteria and bacteroides of the infants, while the colonization by lactobacilli was higher in the infant P2, fed breast milk and formula when compared to the others ($p <0,05$). Moreover, colonization by *E. coli* and yeast in the infant P2, were significantly lower ($p <0.05$), although counts of *Clostridium sp.* were higher. There was also no significant difference in the number of different microbial groups between the infants P8 (exclusively breast-fed) and P10 (fed with cow's milk exclusively) with the exception of the lactobacilli counts that were significantly lower in the latter infant (P10) compared with the others. The influence of diet and type of delivery in 68 neonates aged between seven and 21 days was also evaluated. The type of delivery influenced the counts of lactobacilli, which were higher in those born vaginally. Counts of lactobacilli in infants fed with LPM and LM and born vaginally were significantly higher ($p <0.05$) than those born through a cesarean, suggesting a possibility of transference of mother microbiota to child. Lactobacilli counts were below the detection level of the method (1×10^2 CFU/ g) in 44% of individuals fed with BLH's milk and born vaginally and 81% of those born by cesarean section. Yeasts were found in all samples, regardless of type of delivery or feeding, in numbers ranging from 1×10^5 to 1×10^{11} . *Candida albicans* (30%) and *C. parapsilosis* (28%) were predominant in both types of delivery independently of the type of feeding with the exception of the microbiota of infants that received LPM who were born vaginally, where prevailed the yeast of the genus *Trichosporon sp.* There was no significant influence of type of delivery, in the counts of anaerobic microbiota. It was found that the population of bifidobacteria in 36% of the fecal samples of infants born vaginally and in 30% of those born by cesarean was less than 1×10^5 per gram. This proportion was lower in breast-fed infants (LM), with 10% and 18% of the samples of children born by vaginal delivery and cesarean, respectively. It is concluded that besides the type of delivery and breast-feeding, another important determinant of colonization of the intestine of infants are the hygienic conditions in food preparation and newborn care.

Key words: human milk, modified milk prebiotic, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*

1. INTRODUÇÃO

A microbiota do intestino desempenha papel importante na saúde humana, propiciando barreira à colonização de patógenos (exclusão competitiva), por exercer funções metabólicas importantes (fermentação de fibras não digeríveis, produção de ácidos graxos de cadeia curta e de vitamina K), e por estimular o sistema imune. *Bifidobacterium* spp e *Lactobacillus* spp são os dois gêneros mais importantes para a manutenção da saúde.

O trato gastrointestinal do recém nascido é estéril ao nascer, sendo rapidamente colonizado por microrganismos do meio ambiente ou da sua mãe. A contaminação com bactérias comensais e outros microrganismos derivaria da vagina, intestino e pele da mãe ou do ambiente e ocorreria logo após o nascimento. Alguns autores encontraram semelhança entre a microbiota vaginal e a microbiota do recém nato. (BRANDT et al, 2008).

No desenvolvimento da microbiota intestinal, vários fatores podem exercer efeito regulador na colonização e na formação do sistema imune adaptativo. A chamada microbiota autóctone ou saprófita depende do tipo de alimento ingerido, se há amamentação com leite materno ou com leite em pó modificado e também dos alimentos líquidos e sólidos que são introduzidos na dieta. Também influencia, o tipo de parto (vaginal ou cesariana) e as condições higiênicas durante o parto.

As fezes dos recém nascidos que se alimentam exclusivamente com leite materno tendem a conter uma quantidade maior de bifidobactérias e lactobacilos e, estas crianças têm uma incidência menor de episódios de diarreia do que as que se alimentam com leite em pó modificado. O pH das fezes também evolui com a idade e tipo de alimentação. Estima-se que por volta do segundo ano de vida, a microbiota residente, com cerca de 200 espécies diferentes, tenha sido estabelecida e se manterá estável por muitos anos (PENDERS et al.(a), 2005, 2006).

A microbiota intestinal poderá ser qualitativa e quantitativamente alterada pelo uso de anti-inflamatórios, laxantes e antibióticos. Estes últimos poderão erradicar microrganismos susceptíveis e estimular a proliferação de oportunistas com *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Pseudomonas* spp, algumas espécies de *Clostridium* spp. e *Candida* spp.

Durante a amamentação, os bebês recebem fatores bifidogênicos através do leite humano, funcionando estes como pré-bióticos e, portanto, favorecendo o estabelecimento de uma microbiota intestinal constituída por bactérias bífidas nestes primeiros meses de vida, respondendo por 95% da microbiota total (FOX e FLYNN, 1992). Estas bifidobactérias inibiriam o crescimento de espécies de *Candida* na biota intestinal do recém nascido. O estabelecimento da microbiota ocorre em dois estágios, sendo o primeiro por contaminação a partir da mãe ou do meio ambiente. A sucessiva colonização dos diferentes habitats bifidogênicos do neonato seria o segundo estágio, em conformidade com os relatos de Milkelsaar e Mandar (1993).

A modulação nutricional durante o desenvolvimento neonatal, afeta, em longo prazo, a imunocompetência do indivíduo (MORO e ARSLANOGLU, 2005). A microbiota do intestino pode ser considerada um sistema adaptável metabolicamente e rapidamente renovável, à medida que novos alimentos são introduzidos na dieta. As bactérias comensais são importantes barreiras de defesa da mucosa intestinal e impedem a colonização por microrganismos patogênicos, e quando isso ocorre, estes são rapidamente eliminados.

Fruto oligossacarídeos (FOS) e Galacto Oligossacarídeos (GOS) são prebióticos cujas atividades bifidogênicas têm sido comprovadas em adultos. Recentemente tem sido desenvolvida nova fórmula infantil para se reproduzir o efeito prebiótico do leite humano. Em

duas experiências consecutivas, foi demonstrado que a suplementação alimentar de fórmulas infantis com uma mistura de GOS e FOS modificou a biota fecal de bebês, incluindo os prematuros, estimulando o crescimento de bifidobacterias. Já nos bebês não-prematuros, o efeito bifidogênico desta mistura prebiótica dependeu da dose, mas também teve um crescimento significativo no número de lactobacilos.

O gênero *Candida*, levedura comensal na pele e mucosas humana e dos animais vertebrados, vem sendo objeto de estudo com relação à classificação taxonômica, virulência e quanto ao seu papel na doença cutânea e sistêmica. A presença de algumas espécies de *Candida* spp está relacionada a quadros de diarreia apresentados por crianças internadas e alimentadas com leite materno e leite em pó modificado, sobretudo em pacientes imunodeprimidos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Composição da Microbiota Intestinal e Importância para a Manutenção da Saúde

O trato gastrointestinal é dividido em várias regiões: boca, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso e ânus (FORSYTHE, 2002).

O intestino é suporte a uma variedade de funções fisiológicas sendo colonizado por um grande número de microrganismos. A colonização do intestino é gradual e inicia no momento do nascimento e continua durante a fase inicial da vida levando a formação de uma microbiota intestinal diferente em cada indivíduo. Este processo facilita a formação de uma barreira física e imunológica entre o hospedeiro e o ambiente, contribuindo para que o trato intestinal mantenha-se livre de doenças.

Com relação à ecologia, pode-se dizer que o trato gastrointestinal abriga uma microbiota de mais de 500 espécies de bactérias e a sua população não se encontra igualmente distribuída. Isto significa dizer que ao longo do sistema digestivo, existem muitas diferenças na colonização, sendo o cólon o local que contém um complexo e dinâmico ecossistema microbiótico (BÚRIGO et al, 2007). O cólon chega a ter uma concentração bacteriana de mais de 10^{11} e 10^{12} unidades formadoras de colônia por grama e, ainda segundo estes mesmos autores, as bifidobactérias são o maior grupo de bactérias no cólon. As bifidobactérias são de extrema importância no complexo ecossistema ativo do trato gastrointestinal do ser humano e de outros mamíferos. Estão distribuídas em diversos nichos ecológicos, razão pela qual a sua presença possui relação com a idade do indivíduo e com a dieta alimentar (SGORBATI et al, 1995), mas são predominantes no trato gastrointestinal de recém nascidos, sendo vitais no estabelecimento da microbiota chamada “autoctone” (SOUSA et al, 2009).

Brandt (2008) realizou trabalho em que pesquisou através de metodologia molecular a microbiota fecal de recém-nascidos saudáveis, em exclusivo aleitamento materno. A autora analisou as amostras fecais das crianças no 2º, 7º e 30º dias de vida, através do sequenciamento do 16S rDNA bacteriano e empregando a técnica de PCR em tempo real (Real Time PCR) para bifidobactérias. Segundo a autora, a diversidade bacteriana aumentou do 2º para o 30º dia, havendo uma predominância de *Escherichia coli* no 2º e 7º dia e de *Clostridium* no 30º dia e verificou a presença de bifidobactérias em todas as amostras de 30 dias.

Bifidobactérias dominam a microbiota natural dos recém natos. A proliferação destas bactérias pode ser estimulada por componentes glicoproteicos da k-caseína, diminuindo a sua proporção, em números, com o progredir da idade. Neste ponto, sabe-se que ocorre também uma estabilização, passando a corresponder a 25% da microbiota total do intestino, ficando atrás apenas dos gêneros *Bacteróides* spp e *Eubacterium* spp (FINEGOLD et al, 1983). Do mesmo modo, registram-se modificações nos perfis das espécies constituintes ao longo da vida, uma vez que o *B. infantis* e o *B. breve*, microrganismos típicos nos recém nascidos, são substituídos nos adultos pela espécie *B. adolescentis*. O *B. longum*, por sua vez, é uma espécie perdurante ao longo de toda a existência do hospedeiro, sendo, por isso, a mais procurada para fazer parte de alimentos funcionais (MITSUOKA, 1990). Os lactobacilos estão distribuídos por vários nichos ecológicos espalhados pelos tratos gastrointestinais e geniturinário, de modo semelhante às bifidobactérias, uma parte importante da microbiota natural.

Hopkins et al (2005) usaram PCR em tempo real para comparar as fezes de 40 crianças durante os períodos de zero a seis meses de idade, sete aos 12 meses e 13 aos 24 meses, alimentadas no peito materno e com mamadeira. Os autores concluíram que o número

de bacteróides e *Desulfovibrio* spp foi mais acentuado durante os períodos de sete aos 12 meses e 13-24 meses para as crianças alimentadas ao seio, enquanto houve uma diminuição no número de *Enterococcus faecalis*, *Clostridium coccooides* e *Faecalibacterium prausnitzii*.

O gênero *Bifidobacterium* spp, com 30 espécies, compreende microrganismos Gram positivos, não formadores de esporos, desprovidos de locomoção, catalase negativos e anaeróbios (SGORBATI et al, 1995). Apresentam várias formas que incluem bacilos curtos e curvados a bacilos em formato de clava ou bifurcados. Das 30 espécies, dez são de origem humana, podendo ser encontrados nos processos de cárie, nas fezes e na vagina. As demais espécies são praticamente de origem animal, com exceção de duas que possuem origem em águas residuais e uma cuja origem é o leite fermentado. Esta última, aliás, possui uma boa tolerância ao oxigênio, ao contrário das demais. Segundo Sgorbati et al, (1995), as bifidobactérias estão inseridas entre os Actinomicetos, sendo caracterizadas por um elevado conteúdo de guanina e citosina. São heterofermentativas produzindo além de ácido láctico, também ácido acético e CO₂. São capazes de utilizar glicose e, todas as de origem humana são capazes de usar a galactose, lactose e frutose como fontes carbonadas. Grociani et al (1994) apontaram a possibilidade de algumas espécies serem capazes de fermentar hidratos de carbono complexos como a D-Glucosamina, amilose, amilopectina, etc., sendo a espécie *Bifidobacterium infantis* a única com capacidade de fermentar o ácido D-glucurônico, enquanto algumas cepas de *B. longum* fermentam a arabinogalactana, bem como as gomas arábica, ghatti e tragacantha. A temperatura ótima de crescimento destes microrganismos oscila entre 37°C e 41°C, enquanto que as temperaturas máxima e mínima de crescimento ocorrem respectivamente a 43-45°C e 25-28°C. O pH ótimo encontra-se entre 6 e 7, com ausência de crescimento em valores ácidos de 4.5-5 ou alcalinos de 8 a 8.5 (RASIC & KURMANN, 1983; SGORBATI et al, 1995).

O gênero *Lactobacillus* também faz parte da microbiota saprófita desejável e foi isolado pela primeira vez a partir de fezes de lactentes amamentados no peito materno por Moro (1900). Inicialmente, este pesquisador atribuiu o nome *Bacillus acidophilus* como uma designação genérica dos lactobacilos intestinais. São Gram positivos, geralmente, incapazes de formação de esporos, desprovidos de flagelos e possuem uma forma bacilar ou cocobacilar. São aerotolerantes ou anaeróbios. O gênero compreende aproximadamente 60 espécies, sendo que as mais utilizadas para fins de aditivo dietético são as espécies *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. casei*. O primeiro é a espécie mais comum, sendo Gram positivo com extremidades arredondadas, sendo encontrado na forma de células livres, aos pares e em cadeias curtas. Trata-se de uma espécie pouco tolerante à salinidade do meio, microaerófila. Seu crescimento em meios sólidos pode ser favorecido pela anaerobiose ou pressão de oxigênio reduzida. Uma grande parte das linhagens de *L. acidophilus* é capaz de degradar a amigdalina, celobiose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, manose, sacarose e esculina (NAHAISI, 1986). Parece haver uma melhor utilização de sacarose do que de lactose por parte do *L. acidophilus*, um comportamento atribuído a diferenças nas atividades da β -galactosidase e da β -fructofuranosidase. Enquanto a primeira é uma enzima que faz parte da constituição deste microrganismo, a segunda pode ser induzida. Trata-se de microrganismo heterofermentativo e suas células produzem quase que exclusivamente ácido láctico a partir da degradação da glicose pela via de Embden-Meyerhof-Parnas, embora também possa produzir algum acetaldeído (MARSHAL & COLE, 1983).

As condições ótimas para sua multiplicação são temperaturas de 35-40°C, embora possa se desenvolver a 45°C e, quanto ao pH, prefere valores de pH de 5.5-6.0. Sua tolerância à acidez do meio varia entre 0.3 e 1.9% (v/v) de acidez titulável (MACEDO et al, 2008).

Existem, no entanto, vários fatores ambientais que podem afetar esta relação, como o pH, disponibilidade de oxigênio, nível de substratos específicos, presença de secreções e interações com bactérias (SALMINEN et al, 1996). De acordo com Búrigo et al, (2007) o

equilíbrio entre as espécies de bactérias residentes promove a estabilidade da população microbiana em condições normais. No entanto, em situações particulares como nos casos de diarreias agudas ou em casos de intervenções com dietas restritivas e em casos de tratamento antimicrobiano, o equilíbrio pode ser rompido e haver a permissão de crescimento excessivo de espécies com potencial patogênico, como *Clostridium difficile*, associado com colites pseudomenbranasas.

Microrganismos potencialmente patogênicos como leveduras do gênero *Candida* spp também podem estar presente em número elevado em caso de disbiose intestinal. Este gênero é classificado em doze grupos fisiológicos, com base na assimilação de substâncias como açúcares e fontes de nitrogênio. A distribuição nos 12 grupos fisiológicos implica no conhecimento do comportamento nutricional do isolado que está sendo investigado e esta divisão ocorre segundo Kurtzman & Fell, (1998) por facilidade de identificação. A maioria das espécies de interesse clínico humano encontra-se alocada no grupo VI.

As espécies do gênero *Candida* apresentam-se, à microscopia, como leveduras redondas, ovóides ou alongadas, sendo que algumas espécies podem produzir hifas, pseudohifas e clamidoconídeos, como a *C. albicans*, sendo por isso considerada dimórfica (NEWPORT & AGABIAN, 1997 e COL, et al,2009) Sua morfologia é também caracterizada pela natureza dimórfica, incluindo a forma micelial e a de levedura. Essa mudança, que ocorre tanto *in vivo* quanto *in vitro*, é uma característica com implicações na patogênese e no diagnóstico das infecções causadas por essas leveduras (MADIGAN et al., 1996; DIEZ-OREJAS et al., 2001).

Diversas espécies de *Candida* são naturalmente encontradas vivendo como comensais no organismo de indivíduos com sistema imunológico normal, numa proporção de 47 % na cavidade oral, 34 % na região retal e 23 % na cavidade vaginal, sem causar infecções aos seus hospedeiros, ainda que por vezes sejam detectadas em número elevado (ODDS, 1994 e PEREIRA, 2002). A espécie isolada com mais frequência do trato gastrointestinal é *C. albicans*, seguida por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata* (MURRAY, 1999; BORG-VON ZEPELIN et al., 1993; SULLIVAN et al., 1999 e VARGAS et al., 2000).

Candida albicans possui atributos ligados à virulência como a rápida germinação nos tecidos, produção de protease e de fosfolipase (PRICE & CANSON, 1977; BENNETT et al., 1998; GHANNOUM, 2000; HANNULA et al., 2000; BEIN et al., 2002, ALVARES et al, 2007) e a adesão às proteínas da matriz celular (GUSTAFSON et al., 1991; GOES, 2009 e TRONCHIN et al., 1991). Pela formação de tubo germinativo, podem aumentar o potencial de virulência nas infecções em mucosas e na pele e na disseminação endovenosa (KRETSCHMAR et al., 1999). Os fatores de virulência que possuem, incluem a capacidade de adesão ao tecido do hospedeiro, o potencial para produzir enzimas proteolíticas, principalmente proteases e fosfolipases e a variabilidade fenotípica como resposta às mudanças do meio, conferindo-lhes maior resistência ao sistema de defesa do hospedeiro (POLAK, 1992 e FARIAS, 2007).

Numerosas proteases são produzidas por espécies do gênero *Candida*, inclusive por diferentes estirpes de uma mesma espécie (TANG & WONG, 1987, ALVARES et al, 2007) e também por uma mesma estirpe. A natureza e a função das proteases excretadas por *Candida albicans* tem sido os principais objetivos de estudos fisiológicos e bioquímicos desta espécie. Estas enzimas possuem atividade proteolítica em pH ácido (2,0 a 4,0), com uma especificidade bastante ampla, incluindo queratina, albumina, hemoglobina, cadeias pesadas de imunoglobulinas e proteínas da matriz extracelular (RUCHEL et al., 1982; ODDS, 1994 e MARTINS, et al, 2005). As proteases são também excretadas por *C. albicans* quando a albumina bovina é usada como única fonte de nitrogênio, verificando-se apenas diferenças quantitativas entre as espécies (DOUGLAS, 1988).

Segundo STAIB et al. (2000), as proteases ácidas produzidas por leveduras do gênero *Candida* estão envolvidas no processo de invasão tecidual bem como associadas à aderência aos tecidos do hospedeiro. *C. albicans* e *C. tropicalis* causam infecção em pacientes imunocomprometidos por possuírem uma aspartato-proteinase extracelular, que é considerada seu principal fator de virulência (NEWPORT e AGABIAN, 1997 e PAULA, et al, 2007.)

As fosfolipases têm um papel essencial no processo de infecção fúngica, desfazendo a membrana celular e permitindo que a hifa penetre no citoplasma, facilitando a adesão do fungo às células do hospedeiro (SHIMIZU et al., 1996), graças a sua capacidade de degradar os fosfolípidos, que são as estruturas essenciais da maioria das biomembranas (MAGO & KHULLER, 1990; RIBEIRO, et al, 2004 e GOES, 2009).

Atualmente se sabe que outras espécies de *Candida* como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitanae* e *C. krusei* também produzem fosfolipases extracelulares (BARRET-BEE et al., 1985 e CROCCO, et al, 2004).

2.2. Probióticos

Probiótico é um termo de origem grega que significa “para a vida”. O termo tem sido empregado de formas diferentes ao longo dos últimos anos. Inicialmente foi empregado como descritivo de compostos ou extratos de tecidos que seriam capazes de estimular o crescimento (LILLY & STILWELL, 1965). Posteriormente, Parker (1974) definiu o termo como relativo a organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal. Tal definição, ainda considerada insatisfatória, devido ao fato da palavra “substância” denotar a inclusão de suplementos como os antimicrobianos, por exemplo, acabou sendo aumentada, por (HAVENAR e VEID, 1992), que define como microrganismos viáveis que exibam efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro, após a ingestão, como consequência da melhoria das propriedades da microbiota autoctone.

Os probióticos, como microrganismos vivos oferecidos como suplemento alimentar, atuam no intestino do organismo hospedeiro, regulando a biota bacteriana local e, dessa forma, agem melhorando a permeabilidade gastrointestinal e aumentam a resistência da mucosa contra a penetração de bactérias nocivas (OLIVEIRA e MIYOSHI, 2005).

O conceito de alimentação funcional é baseado em se explorar o potencial de saúde contido nos alimentos para deter o aumento das doenças crônicas na população. E o crescente interesse pelo tema “probióticos”, assim como pelos alimentos funcionais de maneira geral, está diretamente relacionado com a crescente valorização da qualidade de vida e da prevenção de doenças particularmente nas sociedades afluentes. A partir deste ponto, surgiu a definição probióticos. Esses são suplementos microbianos vivos que, se ingeridos melhoram o balanço microbiano do intestino do hospedeiro. Por sua vez a palavra prebiótico é dada a um ingrediente alimentar não degradável pelas enzimas digestivas que podem promover a seleção de espécies bacterianas benéficas para o hospedeiro, ou seja, seria uma substância que favoreceria o crescimento da estirpe probiótica no intestino. Os microrganismos, até o momento, bem caracterizados como sendo probióticos pertencem ao grupo das bactérias lácticas, assim denominadas por fermentarem açúcares produzindo ácido láctico, e incluem fundamentalmente Lactobacilos (Gênero *Lactobacillus*) e Bifidobacterias (Genero *Bifidobacterium*). Os prebióticos conhecidos são todos derivados de carboidratos. É exatamente no trato intestinal onde tais bactérias terão a importante função de agir em prol da saúde do hospedeiro. O estômago humano possui altos níveis de acidez que atuam de modo a eliminar as bactérias indesejáveis e também a digestão dos alimentos. O nível do pH normal de um estômago humano fica em torno de 2, muito mais ácido do que um limão. Assim sendo as bactérias probióticas tem de “lutar” para sobreviver neste meio extremamente ácido e chegar ao trato intestinal ainda vivas. (SAMPAIO, 2001).

Um aspecto fundamental a ser considerado quando os probióticos são estudados refere-se à composição da microbiota intestinal do lactente amamentado ao seio, que é mais rica em bifidobactérias e em lactobacilos do que as alimentadas com leite de vaca. Pode-se inferir que a flora observada em crianças em aleitamento natural constitui-se a mais adequada para a saúde, pelo menos na faixa etária em questão. Por outro lado, dois pontos cruciais para eficácia de uma terapêutica dos probióticos continuam sendo questionadas. A capacidade deste microrganismo resistir ao poder bactericida do suco gástrico e da bile e sua capacidade de promover uma colonização duradoura do intestino; apesar que algumas espécies de probióticos utilizadas na clínica, já esta bem demonstrado que são capazes de alcançar o intestino grosso e assim podem ser recuperadas nas fezes de pacientes e voluntários. Desta forma, mostra-se que alguns destes microrganismos são capazes de resistir intactos as barreiras gástricas intestinais (GENEROSO,2010.).

Considerando a importância da microbiota intestinal para manutenção da saúde, a ingestão de microrganismos selecionados para modulação da microbiota colônica, tem sido recomendada. Os probióticos são suplementos microbianos viáveis que tem impacto benéfico na saúde humana. Pesquisadores têm comprovado estas propriedades, especialmente em crianças e os efeitos mais significativos incluem a prevenção e tratamento da diarreia, devido ao uso de antibióticos e a diarreia ocasionada por rotavírus e fungos e a prevenção das alergias. Dentre as bactérias probióticas, as bifidobactérias parecem ser as mais promissoras, seguidas das bactérias lácticas, que favorecem o crescimento saudável das espécies de bifidobactérias e suas atividades específicas. Portanto, a viabilidade é uma importante propriedade probiótica que deve ser enfatizada para se atender a este critério. Para probióticos futuros, os requisitos mais importantes incluiriam um benefício clínico demonstrado apoiado pela compreensão mecanicista do efeito sobre a população alvo e funções imunes (FERREIRA, 2010). Segundo Morais e Jacob, (2007) informações sobre a genômica e um melhor conhecimento da composição microbiana e suas anormalidades devem servir como base para a seleção de novos probióticos para o uso em populações específicas de lactentes.

Segundo Sousa et al. (2009), o crescente emprego de bactérias probióticas na dieta tem como meta, dentre outras, a regulação imunofisiológica promovida pela modulação da microbiota intestinal.

Particularmente com relação às bifidobactérias, segundo Búrigo et al. (2007) as mesmas exercem diversos efeitos benéficos ao hospedeiro, tais como a fermentação de substratos, resultando na formação de ácidos graxos de cadeia curta, redução do pH (que exerce ação bactericida), diminuição dos níveis séricos de amônia devido a fermentação de proteínas, participação na produção de vitaminas do complexo B e influência na resposta imune. Possuem, ainda, a capacidade de exercerem um efeito inibitório sobre o crescimento de outras espécies, o que leva a um menor risco de invasão e colonização por bactérias patogênicas para o organismo humano, o que provavelmente deve-se, segundo estes mesmos autores, à produção de acetato e de lactato.

Algumas bactérias do gênero *Lactobacillus* também são usadas como probióticos. Tratam-se de microrganismos homofermentativo e suas células produzem quase que exclusivamente ácido láctico a partir da degradação da glicose pela via de Embden-Meyerhof-Parnas, embora também possa produzir algum acetaldeído. São mais resistentes à acidez que as bifidobactérias e por isso colonizam o intestino delgado (MARSHAL e COLE, 1983).

2.3. Prebióticos

Os prebióticos são definidos, numa expressão introduzida por Gibson e Robertfroid (1995), como ingredientes alimentares não digeridos que resultam em benefício do hospedeiro, por estimularem seletivamente o crescimento e/ou ativação de uma ou de um

número limitado de bactérias do cólon. São, então, ingredientes alimentares não digeríveis (por exemplo, a oligofrutose) que passam a estimular seletivamente o crescimento de espécies bacterianas benígnas, presentes no intestino, como os lactobacilos e as bifidobactérias.

Os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis benéficos ao hospedeiro por estimularem seletivamente a proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon. Adicionalmente, o prebiótico pode inibir a multiplicação de patógenos, o que garante benefícios adicionais à saúde do hospedeiro (SAAD, 2006).

Os prebióticos, quando ingeridos, resistem à hidrólise salivar, pancreática e intestinal e também ao suco gástrico. Por essa razão, chegam ao intestino na sua forma original, intactos, e são fermentados por bactérias naturalmente presentes no intestino. Conseqüentemente, exercem efeito positivo na saúde do hospedeiro apresentando um efeito prebiótico (ROBERFROID, GIBSON e DELZENNE, 1993).

No intestino grosso, os prebióticos são eficazmente fermentados por bactérias intestinais gerando Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC), como o butirato, o acetato e o propionato. Os AGCC, em especial o butirato, constituem o combustível da célula epitelial do cólon, sendo responsáveis pela geração de energia para o metabolismo celular (ROEDIGER, 1989). Também há redução do pH colônico, o que reduz o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas como os gêneros *Clostridium* e *Pseudomonas* (KOLIDA, TUOHY e GIBSON, 2002).

Dentre os principais prebióticos que têm recebido maior atenção, destacam-se a inulina e os oligossacarídeos, especialmente os frutooligossacarídeos (USTUNOL, 2005).

Crittenden e Playne (1996) definem oligossacarídeos como glicosídeos que contêm entre três e dez monossacarídeos ligados entre si. Entretanto, muitos dissacarídeos apresentam propriedades similares. Outros autores definem oligossacarídeos como carboidrato que possuem um baixo grau de polimerização (de 2 a 20) e conseqüentemente, baixa massa molecular (ROBERFROID e SLAVIN, 2000).

Os oligossacarídeos são açúcares encontrados como componentes naturais em muitos alimentos como frutas, vegetais, leite e mel. Alguns desses não apresentam apenas a função nutricional ou de adoçante, como também exibem atividades fisiológicas, sendo assim denominados de alimento funcional (ALMEIDA e PASTORE, 2004).

Há várias classes de oligossacarídeos, como por exemplo, os galacto-oligossacarídeo. Esses têm atraído atenção, por estarem presente em leite materno. A presença de galacto-oligossacarídeos no leite materno tem influência no estabelecimento da microbiota bífida no trato gastrointestinal de recém-nascidos (GOPAL, SULLIVAN e SMART, 2001).

Os monômeros formadores dos oligossacarídeos do leite humano são D-glicose, D-galactose, N-acetil-glucosamina, L-fucose e ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico). Com poucas exceções os oligossacarídeos isolados do leite humano contêm lactose na sua extremidade redutora. O alongamento da cadeia é conseguido por ação enzimática de ligação dos resíduos de glucosamina por ligação β 1-3 or in β 1-6 l com resíduos de galactose, seguido por adições subseqüentes de galactose por ligações β -1-3 or β -1-4. (KUNZ et al., 2000). A função biológica dos oligossacarídeos está intimamente relacionada a sua conformação.

2.4. Fatores que Influenciam na Modulação da Microbiota Colônica

Crucinsky (2009) realizou estudo sobre a disbiose intestinal e a sua relação com intolerâncias e alergias alimentares e observou que crianças alimentadas exclusivamente com leite materno apresentam melhor colonização intestinal do que as crianças alimentadas com fórmulas infantis e por esse motivo também apresentam menor incidência de alergias alimentares. Fatores como, diarreia, prisão de ventre, pH intestinal, variabilidade de matéria fermentável e interação os componentes da microbiota presente, o uso de antibióticos, irão

influenciar, ao longo da vida, na manutenção da microbiota intestinal. Observou também um melhor controle da função intestinal (melhora tanto da diarreia quanto da constipação intestinal), melhora da tolerância a lactose, diminuição das infecções do trato geniturinário (como candidíase de repetição), melhora da função imunológica, dos sintomas da SII (Síndrome do Intestino Irritável), das DIIs (Doenças Inflamatórias Intestinais), dentre outras.

Existe um perfeito consenso na literatura médica sobre o efeito protetor do leite humano na prevenção de diarreias infecciosas infantis, inclusive por populações vivendo em boas condições sociais. As propriedades antifecciosas do leite humano estão associadas não apenas aos inúmeros fatores de defesa presentes no mesmo, como também ao tipo de microbiota intestinal induzida nos lactentes amamentadas ao peito, que competiria e assim inibiria a proliferação de microrganismos potencialmente patogênicos ao intestino.

Com o objetivo de analisar o conhecimento materno sobre as causas, sinais de desidratação e o manejo da diarreia aguda e ocorrência de hospitalização por complicações destas diarreias em crianças menores de dois anos de idade. Vanderlei e Silva (2004) realizaram um estudo de crianças internadas com diagnóstico de diarreia aguda no Instituto Materno Infantil de Pernambuco. Os autores verificaram que vários fatores influenciaram a ocorrência de diarreia aguda entre os quais as condições sócio-econômicas, o estado nutricional, o tempo de aleitamento materno das crianças, o conhecimento das mães sobre a diarreia aguda e o seu manejo. Houve associação estatística significativa entre o internamento por diarreia aguda e as condições sócio-econômicas precárias, como também a desnutrição e menor tempo de aleitamento, somados ao desconhecimento destas mães sobre como se evitar a desidratação e a utilidade dos sais de re-hidratação oral. Não houve associação estatisticamente relevante para o conhecimento de causa dos manejos das diarreias e dos sinais de hidratação, concluindo que houve associação entre a hospitalização por diarreia aguda e más condições de vida e a ausência do aleitamento materno, que teve como a principal consequência a desnutrição. Os autores sugeriram ainda que a falta de informações das mães reflete a adversidade das suas condições de vida.

2.5. Alimentação com Leite Materno

O leite é o primeiro e único alimento na fase inicial da vida dos mamíferos. Apresenta em sua composição componentes com propriedades fisiológico funcionais importantíssimas, destacando-se várias de suas proteínas, ácidos graxos de cadeia curtas como o ácido butírico na forma de tributirina, minerais como cálcio e fósforo, e vitaminas como a vitamina A e a riboflavina. As proteínas do leite apresentam elevado valor nutritivo e excelentes propriedades funcionais, tanto do ponto de vista tecnológico como fisiológico. O conceito de alimentos funcionais se baseia em explorar o potencial de saúde contido nos alimentos para deter o aumento das doenças crônicas da população (OLIVEIRA ET al, 2002).

O leite humano constitui-se na melhor forma conhecida e documentada de nutrir o recém nascido e protegê-lo de doenças infecciosas. Esta proteção é conferida em grande parte pela influência dos componentes presentes no estabelecimento da microbiota intestinal, devido à presença de substâncias promotoras do crescimento de espécies bacterianas desejáveis como bifidobactérias, e de componentes solúveis com função imunológica, as imunoglobulinas, além da capacidade tamponante reduzida, que desestimula o crescimento de espécies bacterianas indesejáveis (BORBA, 2001).

Especialmente em países em desenvolvimento, a amamentação desde o nascimento tem importância indiscutível pela proteção conferida à criança, frente às várias infecções, reduzindo as taxas de mortalidade (DEWEY et al, 1998). A composição química do leite humano atende às necessidades nutricionais e às peculiaridades fisiológicas do metabolismo do recém nascido. Até o sétimo dia pós-parto, o produto da secreção láctea da nutriz é o

colostro. Este se caracteriza como líquido espesso de coloração amarelada, com densidade correspondente a 1.050 g/cm, coagulável a 72°C, dispondo de glóbulos de gorduras irregularmente distribuídos. O colostro é gradativamente substituído pelo leite, líquido branco e opaco com pouco odor, sabor levemente adocicado, com secreção neutra ou levemente alcalina e de densidade de 1.030 g/cm³ (BRASIL, 2003). Novak et al. (2001) realizaram trabalho com o objetivo de obterem dados sobre a microbiota do colostro humano, visando correlacioná-lo com a possibilidade de que seja uma fonte natural de probióticos, que seriam transmitidos da mãe para o filho durante a amamentação natural. Desta forma, realizaram estudo em 70 amostras de colostro humano ordenhado, para se analisar a presença de microrganismos; mesófilos, termodúricos, psicotróficos, proteolíticos, proteolíticos-psicotróficos, lipolíticos, fungos filamentosos e leveduras, *Staphylococcus aureus*, coliformes totais, coliformes fecais, *Enterococcus* spp. e bactérias lácticas, obtendo os seguintes resultados nas análises microbiológicas: mesófilos, 68,6%; termodúricos, 38,6%; psicotróficos, 8,6%; proteolíticos, 15,7%; proteolíticos psicotróficos, 1,4%; lipolíticos, 4,3%; bolores e leveduras, 11,4%; *Staphylococcus aureus*, 44,3%, coliformes totais, 7,2%; e bactérias lácticas, 37,2%. Foi encontrada uma microbiota diversificada, não tendo sido identificados microrganismos termodúricos-psicotróficos, coliformes fecais e *Enterococcus* spp em nenhuma das amostras. Os autores concluíram que na avaliação conjunta dos resultados a ocorrência de uma microbiota rica em bactérias lácticas poderia funcionar como probióticos, se disponibilizados para os bebês nos primeiros dias pós-parto.

O Ministério da Saúde vem promovendo e desenvolvendo estudos, visando à busca de metodologias alternativas para o controle de qualidade na rotina de dos bancos de leite. O Banco de Leite Humano (BLH) é responsável pela promoção e incentivo ao aleitamento materno, bem como pela execução de atividades de coleta, processamento e controle de qualidade de colostro, leite de transição e humano maduro. A posterior distribuição do leite humano ocorre sob prescrição de médicos ou nutricionistas, obrigatoriamente vinculados a um hospital Materno e/ou infantil. Trata-se de centro especializado, sem fins lucrativos, sendo vedada a comercialização dos produtos distribuídos (BRASIL, 2003)

A coleta de leite humano deve ser realizada com cuidados de assepsia para que não haja contaminação do leite com microrganismos presentes nas porções mais externas da mama ou do ambiente. A pasteurização, até o presente, é o método mais eficaz e recomendado pela legislação brasileira e consiste em utilizar um banho-maria regulado, de forma que a temperatura do mesmo seja suficiente para aquecer o leite a 62,5°C. Após o pré-aquecimento deve-se marcar 30 minutos e resfriar o leite, imediatamente, por imersão em água e gelo \pm 5°C (Ministério da Saúde, 2003).

O número desejável de microrganismos aeróbios e facultativos mesófilos totais é um máximo de 2.000 células/ml, podendo atingir o índice máximo tolerável de 10.000 células por mililitro. Isto quando associados á ausência de patógenos, tais como os pertencentes aos grupos coliformes, estafilococos e salmonelas (LORENZO, 1980). Os microrganismos presentes no leite humano podem ser classificados segundo a sua origem, como contaminantes primários e secundários.

A microbiota de contaminação envolve microrganismos que passam diretamente da corrente sanguínea para o leite, como o HIV, enquanto que os contaminantes secundários são originários da microbiota normal da pele. A microbiota do leite humano pode ser ainda classificada quanto a sua patogenicidade, em normal ou saprófita e patogênica (PASCHOA, 1997).

De acordo com experimento realizado por Eyres et al. (1978), a contagem inicial de *Staphylococcus aureus* de $2,8 \times 10^7$ UFC/ml foi totalmente destruída após pasteurização a 62,5°C por 30 minutos.

Mesmo inativando alguns fatores nutricionais e protetores contidos no colostro do

leite, o processo de pasteurização é necessário, considerando que não há como garantir que a coleta tenha ocorrido em condições higiênico-sanitárias adequadas. É mais seguro distribuir o produto com níveis nutricionais e protetores menores do que produto com microrganismos que podem oferecer sérios riscos (NETO, et al., 2001).

Oliveira e Miyishi (2005) relataram que estudos epidemiológicos e também com modelos experimentais demonstram que o uso de leite materno na alimentação de prematuros diminui a incidência de casos de enterocolite necrosante. Segundo estes autores, vários neonatos prematuros alimentados exclusivamente com formulados apresentam um risco de seis a 10 vezes maior de desenvolver o quadro clínico de enterocolite, quando comparados com as crianças que recebem o leite humano. O leite humano apresenta múltiplos fatores como as imunoglobulinas, eritropoietina, interleucina-10, etc que agem prevenindo o aparecimento de enterocolite. O leite humano, inclusive, possui enzimas que hidrolisam o chamado FAP (Fator de Ativação Plaquetária), por sua vez implicado na etiopatogenia da enterocolite necrosante. Também comentam estes autores que embora o leite humano pasteurizado apresente menor teor proteico do que o leite da própria mãe, a presença de anti-infecciosos e componentes da resposta imune estariam levando a proteção da criança, o que não ocorreria com as fórmulas lácteas que possuem somente os componentes nutricionais. Os recém nascidos alimentados com leite materno, além de receberem passivamente substâncias antimicrobianas e células que dificultam a instalação de doenças diarréicas e suas complicações, recebem um auxílio à instalação da biota intestinal (RAMOS et al, 1985).

Dewey (1998) realizou pesquisa com populações de bom poder aquisitivo, em que crianças amamentadas ao peito e amamentadas por fórmulas e observou que as primeiras obtinham um ganho de peso inferior aos últimos, mesmo após a introdução de alimentos complementares. Segundo o autor, em alguns casos o ganho do comprimento também foi menor entre as crianças amamentadas, e não houve diferença significativa no crescimento linear entre os grupos e o tipo de alimentação. Também observou que o crescimento do perímetro encefálico não diferem de acordo com o tipo de alimentação. Por causa da diferença de ganho de peso, as crianças amamentadas geralmente são mais magras que as alimentadas com fórmulas nos primeiros 12 meses de vida e os lactentes parecem auto-regular o seu consumo de energia a um nível inferior ao consumido por crianças submetidas a alimentação por fórmulas e possuem uma menor taxa metabólica. O autor sugeriu que não existem conseqüências aparentes ou efeitos adversos associados com o menor consumo e menor ganho de peso destes lactentes quando comparados com crianças alimentadas com fórmulas. Os lactentes alimentados exclusivamente com leite materno não diferem no nível de atividade e/ou susceptibilidade a doenças e parecem ter um desenvolvimento cognitivo aprimorado. As razões para as diferenças nos padrões de crescimento conforme o tipo de alimentação requer mais estudos.

Penders et al. (2006a) em estudo dos fatores que influenciam a composição da microbiota intestinal na primeira infância, relataram a presença de bifidobactérias, *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Bacteroides fragilis* e lactobacilos em avaliação desta microbiota realizada por PCR (Polimerase Chain Reaction) em 1032 crianças. Para estes autores, o uso de antibióticos fez diminuir o número de bifidobactérias e de bacteróides, da mesma forma que as crianças alimentadas exclusivamente com leite formulado foram mais colonizadas com *Escherichia coli* e *Clostridium difficile* quando comparadas com crianças alimentadas no peito. Verificaram, também, que casos de hospitalização parecem favorecer a alta prevalência de *Clostridium difficile*, assim como a presença do microrganismo foi maior nas crianças nascidas de cesariana, enquanto possuíam menor número de bifidobactérias e de *Bacteróides fragilis*.

Hengstermann, et AL, (2009), realizaram um estudo de caso-controle onde avaliaram a associação entre a hospitalização por infecção e as praticas de alimentação em crianças que

variavam 3 dias de vida a menos de seis meses, onde 191 mães oriundas de casos de hospitalização por algum tipo de infecção e mais 28 controles saudáveis responderam a um questionário padronizado onde era documentado o histórico da criança e o tipo de alimentação. Crianças alimentadas exclusivamente com formulas apresentam-se como mais prováveis de serem hospitalizadas por qualquer infecção, com pneumonia ou diarreia, por exemplo, quando comparadas com as crianças alimentadas com leite materno exclusivo. Lactentes que não receberam leite materno eram mais prováveis de serem hospitalizados por qualquer infecção, sepsis neonatal, pneumonia e diarreia do que as crianças que receberam leite materno. Em conclusão, os autores demonstraram uma forte associação positiva entre o consumo de fórmula e/ou suplemento de leite e o risco de hospitalização por causas infecciosas.

2.6. Tipo de Parto

Penders et al, (2006), realizaram um estudo com o objetivo de examinar a contribuição das influências externas na composição da microbiota intestinal no primeiro mês de vida. Assim, os autores selecionaram amostras de fezes de 1032 crianças com no máximo 1 mês de vida, cujas as fezes foram analisadas por método de PCR em tempo real para a contagem de *Bifidobacterias*, *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* spp.. Informações sobre algum fator determinante também foi arguido através de questionário repetidos. As associações entre os fatores obtidos do questionário foram analisados com os resultados obtidos do crescimento bacteriano, sendo então comparados. Sendo assim, foi observado que crianças nascidas por cesaria tinham numero menor de bifidobacterias e bacteroides e eram mais frequentemente colonizadas por *Clostridium dificile*, quando comparadas com as nascidas de parto normal, e também observaram que as crianças alimentadas com fórmulas eram mais frequentemente colonizadas por *Escherichia coli*, *C. difficile*, *Bacteroides* e *Lactobacillus* spp. quando comparados com as amamentadas ao peito. A hospitalização e prematuridade também foram associadas com uma maior prevalência de *C. difficile*.

Mitsou et al, (2008) estudaram a sua região geográfica (Grécia), quanto ao desenvolvimento da microbiota intestinal e os padrões de colonização de bacterias lácticas, sobretudo bifidobacterias abordando os três primeiros meses de vida, juntamente com o tipo de parto no decorrer da modulação intestinal das crianças. Foram realizadas coletas de fezes de 82 crianças saudáveis, com quatro, 30 e 90 dias depois de realizado o parto, que foram semeadas em meios seletivos e não seletivos. Foram avaliadas as crianças amamentadas exclusivamente no peito e nascidas de parto normal ou de cesariana. Apesar da alta contagem de aeróbios e anaeróbios, a colonização por lactobacilos e bifidobacterias foi limitada até os três primeiros meses de vida e as crianças nascidas de cesariana foram menos colonizadas por lactobacilos até o quarto dia de vida, o mesmo ocorrendo com o crescimento de bifidobacterias, quando comparadas com as crianças nascidas através do parto normal até o 4 dia de nascimento. Houve predominância de *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii* e *Lactobacillus paracasei* em crianças ate o primeiro mês de vida e diversidade de espécies de *Lactobacillus* em crianças nascidas de parto normal. Além disso, *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium brevis* foram as espécies de bifidobacterias isoladas em crianças de parto normal e amamentadas exclusivamente ao peito. Os autores concluíram que existe um padrão de colonização restrito de bacterias lácticas nos lactentes gregos e que ocorre um atraso no desenvolvimento de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp na microbiota após a cesariana.

2.7. Uso de Medicamentos

O uso de antibióticos pelo lactente foi associado com a redução de bifidobactérias e bacteroides. Observou-se também que crianças que possuíam irmãos mais velhos tinham um número ligeiramente superior de bifidobactérias em comparação com as crianças que não possuíam irmãos. Desta forma os autores concluíram que são fatores determinantes a colonização e a composição da microbiota intestinal, a hospitalização, o modo e tipo de alimentação, o uso de antibióticos. Além disto, crianças nascidas a termo e por parto normal e em casa com alimentação exclusiva ao peito, parece obter uma microbiota intestinal com maior número de bifidobactérias relativa ao número *C. difficile* e *Escherichia coli* (PENDERS et al., 2006b).

2.8. Outros Fatores

Kalliomaki et al. (2003), realizaram estudo comparativo entre famílias demonstraram que a prevalência de doenças atópicas em crianças de determinadas famílias é significativamente menor do que naquelas que não seguem um determinado estilo de vida que inclui o uso restrito de antibióticos, antitérmicos, vacinas acompanhados de uma dieta orgânica, constituída frequentemente de vegetais fermentados espontaneamente por latobacilos, e as crianças nascidas em sua própria casa. Estas características específicas de estilo de vida, também influenciam a composição da microbiota intestinal, logo a importância do estilo de vida no estabelecimento da microbiota intestinal no desenvolvimento de alergias.

Vael et al, (2008) sugeriram a hipótese de que a higiene pode proteger contra a doença atópica através da exposição precoce aos microrganismos, funcionando a microbiota intestinal como um importante regulador pós-natal do equilíbrio intestinal. O estudo teve o objetivo investigar a associação entre a colonização intestinal precoce e o desenvolvimento da asma nos três primeiros anos de vida, através de um teste prospectivo em 117 crianças que foram classificadas como asmáticas. A sibilância durante os três primeiros anos de vida, combinado com a presença de eczema ou com histórico familiar de asma foi incluída como índice positivo. Os autores observaram um índice preditivo positivo de asma em 26 das 117 crianças (22%), cuja microbiota intestinal fora colonizada prevalentemente por *Bacteroides fragilis*. *Bacteroides fragillis* e contagem total de anaeróbios em três semanas foram significativamente maiores em crianças com um índice positivo, em comparação com as que não possuíam e, após um ajuste nos confundidores, uma associação positiva foi encontrada entre a colonização por *Bacteroides fragillis* e o índice preditivo de asma (Odds ratio: 4,4, intervalo de confiança: 1,7-11,8). Dessa forma os autores concluíram que *Bacteroides fragillis* em uma colonização na idade de até três semanas de vida em um indicador precoce de asma possivelmente mais tarde no decorrer da vida destas crianças e, este estudo poderia fornecer meios mais precisos para a orientação de tratamento e prevenção mais eficazes e melhorar a modulação da microbiota intestinal destas crianças.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção de Indivíduos Lactentes e Amostragem

Inicialmente a população estudada foi composta por seis lactentes, três acompanhados durante 12 semanas em seu próprio domicílio nascidos de parto cesariano. Outros três lactentes, nascidos de parto normal foram acompanhados semanalmente por três semanas. O lactente P2 foi alimentado com leite materno e leite em pó modificado (Nan 1® (0-6 meses). Nestlé) a partir da 8ª coleta (72 dias de vida), o lactente P8 foi alimentado exclusivamente com leite materno, fazendo uso apenas de luftal para flatulência, a partir da 4ª coleta (31 dias de vida) e o lactente P10 recebeu leite de vaca fervido até a 7ª coleta (72 dias de vida), quando passou a ser alimentado com leite em pó adicionado de prébióticos (Ninho Prêbio®, Nestlé). Este último lactente apresentou prisão de ventre grave tendo sido medicado com rodoxan® e proteolitic®. As três crianças nasceram de parto por cesariana. Os lactentes P15, P19 e P22 foram alimentados respectivamente com Leite Materno (LM), leite do Banco de Leite Humano (BLH) e Leite em Pó Modificado (LPM).

Devido a dificuldades de acompanhamento de uma mesma criança por período longo (até três meses) a seleção dos outros 68 indivíduos foi baseada no tipo de alimentação, tipo de parto, coletando-se amostras fecais de lactentes com idade entre sete até 21 dias.

A população estudada, foi composta por lactentes atendidos pelo Banco de Leite Humano e pela UTI - Neonatal do Instituto Fernandes Figueira da FIOCRUZ, do Hospital Estadual Rocha Faria e da maternidade de Seropédica. Esta última não dispõe de banco de leite humano, apenas lactários.

O universo amostral foi constituído de:

- Nove crianças nascidas de parto normal a termo amamentado com Leite Materno exclusivo (LM).
- Dez crianças nascidas de parto normal a termo amamentado com leite materno do Banco de Leite Humano (BLH).
- Nove crianças nascidas de parto normal a termo amamentado com leite em pó modificado (LPM).
- Onze crianças nascidas de cesariana a termo amamentado com leite materno exclusivo (LM).
- Dezesseis crianças nascidas de parto cesariana a termo amamentadas com leite do Banco de Leite Humano (BLH).
- Treze crianças nascidas de cesariana a termo amamentadas com Leite em Pó Modificado (LPM).

3.2. Atendimento ao Código de Ética

Os requisitos para atendimento ao código de ética foram aprovados pela Comissão de Ética do Instituto Fernandes Figueira, uma vez que deverão ser coletadas novas amostras de pacientes do referido instituto, sendo uma médica do mesmo, a responsável para o acompanhamento do projeto. Foi aprovado, também, o aceite dos pais dos lactentes quanto à participação do estudo.

3.3. Informações Sobre Determinantes Potenciais

Foram aplicados questionários visando obter informações sobre potenciais determinantes acerca da composição da microbiota intestinal como, por exemplo, tipo de parto, o uso de medicação etc.

3.4. Coleta e Preparo das Amostras

As amostras foram colhidas em duplicata (dois tubos para cada criança). Aproximadamente 1 grama de amostras de fezes frescas foram coletadas em tubos plásticos esterilizados e pré-pesados para as análises microbiológicas por cultivo. Os tubos foram imediatamente colocados em sacos plásticos e o ar retirado com auxílio de uma bomba manual e enviados para o laboratório em caixas isotérmicas dentro de um período de até três horas.

No laboratório as amostras foram diluídas 1:10 (p/v) em caldo Wilkins-Chalgren (Oxoid®) pré reduzido. Foram retiradas alíquotas para o preparo das diluições subseqüentes para cultivo.

3.5. Métodos de Cultivo

3.5.1. Enumeração de diferentes populações bacterianas por contagem em placas

Foram preparadas diluições decimais (até 10^{-8}) em caldo Wilkins-Chalgren (Oxoid®) pré reduzido. Para isto, a 100 ml do caldo era adicionado de 1,0 ml de uma solução contendo 0,25% de cisteína (Vetec®) purgada com nitrogênio e 0,2 ml de solução indicadora de resazurina (Vetec®) a 0,1%. Imediatamente antes do uso, os tubos eram fervidos para expulsão do oxigênio e utilizados quando a coloração do meio passava de rosa escuro para rosa claro.

Alíquotas de 0,1 ml das diluições desejadas foram retiradas com micropipetador aferido em 100 μ l, sendo espalhadas com alça de Drigalski, em duplicata, em placas contendo os seguintes meios:

Determinação de anaeróbios: Agar Wilkins-Chalgren (Oxoid®) para enumeração de anaeróbios totais, Agar Wilkins-Chalgren (Oxoid®) adicionado do suplemento GN (Oxoid®) além de sangue desfibrinado adicionado ao meio esterilizado e resfriado a 50°C na proporção de 50 mL/L para enumeração de *Bacteroides* spp, Agar MRS (Difco Laboratories®) suplementado com antimicrobianos conforme descrito por Harmsen et al. (1999) para *Bifidobacterium* spp., e Agar SPS para *Clostridium* spp. As placas foram incubadas em jarra de anaerobiose, utilizando o sistema comercial de geração de atmosfera anaeróbica (Anaerogen®, Oxoid) a 36°C por quatro a cinco dias.

Determinação de aeróbios e facultativos: Agar LAMVAB (HARTEMINK, 1997) para *Lactobacillus* spp., agar MacConkey para *Escherichia coli* e agar padrão para contagem (PCA, Himedia®) para determinação de aeróbios e facultativos totais. As placas foram incubadas em aerobiose a 36°C por 48 a 72 horas, exceto para lactobacilos, cujas placas foram colocadas dentro de sacos plásticos nos quais o oxigênio foi removido parcialmente por meio de bomba manual e em seguida amarradas.

Colônias representativas de cada meio seletivo foram identificadas em nível de gênero pela morfologia (coloração pelo método de Gram) e testes bioquímicos.

3.5.2. Determinação de leveduras por cultivo

Inicialmente foi preparado um exame a fresco das fezes em potassa ou hidróxido de sódio a 4% para visualização de leveduras e contagem por semeadura de diluições seriadas em meio de Sabouraud acrescido de cloranfenicol (100 mg/l).

3.6. Confirmação da Identidade dos Diferentes Grupos Microbianos Avaliados

3.6.1. Gênero *Bifidobacterium*

Colônias representativas serão confirmadas por testes morfológicos tintoriais e testes bioquímicos de produção de catalase e pesquisa da enzimafrutose-6-fosfato fosfocetolase (F6PPK) que só o gênero *Bifidobacterium* produz, seguindo o procedimento descrito por Scardovi (1986).

3.6.1.1. Pesquisa da enzimafrutose-6-fosfato fosfocetolase (F6PPK) em *Bifidobacterium*

O método de detecção da F6PPK descrito por Scardovi (1986), foi usado para identificação de bifidobactérias em nível de gênero. Os isolados foram cultivados anaerobicamente em jarra de anaerobiose em caldo MRS acidionado de cisteína e incubados a 37°C por 42 horas. As células foram centrifugadas a 14000 x g por 3 minutos. O pellet foi lavado duas vezes com solução de tampão fosfato denominada solução 1 contendo 0,05M tampão fosfato pH 6,5 e 500 mg/L de cisteína.

A seguir as células foram suspensas em 1 mL da solução tampão e rompidas em um sonicador em gelo por dois minutos. O material sonicado de cada isolado foi misturado com 0,25 mL da solução 2 (6 mg de NaF e 10 mg de iodoacetato de sódio em 1 mL de água destilada). Após 30 minutos de incubação a 37°C, a reação foi terminada pela adição de 1,5 mL da solução 3 (13,9 g de hidrocloreto de hidroxilamina em 100 mL água, neutralizada a pH 6,5 no momento do uso com NaOH). A mistura foi mantida por 10 minutos em temperatura ambiente e então adicionada de 1 mL da solução 4 (TCA 15% (p/v) em água) e 1 mL da solução 5 (HCl 4M).

Finalmente foi adicionado 1 mL da solução de desenvolvimento de cor, solução 6 (FeCl₃.6H₂O 5% (p/v) em 0,1 M HCl). O desenvolvimento de cor violácea imediatamente após agitação do tubo indica presença de frutose-6-fosfato fosfocetolase.

3.6.2. Gênero *Lactobacillus*

Colônias típicas e isoladas foram confirmadas por testes morfológicos tintoriais e prova bioquímica de produção de catalase.

3.6.3. *Escherichia coli*

Colônias típicas e isoladas foram confirmadas por testes morfológicos tintoriais e provas bioquímicas de produção de catalase, produção de indol, teste do vermelho de metila, teste de Voges Proskauer e fermentação do citrato.

3.6.4. Gênero *Bacteroides*

Colônias típicas e isoladas foram confirmadas pelas características morfológicas tintoriais e de produção de catalase. Verificou-se a presença de vacúolos lembrando esporos (*Bacteroides* formam cápsula, mas não são esporogêneos).

3.6.5. Gênero *Clostridium*

Colônias típicas e isoladas foram confirmadas por testes morfotintoriais e prova da catalase, além do teste de anaerofilia estrita.

3.6.6. Identificação das leveduras

Para identificação, as colônias foram re-isoladas em meio agar batata dextrose (PDA - Difco Laboratoires®). Foram utilizadas provas de produção de tubo germinativo em soro sanguíneo (2 a 3 horas de incubação) para identificação de *Candida albicans* e *C. dubliniensis* e de formação de clamidoconídios em meio Ágar Rice (Difco Laboratoires ®), para identificação de *Candidas albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida tropicalis*. As amostras isoladas foram submetidas a identificação automatizada através de aparelho VITEK® e também submetidas a identificação em meio cromogênico específico para *Candida* spp. (Chromagar®).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Evolução da Microbiota de Lactentes

Foi avaliada a microbiota intestinal de três crianças por 12 semanas consecutivas. No momento da primeira coleta as crianças denominadas P₂, P₈ e P₁₀ estavam respectivamente com 23, 10 e 30 dias, e foram submetidas à alimentação com leite materno (LM) juntamente com Leite em Pó Modificado (LPM), com leite materno exclusivo e a P₁₀, com leite de vaca (LV). Estas crianças nasceram de parto do tipo cesariano. As contagens de microrganismos aeróbios e anaeróbios durante doze semanas podem ser observadas na Figura 1.

Outras três crianças nascidas de parto normal, foram acompanhadas a cada 7 dias por até 21 dias, denominadas P₁₅, P₁₉ e P₂₂, alimentadas respectivamente com LM, BLH e LPM, cujas contagens podem ser observadas na Figura 2.

Conforme pode ser observado na Tabela 1, não foi detectada diferença significativa ($p > 0,05$) na média do número de bifidobactérias e de bacteroides dos três lactentes. De maneira semelhante, Penders et al. (2006) também não observaram diferença na contagem de bifidobactérias entre crianças alimentadas exclusivamente com leite materno, com leite materno combinado á formulas ou exclusivamente com fórmula.

As contagens de lactobacilos foram significativamente mais altas ($p < 0,05$) para o lactente alimentado com leite materno juntamente com fórmula, quando comparado ao lactente que recebeu leite materno exclusivo ou leite de vaca, sendo que neste último foi encontrado o menor número destas bactérias (Tabela 1). As contagens de lactobacilos em crianças de até 1 ano, foram menores que as contagens de bifidobactérias. Isto foi observado com os lactentes P₈ e P₁₀ (Figura 1) e por outros pesquisadores (PENDERS et al, 2006 e 2005; BRUNSER et al., 2006).

Penders et al. (2006) estudou 1032 crianças com 1 mês de vida do Kaola birth cohort study na Holanda verificou que a colonização com bifidobactérias e do grupo do *Bacteroides fragilis* foi menor em crianças nascidas por cesariana comparada ás crianças nascidas de parto normal, enquanto prevaleceram *Clostridium difficile* e *E. coli*.

Entre os lactentes nascidos de cesariana a colonização por *Clostridium* spp foi maior no lactente P₂, alimentado com leite materno e formula quando comparado aos demais (Tabela 1) enquanto que o número de *E. coli*, foi menor no lactente P₂ quando comparado ao lactente alimentado com leite materno exclusivo (P₈) e com leite de vaca (P₁₀). Provavelmente outros fatores podem ter sido determinantes da maior colonização observada com lactente P₈ com *E. coli* e leveduras, entre os quais o parto por cesariana, o tipo de alimentação da mãe e as condições de higiene.

Segundo Matsumoto et al. (2001), a contaminação das mamas e higiene inadequada é a principal fonte de contaminação das crianças.

Tabela 1: Valores médios de 12 avaliações do Log de unidades formadoras de colônia (UFC/g) dos principais grupos microbianos componentes da microbiota intestinal dos lactentes P₂, P₈ e P₁₀, nascidos de parto cesáreo.

	<i>E. coli</i>	<i>Lactobacillus</i> spp	Leveduras	Aeróbias totais	<i>Clostridium</i> spp	<i>Bifidobacterium</i> spp	<i>Bacteroides</i> spp	Anaeróbias . totais
Lactente P ₂	8,2 B b	10,9 A a	8,5 B b	9,3 A a	10,7 A a	10,2 B a	9,2 A a	10,7 A b
Lactente P ₈	10,9 A a	8,20 C b	10,7 A a	11 A a	9,7 B b	7,6 C a	10,8 B a	11,2 A a
Lactente P ₁₀	10,4 A a	7,5 C c	9,3 A a	10 A a	8,8 B b	9,3 B a	8,9 B a	10 A b

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha e de letras minúsculas diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes entre si ao nível de significância de 5% (p<0,05).

O lactente P2 ao foi a amamentando com leite materno iniciando com o leite em pó NAN a partir dos 44 dias de vida. O lactente P8 foi alimentado com leite materno exclusivo, e o lactente P10 recebeu leite de vaca fervido e ninho Probio dos 72 dias de vida.

É importante salientar também que de acordo com Neto, *et al.* (2001) o leite humano apresenta, *in natura*, elevado índice de contaminação, que pode representar riscos à saúde.

Observou-se que a criança que recebeu leite materno exclusivo não apresentou problemas de desconforto intestinal, como flatulência, enquanto as que receberam leite materno juntamente com leite NAN 1 e leite de vaca tiveram que ser medicadas.

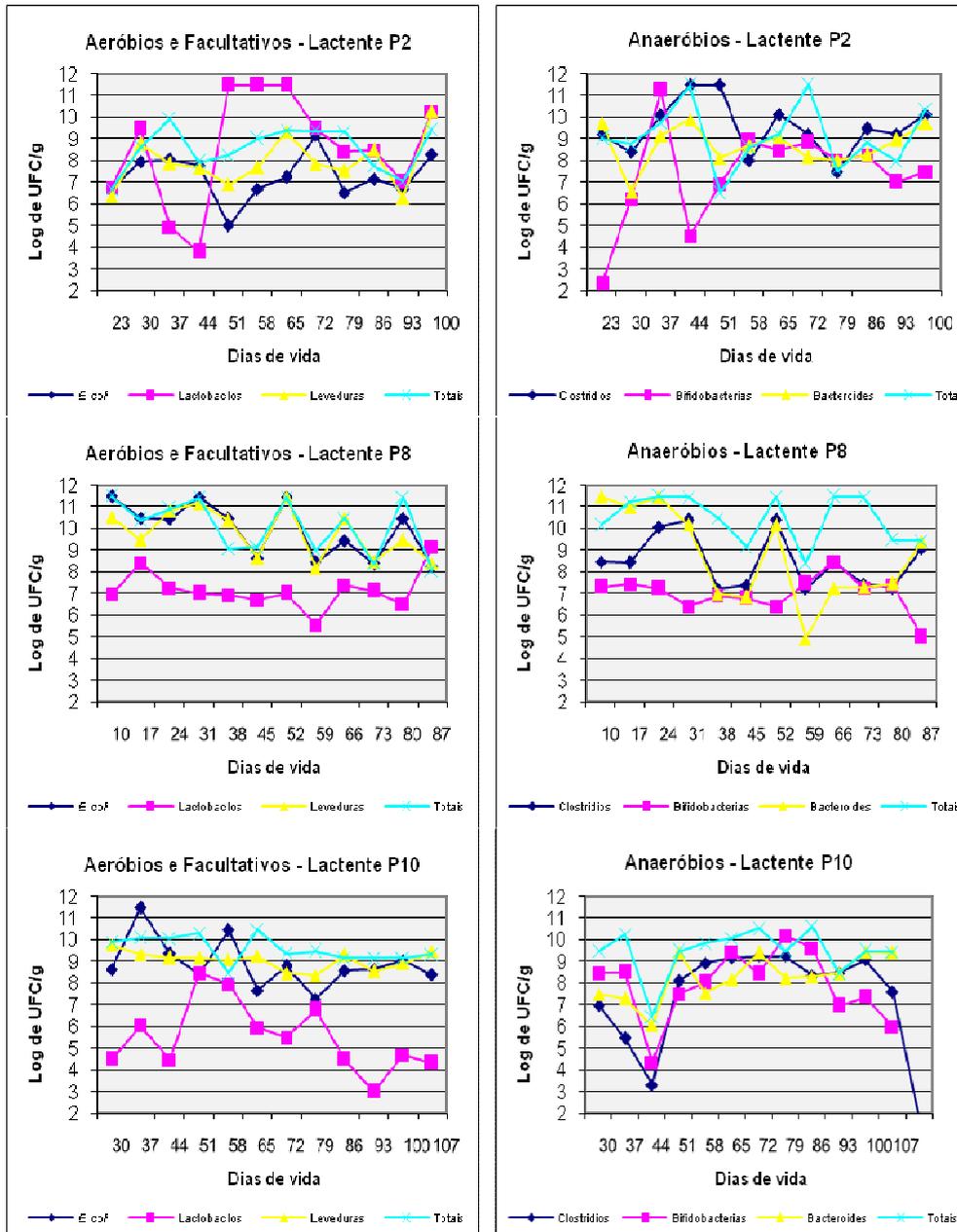


Figura 1: Microbiota fecal de aeróbios e facultativos e anaeróbios dos lactentes P2, P8 e P10 ao longo de 12 semanas de monitoramento. O lactente P2 foi amamentando com leite materno iniciando com o leite em pó NAN a partir dos 44 dias de vida. O lactente P8 foi alimentado com leite materno exclusivo, e o lactente P10 recebeu leite de vaca fervido e ninho Probio dos 72 dias de vida.

Foram acompanhados nas três primeiras semanas de vida, três lactentes nascidos de parto normal, sendo um alimentado com leite materno (P15), outro com leite do banco de leite humano (P19) e um terceiro com leite em pó modificado (P22). No perfil do desenvolvimento dos diferentes grupos microbianos observou-se uma tendência crescente no número de bifidobactérias nos lactentes alimentados com LPM e com LM (Figura 2). Entretanto, na análise estatística destas três observações não foram encontradas diferenças significativas na contagem dos diferentes grupos microbianos relacionadas ao tipo de aleitamento ou mesmo em relação ao tempo, com exceção das contagens de clostrídio que foram maiores aos sete dias no lactente alimentado com BLH (Tabela 2).

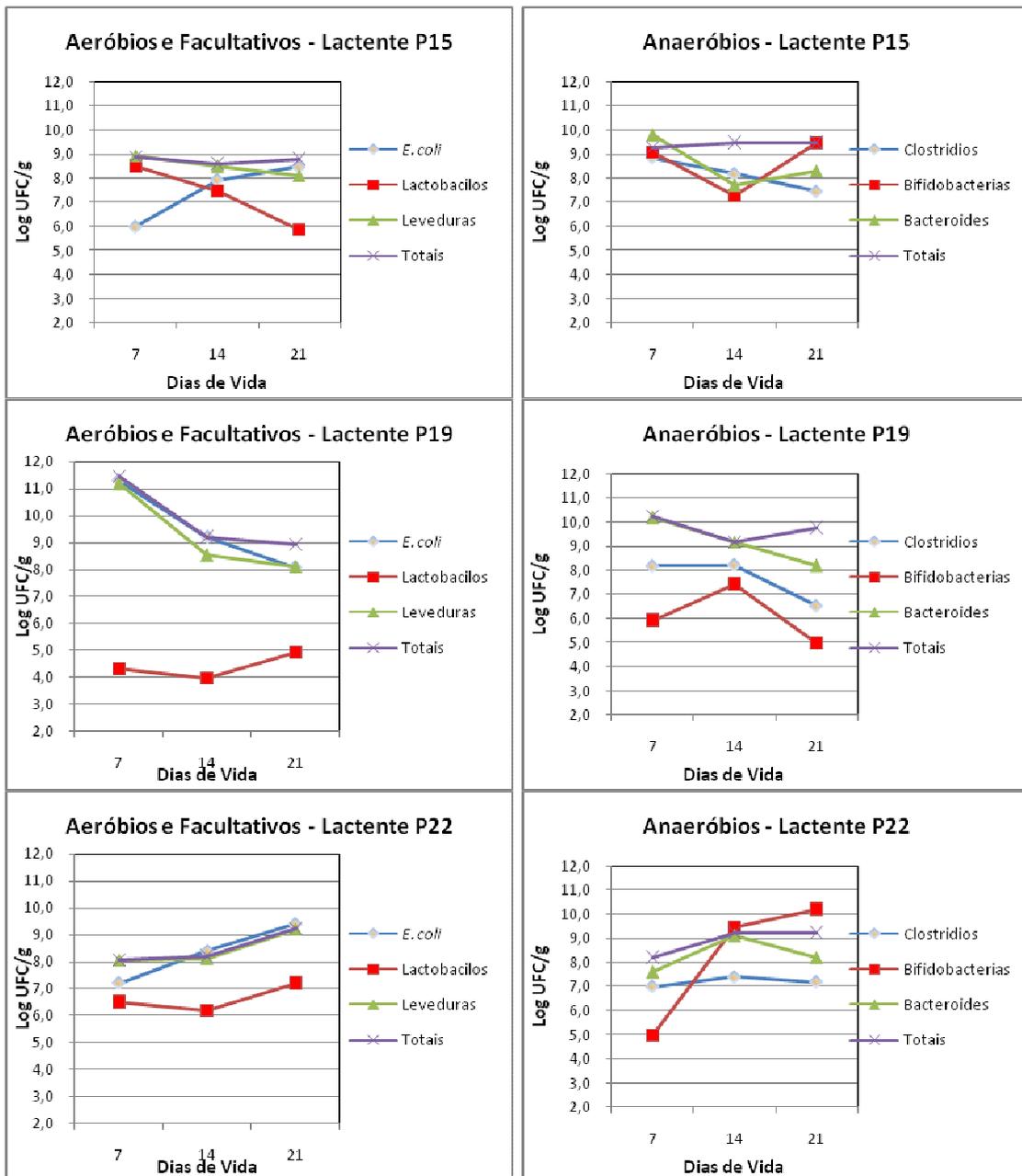


Figura 2: Monitoramento semanal por até 21 dias do nascimento da microbiota fecal de aeróbios e facultativos e anaeróbios dos lactentes P15, P19 e P22, alimentadas respectivamente com Leite Materno (LM), leite do Banco de Leite Humano (BLH) e Leite em Pó Modificado (LPM)

Tabela 2. Valores médios de tres avaliações do Log de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/g) dos principais grupos microbianos componentes da microbiota intestinal dos lactentes P₁₅, P₁₉ e P₂₂, nascidos de parto normal

Microrganismos Aeróbios Totais				
	Tipo de aleitamento		Tempo	
BLH		9,9 a	7 dias	9,9 a
LPM		8,9 a	14 dias	8,6 a
LM		8,7 a	21 dias	8,9 a
<i>E. coli</i>				
	Tipo de aleitamento		Tempo	
BLH		9,5 a	7 dias	8,6 a
LPM		8,7 a	14 dias	8,5 a
LM		7,5 a	21 dias	8,6 a
Leveduras				
	Tipo de aleitamento		Tempo	
BLH		9,3 a	7 dias	9,7 a
LPM		8,8 a	14 dias	8,4 a
LM		8,5 a	21 dias	8,5 a
Lactobacilos				
	Tipo de aleitamento		Tempo	
BLH		4,4 a	7 dias	6,3 a
LPM		6,5 a	14 dias	5,9 a
LM		7,3 a	21 dias	6,0 a
Bactérias Anaeróbias Totais				
	Tipo de aleitamento		Tempo	
BLH		9,7 a	7 dias	9,3 a
LPM		9,0 a	14 dias	9,3 a
LM		9,4 a	21 dias	9,5 a
Bacteróides				
	Tipo de aleitamento		Tempo	
BLH		9,2 a	7 dias	9,4 a
LPM		8,5 a	14 dias	8,7 a
LM		8,6 a	21 dias	8,2 a
Clostrídios				
	Tipo de aleitamento		Tempo	
BLH		7,6 a	7 dias	8,7 a
LPM		7,9 a	14 dias	7,9 a b
LM		8,1 a	21 dias	7,0 b
Bifidobactérias				
	Tipo de aleitamento		Tempo	
BLH		6,1 a	7 dias	7,4 a
LPM		8,9 a	14 dias	8,0 a
LM		8,6 a	21 dias	8,2 a

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes entre si ao nível de significância de 5% (p<0,05).

4.2. Prevalência de Grupos Microbianos e Influência do tipo de Aleitamento

Os valores médios obtidos da contagem de diferentes grupos microbianos e a modulação referente ao tipo de alimentação, tipo de parto é mostrado nas Figuras 3 a 6.

Com relação à microbiota aeróbia foi detectada influência significativa do tipo de aleitamento nas contagens de *E. coli* (Tabela 3) e no número de lactobacilos que também foi influenciado pelo tipo de parto (Tabela 4).

Detectou-se diferença significativa nos números de *E. coli* quando o total de amostras nos dois tipos de parto foi considerado, sendo as contagens em leite em pó modificado (LPM), significativamente menores ($P < 0,05$).

O tipo de aleitamento não influenciou de maneira significativa o número de lactobacilos ($P > 0,05$) em crianças nascidas de cesariana. Entretanto, em crianças nascidas de parto normal, o número de lactobacilos foi significativamente inferior nos lactentes alimentados com leite do banco (BLH) ($P < 0,05$), quando comparadas aos demais (LM e LPM). Além disso, verificou-se influência do tipo de parto nas contagens de lactobacilos, que foram maiores naqueles nascidos de parto normal. Contagens de lactobacilos em lactentes alimentados com LPM e LM e nascidos de parto normal foram significativamente superiores aquelas dos nascidos de parto cesariano, sugerindo uma possibilidade de transferência da microbiota da mãe para a criança. Alguns autores encontraram semelhança entre a microbiota vaginal e a microbiota do recém nato (BRANDT et al, 2008).

Penders et al. (2006) observaram que o número de lactobacilos na microbiota de lactentes alimentados com fórmula foi maior que nos alimentados com leite materno exclusivo. Neste estudo, observaram-se contagens maiores tanto nos lactentes alimentados com LPM quanto com LM, sendo menores nos alimentados com leite do banco (BLH) (Figura 5).

Observou-se 82% e 53% de prevalência de lactobacilos, respectivamente nas amostras de lactentes nascidos de parto normal e cesárea. A alimentação com leite do banco (BLH) foi o fator que mais contribuiu para a baixa colonização com lactobacilos. As contagens de lactobacilos estiveram abaixo do nível de detecção do método (1×10^2 UFC/g) em 44% dos indivíduos alimentados com leite do BLH e nascidas de parto normal e em 81% daquelas nascidas de parto cesáreo. Segundo Penders et al (2006), a prevalência de lactobacilos em amostras fecais de lactentes com um mês de vida foi de 32,4 %.

Os primeiros prebióticos na alimentação humana estão presentes no leite humano. O efeito bifidogênico do leite humano foi relacionado aos oligossacarídeos do leite humano, sendo que a composição destes oligossacarídeos difere de lactante para lactante, sendo dependente do tipo de alimentação da nutriz (MORAIS e JACOB, 2010). Produtos derivados da lactose como lactitol, lactulose e ácido lactobionico influenciam mais o crescimento de lactobacilos que de bifidobacterias. Estes prebióticos aumentam a resistência à bile e a estabilidade ao frio de lactobacilos (SAARELA et al., 2003).

Leveduras foram encontradas em todas as amostras, independentemente do tipo de parto ou aleitamento em números que variaram de 1×10^5 a 1×10^{11} (Figura 3 e 5). *Candida albicans* e *C. parapsilosis* predominaram em ambos os tipos de parto independentemente do tipo de aleitamento com exceção da microbiota de lactentes que receberam LPM nascidos de parto normal, quando predominou a levedura do gênero *Trichosporon* spp. Considerando-se que este gênero é comum no ambiente e na epiderme, é possível que tenha havido contaminação cruzada durante o preparo do leite em pó. A prevalência das diferentes espécies no total de amostras foi de 30% para *C. albicans*, 28% *C. parapsilosis*, 10,5% *Trichosporon* spp. e *C. tropicalis*, 3% de *Malassesia* spp., 1,5% de *C. lusitanae*, *C. guilhermondii*, *Cryptococcus* spp. e *Stephanoascus* spp. Doze por cento da microbiota fúngica não foi identificada.

Tabela 3: Médias do log. do número total de *E. coli* em lactentes nascidos tanto de parto cesáreo como normal alimentados com leite do banco (BLH), leite em pó modificado (LPM) e leite materno (LM).

Tipo de aleitamento	Médias
BLH	9,3 a b
LPM	8,5 b
LM	9,4 a

Tratamentos com a mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P>0,05)

Com relação à microbiota anaeróbica, observou-se influencia significativa do tipo de aleitamento em relação ao número de anaeróbios totais e de bacteróides. A média de anaeróbios totais em crianças alimentadas com LM foi significativamente superior (P<0,05) a obtida com LPM nos partos cesáreas, enquanto que nos normais não houve diferença significativa. De maneira similar, observou-se o mesmo perfil de crescimento nas contagens de bacteróides.

Diferentemente de Penders et al. (2006), que verificaram uma prevalência maior de bifidobactérias e bacteróides em crianças nascidas de parto normal, comparado ao cesáreo, nesta pesquisa não foi observada influencia significativa do tipo de parto, nas contagens da microbiota anaeróbica. Neste estudo, foi verificado que a população de bifidobactérias em 36% das amostras fecais de lactentes nascidos de parto normal e em 30% das nascidas de parto cesáreo foi inferior a 1×10^2 por grama. Também foi observado que esta proporção foi menor em crianças alimentadas ao peito (LM), sendo de 10% e 18% das amostras de crianças nascidas de parto normal e cesárea, respectivamente.

As contagens de bifidobactérias, nos lactentes nascidos de parto normal e alimentados com leite do peito (LM) foram superiores às demais, enquanto naquelas que receberam leite humano ordenhado e pasteurizado (BLH), o número de bactérias bífidas foi significativamente inferior, quando comparado aos outros tipos de aleitamento (Tabela 4; Figura 6). Naquelas nascidas por cesárea não foi observada diferença significativa (Tabela 4).

Estes resultados obtidos *in vivo* corroboram com o observado *in vitro* por Borba e Ferreira (2003) que avaliaram o efeito da pasteurização do leite humano sobre o crescimento de diferentes espécies de *Bifidobacterium*. Foi demonstrado que o processo de pasteurização do leite humano afetou o crescimento das bactérias bífidas. Somente o leite humano não pasteurizado sustentou o crescimento das quatro espécies de *Bifidobacterium*, indicando que, de alguma forma, o calor a que o leite materno é submetido no processo de pasteurização (65°C/30minutos) inibe fatores bifidogênicos, ou produz alguma substância inibidora para este grupo microbiano. Nesta pesquisa também foi observado este efeito negativo decorrente da pasteurização no crescimento de lactobacilos (Tabela 4; Figura 5).

Tanto lactotobacilos como bifidobactérias são beneficiados em ambientes com baixo potencial de redox e a presença de compostos anti-oxidantes no leite humano é importante neste sentido. Anti-oxidantes como lactoferrina, α tocoferol, β caroteno, cisteína, ácido ascórbico, ácido úrico, catalase e glutathiona peroxidase estão presentes no leite humano (NETO, 2001). A maioria destes compostos são termolábeis e podem ter sido destruídos durante o processo de pasteurização do leite.

Perders et. al. (2006), observou que em crianças nascidas de parto normal e a termo, as maiores contagens de *Bacteroides* estavam relacionadas à alimentação com fórmula. Entretanto nesta pesquisa não foi detectada influencia do tipo de aleitamento em crianças nascidas de parto normal e a termo.

Tabela 4: Médias do log. do número de lactobacilos, bifidobactérias, anaeróbios totais e bacteroides em latentes nascido de parto cesáreo e normal alimentados com leite do banco (BLH), leite em pó modificado (LPM) e leite materno (LM).

Lactobacilos		
	Cesariana	Normal
BLH	2,4 a A	3,3 b A
LPM	2,8 a B	5,7 a A
LM	3,8 a B	5,6 a A
Bifidobactérias		
	Cesariana	Normal
BLH	5,6 a A	3,7 b A
LPM	5,7 a A	6,5 ab A
LM	6,2 a A	7,4 a A
Anaeróbios Totais		
	Cesariana	Normal
BLH	9,1 b A	9,0 a A
LPM	9,8 ab A	9,5 a A
LM	10,1 a A	9,7 a A
Bacteroides		
	Cesariana	Normal
BLH	8,1 b A	8,5 a A
LPM	8,6 ab A	8,7 a A
LM	9,5 a A	8,9 a A

Tratamentos com a mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

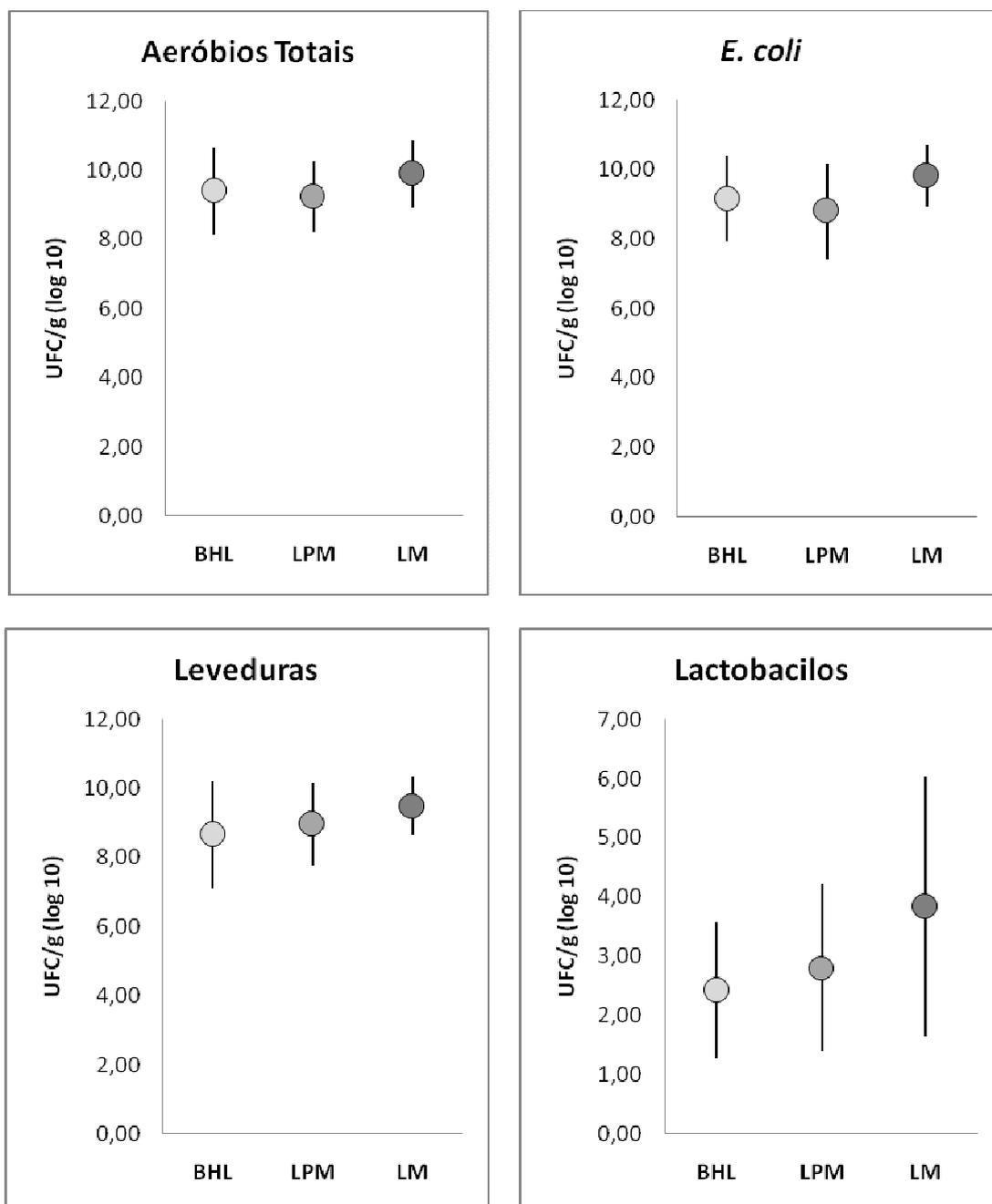


Figura 3: Valores médios e desvio padrão do número de microrganismos aeróbios na microbiota de lactentes alimentados com leite do Banco de Leite Humano (BLH), Leite em Pó Modificado (LPM) e Leite Materno (LM), nascidos de parto cesária.

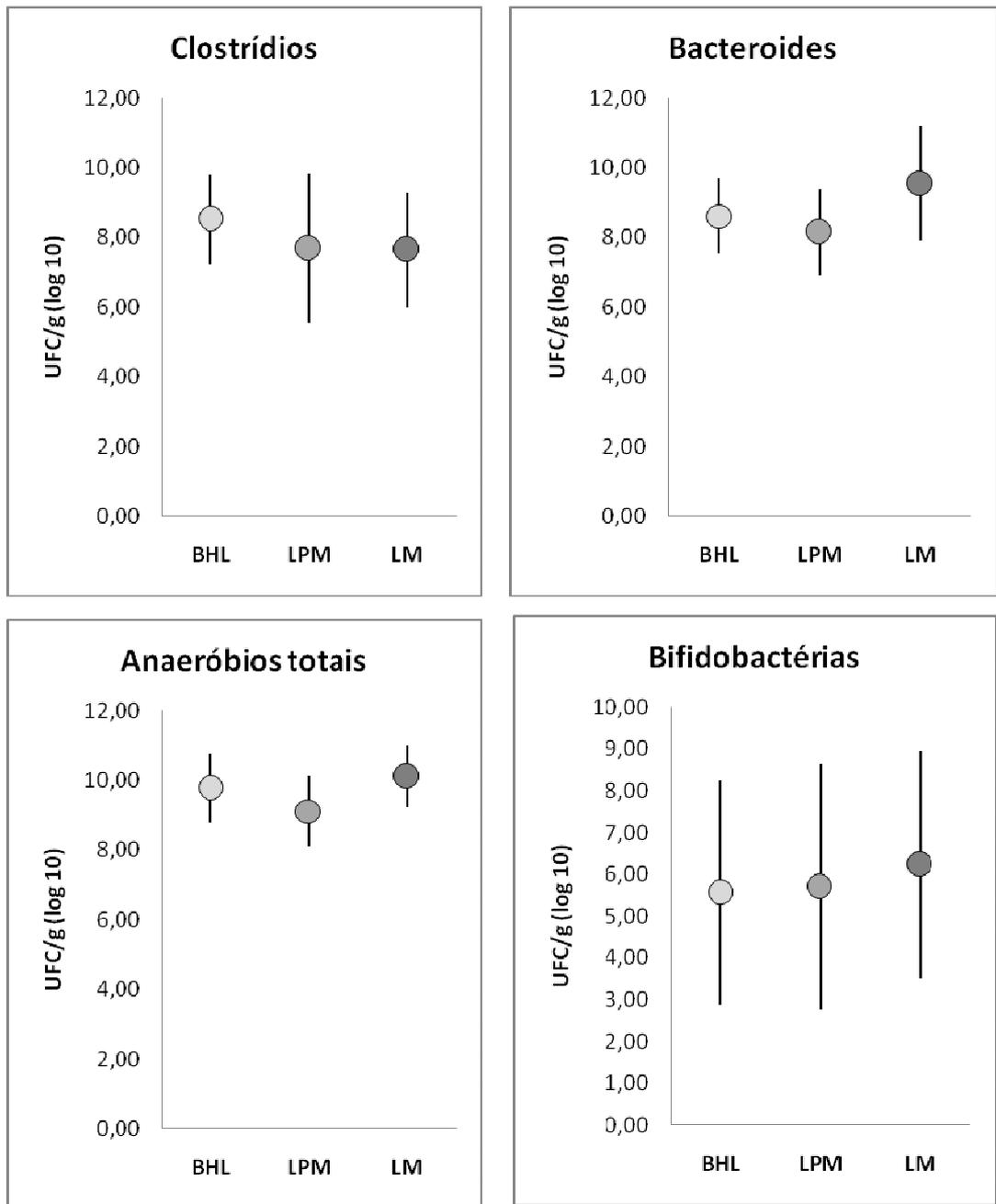


Figura 4: Valores médios e desvio padrão do número de microrganismos anaeróbios na microbiota de lactentes alimentados com leite do Banco de Leite Humano (BLH), Leite em Pó Modificado (LPM) e Leite Materno (LM), nascidos de parto cesária.

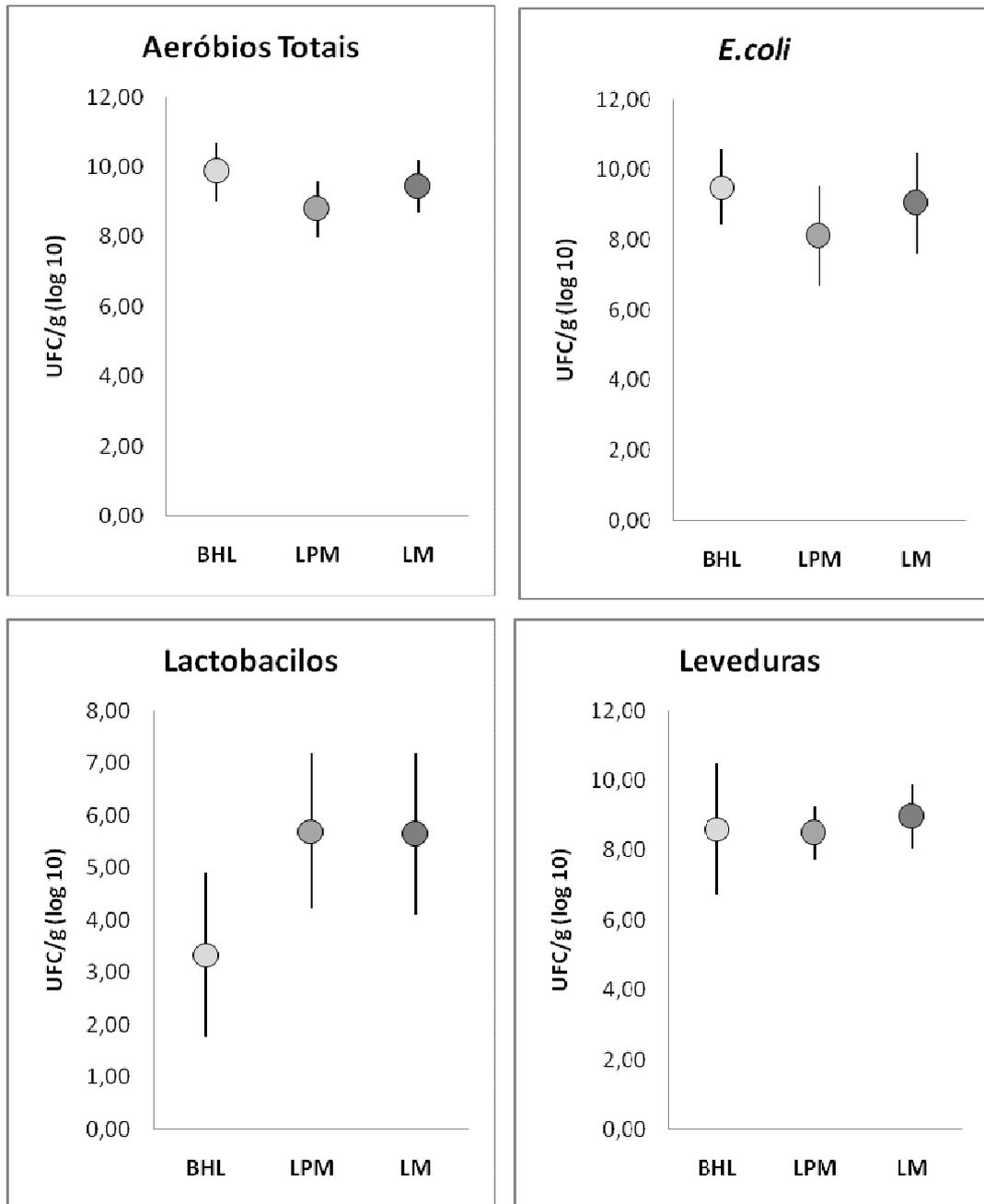


Figura 5: Valores médios e desvio padrão do número de microrganismos aeróbios na microbiota de lactentes alimentados com leite do Banco de Leite Humano (BLH), Leite em Pó Modificado (LPM) e Leite Materno (LM), nascidos de parto normal.

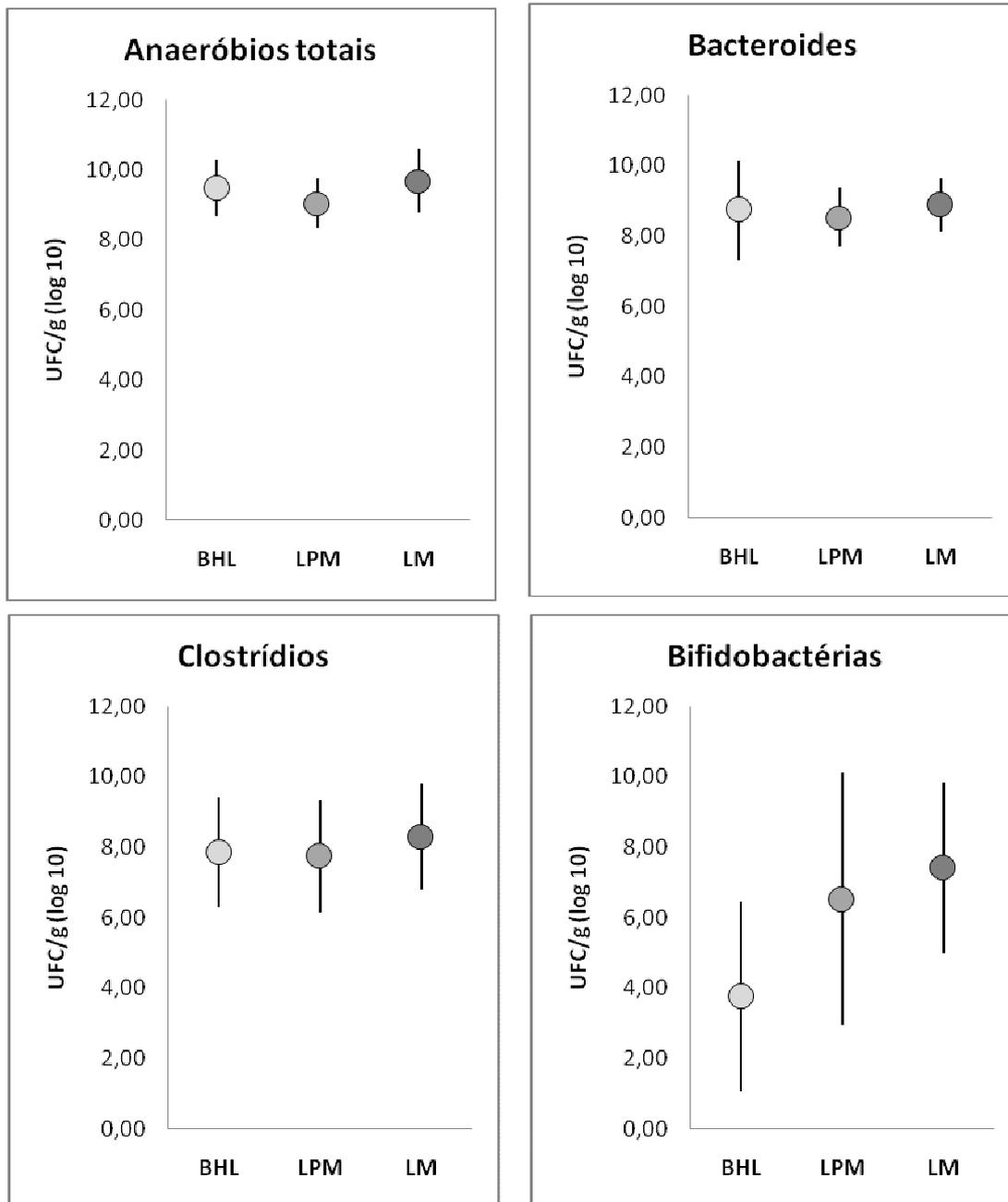


Figura 6: Valores médios e desvio padrão do número de microorganismos anaeróbios na microbiota de lactentes alimentados com leite do Banco de Leite Humano (BLH), Leite em Pó Modificado (LPM) e Leite Materno (LM), nascidos de parto normal

Através de observações microscópicas (Figura 7) e das colônias nas placas de lactobacilos em agar LAMVAB (Figura 8) verificou-se a existência de interação entre as células de leveduras e as células de lactobacilos de maneira similar ao que ocorre durante a fermentação alcoólica, quando lactobacilos contaminantes são atraídos as células das leveduras (CABBRINI & GALLO,1999). Possivelmente ocorre uma interação do tipo competitiva entre as populações de lactobacilos e de leveduras, pois o lactente P2, cuja microbiota intestinal apresentou o maior número de lactobacilos, foi também o que apresentou a menor população de leveduras comparada aos outros lactentes.

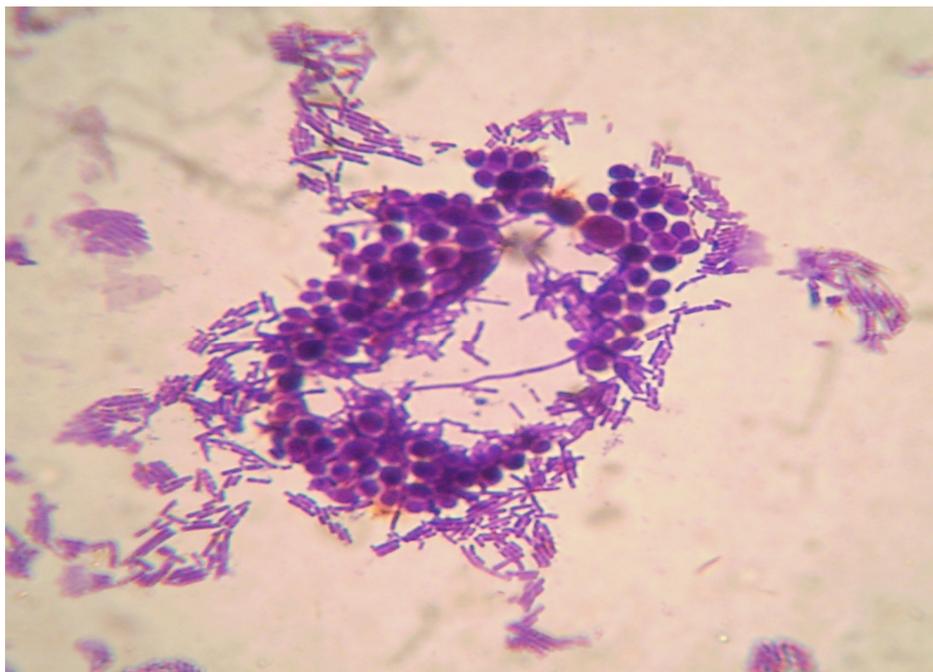


Figura 7: Lactobacilos associados a Leveduras em amostra fecal do lactente P2.

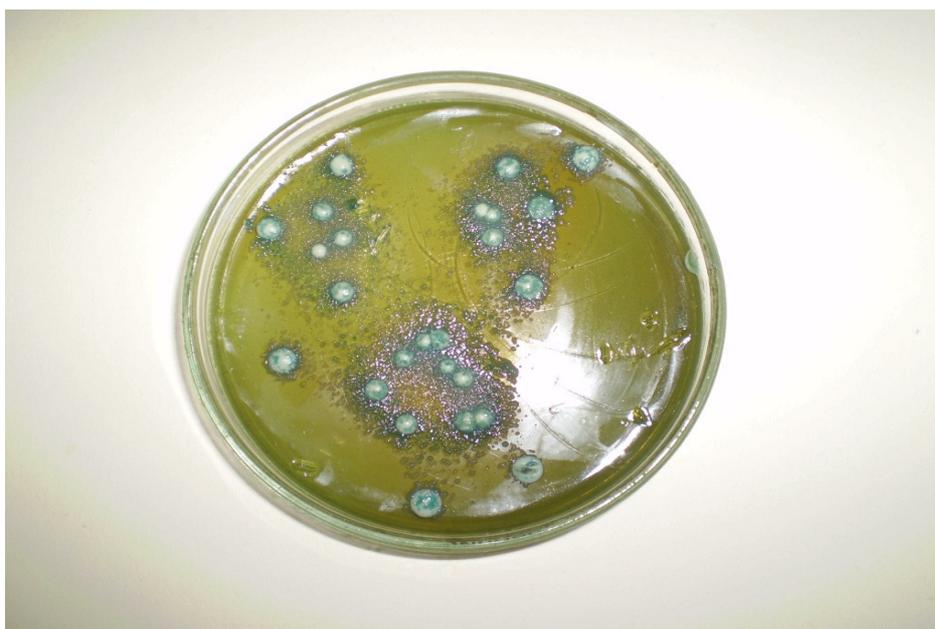


Figura 8: Colônias de leveduras (grandes) circundadas por colônias de lactobacilos, observadas nas contagens do material fecal do lactente P2

5. CONCLUSÕES

Considerando os resultados do presente estudo pode-se concluir que:

- A colonização por bifidobactérias e bacteróides não foi influenciado pelo tipo de parto.
- Houve influência do tipo de parto nas contagens de lactobacilos, que foram maiores naqueles nascidos de parto normal podendo com isto haver uma possibilidade de transferência da microbiota da mãe para a criança.
- A colonização com lactobacilos foi importante na exclusão competitiva de leveduras e *E. coli* conforme foi observado com lactente alimentado com leite materno e fórmula..
- Entre os grupos de microrganismos desejáveis, predominam as bifidobacterias nos primeiros meses de vida, sendo que espécies de lactobacilos estão em menor número especialmente quando as crianças são alimentadas com leite de vaca e leite do banco de leite
- *Candida albicans* (30%) e *C. parapsilosis* (28%) predominaram na microbiota fecal de crianças independente do tipo de parto e aleitamento.
- Possivelmente o aspecto com cuidados de higiene seja fundamental no controle da contaminação com leveduras e outros microrganismos oportunistas quando da entrega da alimentação ao recém nascido, seja através da amamentação por fórmulas, ou ao peito.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M.M.; PASTORE, G.M. Açúcares funcionais. Galactooligossacarídeos. **Biotecnologia ciências e desenvolvimento**, v.32, p.10 – 14, 2004.
- ALVARES, C.A.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO, M.E.L. *Candidíase Vulvovaginal: Fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras*. **J Brás Patol Méd Lab**. v.43, n. 5, p.319-327, 2007.
- BARRETT-BEE, K.; HAYES, Y; WILSON, R.G.; RYLEY, J.F. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. **J Gen. Microbiol.** v. 131, p.1217-1221, 1985.
- BENNETT, D.E.; McCREARY, C.E.; COLEMAN, D.C. Genetic characterization of a phospholipase C gene from *Candida albicans*: presence of homologous sequences in *Candida* species other than *Candida albicans*. **Microbiology**. v. 144, p. 55-72, 1998.
- BORG-VON ZEPELIN, M.; EIFFERT, H.; RUCHEL, R. Changes in the spectrum of fungal isolates: results from clinical specimens gathered in 1987/88 compared with those in 1991/92 in the University Hospital Gottingen. **Germany Micoses**. v. 36, n. 8, p. 247-253, 1993.
- BORBA,L.; FERREIRA,C.L.L.F.Probióticos e Prebióticos em Bancos de Leite Humano.In: Ferreira,C.L.L.F. Ed. Prebióticos e Probióticos: **.Suprema Gráfica e Editora**,Rio Branco,p.103-121,Mg,2003
- BRANDT, K.G.; SAMPAIO, M.M.S.C; MIUKI, C.J. **Importância da microflora intestinal. REVISÕES E ENSAIOS REVIEWS AND ESSAYS REVISIONES Y ENSAIOS**. 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Recomendações técnicas para o funcionamento do banco de leite humano**. 2. Ed. Brasília, 1993.
- BRUNSER, O.; FIGUEROA, G.; GOTTELAND, M.; et al., Effects of probiotic or prebiotic supplemented milk formulas on fecal microbiota composition of infants. **Asia Pac J clin Nutr.**, v.15, p. 368-376, 2006.
- BÚRIGO, T.; FAGUNDES, R.L.M.; TRINDADE, E.B.S.M.; VASCONCELOS, H.C.F.F. Efeito bifidogênico do frutooligossacarídeo na microbiota intestinal de pacientes com neoplasia hematológica. **Rev. Nutr.** 20(5)Set.-Out. 2007.
- COOL, A.P.; SAVI, D.C.; ONOFRE, S.B. Identificação das leveduras do Gênero *Candida* pelo método cromógeno CHROMAGAR, Candidas obtidas de pacientes com infecção das vias urinarias, **Rbac**, v.41, n.4, p.279-281, 2009.
- CRUCINSKY. Disponível em: <<http://www.semilactose.com/index.php/2009>>. Acesso em: 07 mar. 2010.
- CRITTENDEN, R.G.; PLAYNE, M.J. Production,properties and applications of food- grade oligossacarídes. **Trends in food Science & Thechnology**. v.7, n.11, P. 353-361, 1996.
- CRISTINA, T.F.; ERNEST, S.M. Food Alergy: A pratical update from the gastroenterolological Vienwpoint, **Jornal de Pediatria**, v.83, n.1, 2007.

CROCCO, E.I.; MIMICA, L.M.J.; MURAMATU, L.H.; GARCIA, C.; SOUZA, V.M.; RUIZ, L.R.B.; et al. identificação de espécies de *Candida* e suscetibilidade antifúngica in vitro: Estudo de 100 pacientes com *candidíases* superficiais. **Anais Bras dermatol**, v.6, n.76, p.689-697.; 2004.

DEWEY, K.G. Growth characteristics of Breast-Fed Compared to Formula-Fed Infants. **Neonatology**. 74(2): 94-105.1998.

DEWEY, K.G.; HEING, M.J.; NOMMSEN, RIVERS, L.A. Differences in morbidity between breast-fed and formula – fed infants. **J Pediatr**, v.126 (JPT1), p. 696-702.,1995.

DONSKEY, C.J.; HUJER, A.M.; DAS, S.M., PULTZ, N.S., BONOMO, R.A.; RICE, L.B. Use of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis for Analysis of the stool Microbiota of Hospitalized Patients. **J. Micrbio Methods**. v.54, p. 249-256, 2003.

DOUGLAS, L.O. *Candida* proteinases and candidosis. **Crit. Rev. Biotechnol**. v. 8, n. 2, p. 121-129, 1988.

DIEZ-OREJAS, R.; MOLERO, G.; MORO, M.A.; GIL, C.; NONBELA, C.; SANCHEZ-PEREZ, M. Two different NO-dependent mechanisms account for the low virulence of a *Candida albicans*. **Med. Microbiol. Immunol**. v. 189, n. 3, p. 153-60, 2001.

EYRES, R.; ELLIOTT, R. B.; HOWLE, R. N.; FARMER, K. Low temperature pasteurization of human milk. **Med. J. New Zeal.**, v. 87, p. 134-135, 1978.

FARIA, L.M. **Mapeamento genético e detecção de QTLs em cruzamento de limão Cravo e Citrumelo "Swingle"**, Dissertação, Campinas, S.P., 207.

FINEGOLD, S.M.; SUTTER, V.L.; MATHISEN, G.E. Normal indigenous intestinal flora. Em Hentges, D.J. (ED), Human Intestinal Microflora in Health and Disease, pp. 3-31, **Academic Press**, New York, EUA.

FERREIRA, D.F. Análise estatísticas por meio di Sisvar para Windows.> versão 4.0. in...45 reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, SP, p.255-258, Julho de 2000.

FERREIRA,C.M.P.: Causalidade Psiquica em Freud. **Dissertação**. Univerisidade do estado do Rio de Janeiro, R.J. UERJ, 2010.

FORSYTHE, S.J. Microbiologia da Segurança alimentar. Trad. Maria Carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt- Porto Alegre: **Artmed**, p.211-216, 2002.

GALLO, C.R.; CABRINI, K.T. Identificação de leveduras no processo de Fermentação Alcoólica em Usina do Estado de são Paulo, Brasil, n.1, v. 56, 1999.

GENEROSO, S.V.: Leveduras Probióticas no Processo de translocação bacteriana em modelo experimental d obstrução intestinal em camundongos. **Tese**. Univerisidade Federal de Minas Gerais, U.F.M.G., MG.2010.

GOES, V.F.F. Ação de extratos, óleos essenciais e frações isoladas de plantas medicinais spbre a formação do biofilm em cândida SP. **Tese de Doutorado**, Faculdade de Odontologia, FOP- Piracicaba-SP, 2009.

GOPAL, P.K.; SULLIVAN, P.A.; SMART, J.B. Utilization of Galactooligosacharides as

selective Substrates for growth by lactic acid Bacteria including *Bifidobacterium Lctis* DR 10 and *Lactobacillus rhamnosus* OR 20. **International Dairy Journal** , v.11, p. 19-25, 2001.

GHANNOUM, M.A. Phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 13, n. 1, p. 124-134, 2000.

GHANNOUM, M.A.; ABU-ELTEEN, K.H. Pathogenicity determinants of *Candida*. **Mycoses**, v.33, p.265-282, 1990.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **J Nutr**, Bethesda, v.125, p.1401-1412, 1995.

GROCIANI, F.; ALESSANDRINI, A.; MUCCI, M.M.; BIAVATI, B. Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. **International Journal of Food Microbiology**. 24:199-210. 1994.

GUSTAFSON, K.S.G.M.; VERCELLOTTI, C.M.; BENDEL, C.M.; HOSTETTER, M.K. Molecular mimicry in *Candida albicans*. Role of an integrin analogue in adhesion of the yeast to human endothelium. **J. Clin. Invest.**, n.87, p.1896-1902., 1991.

HANNULA, J.; SAARELA, M.; DOGAN, B.; PAATSAMA, J.; KOUKILA-KAHKOLA, P.; PIRINEN, S.; ALAKOMI, H.L.; PERHEENTUPA, J.; ASISKAINEN, S. Comparison of virulence factors of oral *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates in healthy people and patients with chronic candidosis. **Oral Microbiol. Immunol.** v. 15, n. 4, p. 238-44, 2000.

HAVENAR, R.; BRINK, B.T. HUIS INT VELD, J.H.J. Selection of strains for probiotic use. In: Fuller, R.. **Probiotics: The scientific basis**. London: Chapman e hall, p.209-224, 1992.

HAVENAR, R.; HUIS INT VEID, J.H.J. Probiotics: a general review. EM Wood, B. (ed), *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*, pp. 151-170. **Elsevier**, Barking, RU. 1972.

HENGSTERMANN, S.; MANTARING, J.B.; SOBEL, H.L. BORJ, V.E.; BASILIO, J.; LELLAMO, A.D. Formula feeding is associated with increased hospital admissions due to infections among infants younger than 6 months in Manila, Philippines. **J. Hum. Lact.** 16: 1-7. 2009.

HOPKINS, M. J.; MACFARLANE, G.T.; FURRIE, E.; FITE, A.; MACFARLANE, S. Characterization of intestinal bacteria in infant stools using real-time PCR and northern hybridization analyses. **FEMS Microbiology Ecology**. 54:77-85. 2005.

KALLIOMAKI, 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**. 361:1869-71. 2003.

KRETSCHMAR, M.; HUBE, B.; BERTSCH, T.; SANGLARD, D.; MERKER, R.; SCHRODER, M.; HOF, H.; NICHTERLEIN, T. Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. **Infection and Immunity**. v. 67, n. 12, p. 6637-6642, 1999.

KOLIDA, S.; TOUHY, K.; GIBSON, G.R. Prebiotic effects of Inulin and oligofructose. **British Journal Nutrition**, v.87., Suppl. 2, p.5193-5197, 2002.

KURTZAN, P.C.; FELL, J.W. *The yeasts, a taxonomic study*. 4 ed. Amsterdam, **Elsevier**.

p.1055, 1998.

KUNZ, C.L; RUDLOFF,S,BAIER,N.;KLEIN,N.;STROBEL,S. Oligosacharides in Human milk: structural,functional, and metabolic aspects. **Ann Rev Nutr**, v.20, p.699-722, 2000.

LEITE, M.C.T. **Identificação, cacteriração e análise de Expressão de Genes de Resposta ao Estresse Oxidativo em *Lactobacillus delbrueckii* VFH2b20**. Tese, Viçosa, Minas Gerais, MG., 2008.

LILLY, D.M.; STILWELL, R.H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**. 147 : 747-748.1965.

LORENZO, J. Alimentos que podem consumir los Niños. **Arch Pediatr**, v.51, n. 4, p.282-4, Uruguay, 1980.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms**. USA; 8 ed. P. 774-778, 1996.

MAGO, N.; KHULLER, G.K. Subcellular localization of enzymes of phospholipid metabolism in *Candida albicans*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 28, p. 355-362, 1990.

MARSHAL, V.M.; COLE, W.M. Threonine aldolase and alcohol dehidrogenase actividties in *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* and their contribution to flavour production in fermented milks. **Journal fo Dairy Research**. 50:375-379. 1983.

MACEDO,L.N.; LUCHESE,R.H.; GUERRA,A.F.; BARBOSA,C.G.: Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e Viabilidade de *Bifidobacterium spp* e *Lactobacillus spp* em leite **Ciencia e Tecno de Aliment**,v.28,n.4., Campinas,S.P.,oct/dez,2008

MORAIS, M.B.; JACOB, C.M.A. Prebióticos e probióticos na alergia diferencial. Rio de janeiro, **J Allergy Clin Immunol**, v.82, n.5. Suppl. O, August, 2007.

MARTINS, F.S.: Utilização de leveduras como probióticos. **Rev de Biologia e Ciencis da Terra**, v.5, n.2, p.1519-5228, 2005.

MARTINS, A.R.; BURKERT, A.V. Revisão: Galacooligooligossacarídeos(GOS) e Seus efeitos Prebióticos e Bifidogênicos. **Braz. J. Food Thecnol**, v. 12, n.3; p.230-240. Jul, set, 2009.

MAGDA, M.S.C.S.; MIUK, C.J.; KÁTIA, G.B. Importancia da Microflora Intestinal **Pediatria**, v. 28, n.2., p.117-27., São Paulo, 2006.

MILKELSAAR, M.; MANDAR, R. Development of individual lactic acid microflra in the human microbial ecosystem. In Lactic Acid Bacteria **Ed. Salminen, S and Von wright, A**. New York. Marcel Dekker, p. 237-294, 1993. acidophilus

MORO,G.E.; HANSEN,P.A.; MOCQUOT,G. *Lactobacillus acidophilus*, **International Journal of Systematic bacteriology**,v.20, n 3, p.325-327.,1970.0

MORO, G.E.; ARSLANOGLU, S. Reproducing the bifidogenic effect of human milk in formula-fed infants: Why and how? **Acta Paediatr**, Suppl v.449; n.94; p.7-14.; 2005.

MITSOU, E.K.; KIRTZALIDOU, E.; OIKONOMOU, I.; LIOSIS, G.; KYRIACOU, A. [Anaerobe](#).14(2):p.94-101.2008.

MITSUOKA, T. Bifidobacteria and their role in human health. **Journal of Industrial Microbiology**. 6:263-268. 1990.

MURRAY, P.R. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, ASM Press. p. 85-93, 1999.

MATSUMOTO, F.E.; GANDRA, R.F., RUIZ, L.S.; AULER, M.E.; MARQUES, S.A.V.; PIRES, M.F.C.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. Yeasts isolated from Catheter in children from a Hospital Public of São Paulo, Brazil. **Mycopatolgy**. 154(2): p. 63-69, 2001.

MAGO, N.; KHULLER, G.K. Subcellular localization of enzymes of phospholipid metabolism in *Candida albicans*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. 28: p. 355-362,1990.

MORAIS, M.B.; JACOB, C.M.A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. **Jornal de pediatria**. v. 82, n.5, Porto Alegre, 2006.

MORO, G.E.; STAHL, B.; FANARO, S.; JELINEK, J.; BOEHM, G.; COPPA, G.V.; Dietary prebiotic oligosaccharides are detectable in the faeces of formula-fed- infants. **Acta paediatr Suppl**, v.94, p.27-30., 2005.

MUYZER, G., NAAL, E.C.; UITERLINDEN, A.G. Profiling of Complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-Amplified genes coding for 16sRNA. **Appl Environ microbial** v.59, p.695-700,1993.

MUYZER, G.: DGGE/ TGGE. A method for identifying genes from natural ecosystems. **Currunt Opnion in Microbiology**. Oxford, v.2, p.317-322,1999.

NAHAISI, M.H. *Lactobacillus acidophillus*: therapeutic propieties, products and enumeration. Chapte 6. Em Robinson, R.K. (ED), Developments in Foods Microbiology, pp. 153-178. Elsevier. **Applied Science Publishers**, Londres, RU. 1986.

NETO, A.C.A., PEREIRA, M.G., PEREIRA, T.G., SANTOS, M.C.M., Perfil Microbiológico do Leite Materno do Banco da Maternidade Evangelina Rosa. **B. CEPPA**, v. 19, nº 1, p. 75-84, 2001.

NEWPORT, G.; AGABIAN, N. KEX2 influences *Candida albicans* proteinase secretion and hyphal formation. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 272, n. 46, p. 28954-28961, 1997.

NIWWERTH, M.; KORTING, H.C. Phospholipases of *Candida albicans*. **Mycoses**. 44: p. 361-367, 2001.

NOVAK, F.R.; ALMEIDA, J.A.G.; SILVA, R.S. Normais para implantação e funcionamento de Bancos de leite humano. **Ministério da Saúde**, 2003.

NOVAK, F.R.; ALMEIDA, A.G.; VIEIRA, G.; BORBA, L.M. Colostro Humano: Fonte Natural de Probióticos. **Jornal de Pediatria**. v.77, n.4, 2001.

ODDS, F.C. Pathogenesis of *Candida* infections. **Journal of the American Academy of Dermatology**, V.31, p.2-5,1994.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI,K.; ALEGRO,J.H.A.; SAAD,S.M.I.; Aspectos Tcnológicos de

Aliments Funcionais contendo probióticos. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, V.38,N.1 / Març,2002.

OLIVEIRA, N.D.; MIYOSHI, M.H. Advances in necrotizing enterocolitis. **J. Pediatr.** 81 (S1): S16-22. 2005.

PARKER, R.B. Probiotics, the other half of the antibiotics story. **Animal Nutrition and Health.** 29:4-8.1974.

PASCHOA, M.F. Banco de leite humano: fluxograma e "Lay-out". **R. Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 18-232, 1997.

PAULA, J.P.; FARAGO, P.V.; RIBAS, J.C.C.; SPINARDI, G.M.S.; DOLL, P.M.; ANTONI, R.F.; ZAWADZKI, S.F. In vivo evaluation of the mutagenic potential of estragole and eugenol chemotypes of *Ocimum selloi* benth essential oil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.26, n.6, p.846-851, 2007.

PAULA, J.P.; FARAGO, P.V.; RIBAS, J.C.C.; SPINARDI, G.M.S.; DOLL, P.M.; ANTONI, R.F.; ZAWADZKI, S.F. In vivo evaluation of the mutagenic potential of estragole and eugenol chemotypes of *Ocimum selloi* benth essential oil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.26, n.6, p.846-851, 2007.

PENDERS, J. (a); THIJIS, C.; VINK, C.; STELMA, F.; SNIJDERS, B.; KUMMELING, I.; VAN DER BRANDT, P.A.; STOBBERINGH, E.E. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics.** 118 (2): 511-521.2008.

PENDERS, J.; VINK, C.; DRIESSEN, C.; LONDON, N.; THIJIS, C.; STOBBERINGH, E.E. Quantification of *Bifidobacterium ssp*, *Escherichia coli*, and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. **Femms Microbiology Letters**, v. 243, p. 141-147. 2005.

PENDERS, J.; THIJIS, C.; VINK, C.; STELMA, F.F.; SNIJDERS, B. Home birth and breastfeeding may set the stage for healthy Immunes Systems in Infants, vol. 3, Issue 4. Compiled and edited by any Romano, msn,cnm- A publication of the Lamaze Institute for Noemal Birth. 2006.

PENDERS, J.; THIJIS, C.; VINK, C.; STELMA, F.F.; SNIJDERS, B.; KUMMELING, L.; VAN DEN BRANT, P.A.; STOBBERINGH, E.E. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics**, v. 118, p. 511-520, 2006.

PEREIRA, R.C.; OLIVEIRA, M.T.R.; LEMOS, G.C.J. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goitacazes **Rev. Bras. de Farmacognosia**, v.14; supl 01, p.37-40,2002.

PEREIRA, S.A.L. Infecções pulmonares em autópsias de pacientes com a síndrome da Imunodeficiência adquirida. **Ver.Soc.Med.Trop.**, v.25, n.6, Uberaba, MG, Nov\Dez., 2002.

PFALLER, M.; CABEZUDO, I; KOOTZ, F.; BALE, M.; GRINGRICH, R. Predictive values of surveillance cultures for systemic infection due to *Candida* species. **Eur. J Clin Microbiol**, v.6, p.628-633, 1987.

POLAK, A. Virulence of *Candida albicans* mutants. **Mycoses.** v. 35, n. 1, p. 9-16, 1992.

PRICE, F.M.; CANSON, R.A. Phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia.** v.

20, p. 7-14, 1997.

PRICE, F.M.; GENTRYS, I. O.; WCLACINSON, I.P. Plate method for detection for phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**. v. 20, p. 27-34, 1982.

RAMOS, S.R.T.S.; VAZ, F.A.C.; MENISSADJIAN, A. Mecanismos de defesa do trato gastrointestinal. Peculiaridades no recém-nascido. **Pediatr**. 7:175-180.1985.

RAMOS, S.R.; VAZ, A.C.; MANISSADIJAN, A. Defense Mechanisms of the Gastrointestinal Tract- Peculiarities in the Newborn. **pediatria**, n.7, p.175-180, São Paulo,1985.

RASIC, J.L.; KURMANN, J.A. *Bifidobacteria* and their role. Birkhäuser, Basileia, Suíça. 1983.

RIBEIRO, E.L.; GUIMARÃES, R.I.; INÁCIO, M.C.C.; FERREIRA, W.M.; CARDOSO, C. G.; DIAS, S.M.S.; NAVES, P.L.F.N. Aspectos das leveduras de *Candidas* vinculadas as infecções Nosoomias, Ed. 64, **NEWSLAB**, 2004.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G.R.; DELZENE, N. The Biochemistry of Oligofructose a nondigestible fiber: An Approach to calculate its Caloric Value. **Nutrition Reviews** v.51, n.5, p.137-146,1993.

ROBERFROID, M., SLAVIN, J. Nondigestible Oligosacharides. Critical Reviews in **Food Science and Nutrition**. v.40, n.6, p.461-480, 2000.

ROEDIGER,N.The Utilization of Nutrients By Isolated Ephithelial Cells of the reat Colon. **Gastroenterology**, v.83, p.424-429, 1989.

RUCHEL, R. A variety of *Candida* proteinases and their possible targets of proteolytic attack in the host. **Zentralbl Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.** v. 257, n. 2, p. 266-74, 1984.

RUCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, M. A comparision of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**. v. 20, p. 233-234, 1982.

RUCHEL, R.; UHLEMANN, K.; BONING, B. A comparison of secretory proteinase from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v.20, p.233-244, 1982.

SAAD, Susana Marta Isay. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 42, n. 1, mar. 2006

SAAD,S.M.I.; Probiótico e Prebióticos: O estado da Arte. **Rev. Brasileira de Ciencias farmaceuticas**, V. 42,N.1 Jan?marc. Disponível em <<http://www.Scieleo.br/pdf/rbcf/ V.42 N1/29855.pdf>>. Acesso em 04 de jan.2007.

SAARELA M.; HALLAMAA K.; MATTILA-SANDHOLM T.; MATTO J. The effect of lactose derivatives lactulose, lactitol and lactobionic acid on the functional and technological properties of potentially probiotic Lactobacillus strains **Source:** [International Dairy Journal](#), v. 13, n. 4, p. 291-302(12), 2003.

SALMINEN, S.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut micosal barrier succesful strains and future challenges. **Antonie van Leeuwenhoek**. 70: 347-358. 1996.

SAMPAIO, M. C., Você sabe o que são Probióticos? **ABCD em Foco Rev**, Ano 2, nº 8,

www.ABCD.org.br, 2001.

SATOKARI, R.M.; ELAYNE, E.V.; ANTOON, D.C.A.; SARELA, Mand WILEM M. de VOS. Diversity in human Feces detection By Genus –Specific PCR and Denaturing Gradient gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, p.504-513, 2001.

SGORBATI, B.; BIAVATI, B.; PALENZONA, D. The genus *Bifidobacterium*. Em WOO, B.J.B. e Holzapfel, W.H. (eds). *The lactic Acid Bacteria*, vol 2. The Genera of Lactic Acid Bacteria, capítulo 8, PP 279-306. **Blackic Academic**. Londres, RU. 1995.

SHIMIZU, M.T.; ALMEIDA, N.Q.; FANTINATO, V.; UNTERKIRCHER, G.S. Studies on hyaluronidase, chondroitin sulphatase, proteinase and phospholipase secreted by *Candida* species. **Mycoses**, v.39, p.161-167, 1996.

SILVA, M.R.R., Variabilidade fenotípica e genotípica de amostras de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com AIDS. 1999, 158f. **Tese** (Doutorado em Microbiologia), Instituto de Ciências Biomédicas II, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

SOUSA, A.L.O.P.; FLORENCE, A.C.R.; BOGSAN, C.S.B.; MARAFON, A.P.; OLIVEIRA, M.N. Perfil de acidificação e viabilidade de *Bifidobacterium animalis* subespécie *lactis* em diferentes fórmulas lácteas e não lácteas. **Anais do 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia**. 2009.

STAIB, F. Serum proteins as nitrogen source for yeast-like fungi. **Sabouraudia**, v.4 p.187-193, 1965.

SULLIVAN, D.J.; MORAN, G.; DONNELLY, S.; GEE, S.; PINJON, E.; McCARTAN, B.; SHANLEY, D.B.; COLEMAN, D.C. *Candida dubliniensis*: an update. **Rev. Iberoam. Micol.** v. 16, p. 72-76, 1999.

TANG, J.; WONG, R.N.S. Evolution in the structure and function of aspartic proteases. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 33, p. 53-63, 1987.

TRONCHIN, G.; BOUCHARA, I.P.; ANNAIX, V.; ROBERT, T. & SENET, J.M. Fungal cell adhesion in *Candida albicans*. **Eur. J. Epidemiol.** v. 7, p. 23-33, 1991.

USTUNOL, Z. The Effect of Honey on the growth of *Bifidobactéria*. **National Honey Board**. P. 1-8. Disponível em <<http://www.nhb.org..htm>>. Acesso em 15 de março de 2005.

VAEL, C.; NELEN, V.; VERHULST, S.L.; GOOSSENS, H.; DESAGER, K.N. Early intestinal *Bacteroides fragilis* colonisation and development of asthma. **Pulmonary Medicine**. 8:19. 2008.

VANDERLEI, L.C.M.; SILVA, G.A.P. Diarréia aguda. **Rev. Assoc. Méd Bras.** 50(3): 276-281. 2004.

VEIRA, S. Estatística Experimental. 2.ed. São Paulo, **Atlas**, p.185, 1999. TANG, J.; WONG, R.N.S. Evolution in the structure and function of aspartic proteases. **Journal of cellular Biochemistry**, v.33, p.53-63, 1987.

ZHU, et al. Basic **Local Alignment Search Tool**. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 26 fev. 2010.

CAPÍTULO III

IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS DE VIRULÊNCIA EM LINHAGENS DE *E. coli*

RESUMO

As doenças diarréicas são consideradas um dos maiores problemas de saúde coletiva nos países em desenvolvimento. Linhagens patogênicas de *Escherichia coli* permanecem sendo um dos mais importantes patógenos bacterianos causadores de diarréias, sobretudo em crianças. O leite materno constitui-se o melhor alimento para prevenção de diarréias dado ao teor elevado de anticorpos presentes. Por outro lado, boas práticas de manipulação nos lactários são requisitos essenciais para garantia da segurança da alimentação recebida pelos neonatos. O leite humano coletado, processado e distribuído em Bancos de Leite Humano (BLH), bem como os demais leites, deve configurar-se como uma alternativa inócua e nutricionalmente satisfatória aos recém nascidos. Métodos moleculares podem constituir-se como uma alternativa para detecção de linhagens virulentas de *E.coli*, graças a sua sensibilidade e especificidade. Nesta pesquisa, investigou-se a presença de genes de virulência de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e enteroagregativa (EAEC) em 39 isolados de amostras fecais e de swabs retais dos recém nascidos através das técnicas de polimerase chain reaction (PCR) multiplex e pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Os alvos selecionados para EPEC foram os genes que codificam a adesina intimina (*eae*), fator de aderência (plasmídeo *EAF*) e fímbria “bundle forming pillus” (*bpf*). Os genes alvo para EAEC foram o plasmídeo de aderência agregativa (*pAA*) e regulon (*AggR*). Foram identificados dois alvos de virulência para EAEC em uma das amostras (2,6%) de neonatos alimentados com leite em pó modificado preparado em lactário. Conclui-se que devem ser tomadas medidas corretivas relacionadas às condições de manipulação dos leites destinados às crianças, além de priorizar a alimentação com leite do peito especialmente nos primeiros dias de vida quando ocorre a secreção do colostro rico em anticorpos e fagócitos.

Palavras chave: *Escherichia coli*, métodos moleculares, leite materno.

ABSTRACT

Diarrheal diseases are regarded as a major public health problem in developing countries. Pathogenic *Escherichia coli* strains, remains one of the most important causes of diarrhea, especially in children. Breast milk is the best food is for the prevention of diarrhea given the high levels of antibodies. On the other hand, good handling practices by lactary personnel are essential requirements to ensure the safety of food received by neonates. The human milk collected, processed and distributed in human milk banks (HMB), as well as other milks, must be innocuous and nutritionally satisfactory to newborns. Molecular methods can represent an alternative for detection of virulent strains of *E. coli*, due to its sensitivity and specificity. The aim of the work was to investigate by means of PCR and PFGE, the occurrence of enteropathogenic (EPEC) e enteraggregative (EAEC) virulence genes in 39 *E. coli* isolates from new-born children feaces and rectal swabs. The targets selected for EPEC were the genes encoding for intimin adherence protein (*eae*), plasmid adherence factor (EAF), fimbriae bundle forming pili (*bpf*). The target genes for EAEC were the plasmid for aggregative adherence (*pAA*) and its regulon (*AggR*). Both EAEC virulence targets were identified in one of the samples (2,6%) from a neonate fed with milk formula, prepared by the maternity personnel. It is concluded that corrective action should be taken related to the conditions of milk handling, and prioritize the supply of breast milk especially in the first days of life when occurs the secretion of colostrum rich in antibodies and phagocytes.

Key words: *Escherichia coli*, Molecular methods, Breast milk.

1. INTRODUÇÃO

Escherichia coli diarreio gênicas (*diarrheagenic E.coli* – DEC) representam importante causa de diarreia endêmica e epidêmica especialmente nos países em desenvolvimento. De acordo com seus mecanismos de patogenicidade as DEC podem ser classificadas em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC); *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* enteroinvasora (EIEC); *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC); *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC). O diagnóstico das *E. coli* diarreio gênicas implica na identificação de marcadores de virulência usualmente detectáveis pelo emprego exclusivo de métodos convencionais, como sorotipagem e perfil bioquímico e considerando que o uso de testes em culturas de células e animais de laboratórios implica em altos custos e exige grande especialização técnica. Para a maior parte destes microrganismos, métodos laboriosos e onerosos como o teste de aderência, invasão ou citotoxicidade em culturas de células ou testes imunoenzimáticos, eram os únicos recursos para a sua identificação.

A sensibilidade e especificidade das técnicas de PCR pode ser uma ferramenta importante para a triagem diagnóstica de certos agentes de diarreia de difícil caracterização, como é o caso das causadas pelos grupos das linhagens virulentas de *E. coli*.

Na última década, a pesquisa de seqüências genéticas responsáveis pelos fenótipos de virulência de agentes infecciosos ganhou grande impulso, onde se pode destacar o emprego da hibridização DNA-DNA através de sondas genéticas e, principalmente a reação de PCR.

O PCR tem sido empregado com sucesso na identificação de diversos patógenos eucarióticos e procarióticos (PERSING, 1993). Em relação a *E. coli* diarreio gênicas, acumulam-se propostas diagnósticas baseadas na amplificação de genes de virulência (FRANKE et al,1989; OLIVE,1989, VENKATESAN et al,1989; VICTOR et al., 1991).

A presença de patógenos na microbiota fecal de lactentes é devida a procedimentos inadequados de manuseio do alimento e que pode ser fonte de contaminação com estas bactérias. Da mesma forma, o tipo de alimentação oferecida às crianças pode vir a favorecer a instalação e prevalência de grupos microbianos indesejáveis como *E. coli* e clostrídios em detrimento daqueles relacionados à saúde dos lactentes como bifidobactérias e lactobacilos.

Assim, neste contexto, o presente estudo procurou avaliar a aplicação do PCR no diagnóstico de um grupo de bactérias enteropatogênicas que atuam por distintos mecanismos de virulência e constituem importante causa de doença em nosso meio, sobretudo em recém nascidos de baixo peso internados em enfermarias de UTI neonatal, especialmente *E. coli* diarreio gênicas. As crianças cujo material foi examinado são originárias da área metropolitana do município do Rio de Janeiro e pertencem majoritariamente a grupos sócio-econômicos desfavorecidos. Em nossa amostragem estão incluídas crianças com diarreia ou não, submetidas a tratamento ambulatorial e principalmente crianças nascidas e internadas em enfermaria, onde a diarreia, caso apresentasse, poderia ser ou não a causa primária da admissão hospitalar. Além disso o material fecal coletado foi obtido após a instalação da terapêutica antimicrobiana, que poderia interferir de forma não previsível na possibilidade na recuperação dos agentes enteropatogênicos.

Tendo em vista a importância das condições higiênicas e nutricionais do leite oferecido aos lactentes, neste estudo buscou-se avaliar a possível ocorrência de linhagens virulentas de *E. coli* em neonatos, com quadro ou não de diarreia, internados em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI) neonatais, alimentados com leite materno proveniente de banco de leite humano e lactários. Dois dos hospitais onde foram coletadas amostras para a pesquisa estão localizados na capital do estado do Rio de Janeiro, o Instituto Fernandes Figueiras, Fiocruz, Centro Ibero-Americano, referência em aleitamento materno e o Hospital Estadual Rocha Faria, referenciado pelo primeiro e localizado na zona Oeste da cidade e um terceiro, localizado no município de Seropédica, RJ.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Métodos Moleculares

Métodos moleculares têm sido aplicados, com grande sucesso no diagnóstico e diferenciação das categorias diarreio gênicas de *E. coli*. Um dos primeiros patógenos a tentar-se o diagnóstico molecular com sondas genéticas foi para ETEC, utilizando-se como alvo os genes codificadores da toxina termolábil (LT) e da toxina termo estável (ST) (MOSELEY et al., 1982). Posteriormente, diversas outras sondas foram descritas, cobrindo praticamente todas as categorias diarreio gênicas de *E. coli*. Para o seu uso, duas estratégias básicas são comumente empregadas para a avaliação de materiais clínicos suspeitos, “colony blots” e “stool blots”. No primeiro procedimento, colônias bacterianas previamente isoladas são subcultivadas e transferidas para uma membrana onde ocorrerá a hibridização com a sonda marcada, evidenciando-se a colônia possuidora do gene pesquisado. Já no segundo método, em lugar de colônias, emprega-se o próprio material clínico, que é depositado em uma membrana colocada sobre um meio de cultura sólido. Após a incubação, o crescimento polimicrobiano é submetido à hibridação com a sonda de interesse.

São inegáveis as vantagens, simplicidade e economia decorrentes do uso de sondas genéticas em comparação à cultura de células ou de modelos animais, contudo várias e importantes ressalvas são necessárias e tem, sido feitas, especialmente quando considerada a realidade das rotinas bacteriológicas praticadas na ampla maioria dos laboratórios. É necessário observar, inicialmente, que “colony blots” dependem do processamento bacteriológico dos materiais clínicos submetidos a exame, de forma a obter-se, de cada um, número suficiente de colônias para o teste com a sonda. É bastante comum encontrar-se reduzido número de colônias do patógeno em meio à microbiota normal, particularmente nos estágios mais tardios da infecção ou após uso de antimicrobianos, sendo necessário o teste de um elevado número de colônias para se evitar a redução da sensibilidade do método (SMITH e SCOTLAND, 1988; SCHULTS et al., 1994)

Quando é utilizado a “stool blots”, diversos autores relataram a diminuição da sensibilidade da detecção do gene investigado em decorrência da interferência na reação de hibridação, decorrentes do grande número de outras bactérias (LANATA et al, 1985; TAYLOR et al, 1988; SOMMERFELT et al, 1993) independentemente da metodologia utilizada, a marcação das sondas com radioisótopos é uma fonte adicional de dificuldades ao uso geral da hibridação DNA-DNA, pois exige ambiente e condições de trabalho especiais. Sondas genéticas marcadas com moléculas não radioativas (digoxigenina, biotina, e outras) embora tragam riscos à segurança e sejam em geral, bastantes estáveis, costumam apresentar problemas significativos de marcação inespecífica (“background”) e baixa sensibilidade (KESSLER, 1995).

As sondas genéticas utilizadas no diagnóstico de *E. coli* diarreio gênicas destinam-se a identificar genes responsáveis por fatores de virulência característicos de cada categoria diarreio gênicas, como LT e ST (MURRAY et al, 1987; ECHEVERIA et al, 1989; SCHULTZS et al, 1994), EAF (NATARO et al, 1990 b), BFP (GIRON et al, 1993), STX e suas variantes (WILLSHAW et al, 1987; NEWLAND & NEILL, 1988, THOMAS et al, 1991), enterohemolisina (SCHIMIDT, BEUTIN, KARCH, 1995a), Plasmidio de EAEC (BAUDRY et al, 1990), plasmidio de invasão (PLNV) de EIEC (BOILEAU, D'HAUTEVILLE e SANSONETTI, 1984; GOMES et al, 1987; VENKATESAN, BUYSSE e KOPECKO, 1989) e gene IpaH (cromossômico e plasmidial de EIEC (VENKATESAN et al, 1989).

Quanto ao PCR, trata-se de método de diagnóstico molecular de rápida execução e alta sensibilidade para a detecção de genes específicos permitindo ainda a economia de reativos pela efetiva e rápida triagem de um grande número de amostras. O método possibilita a ampliação *in vitro* de sequências específicas de DNA e foi inicialmente desenvolvido por Mullis e colaboradores na CETUS CORPORATION (MULLIS e FAOLLOONA, 1987). Apesar dos princípios terem sido anteriormente descritos em detalhes por Klipper et al (1971), e Panet e Khorona (1974), o uso do PCR foi limitado até a descoberta da DNA polimerase termo-estável (CHIEN, 1976), quando passou então a ser amplamente utilizado. A TAQ DNA polimerase é isolada de *Thermus aquaticus* Yt1, que são bactérias que vivem em águas quentes sulfurosas e suportam altas temperaturas. A enzima consiste de um polipeptídeo com peso molecular de aproximadamente 94 Kda, sua principal característica é ser termo estável sendo capaz de sintetizar DNA em altas temperaturas a partir de fitas simples de DNA na presença de um "primer" ou iniciador (RODRIGUES, 2010).

Na célula, a polimerase conduz à síntese da fita complementar de DNA na direção 5' para 3', usando fita simples de DNA como molde, mas iniciando a partir de uma reação de fita dupla. A reação em cadeia de polimerase que ocorre *in vitro* usa o mesmo princípio, empregando dois *primers* cada um complementar à fita oposta flanqueando a região do DNA que se quer amplificar. Por aquecimento é provocada a desnaturação do DNA, numa segunda etapa os *primers* se emparelham com a fita molde (anelamento) e na terceira etapa a polimerase se liga a esta região de fita dupla e começa a sintetizar o resto da fita de DNA (extensão), capturando os deoxinucleotídeos trifosfatos adicionados a reação, que é tamponada com tampão contendo íons magnésio. As três etapas descritas formam um ciclo. A cada ciclo a região alvo do DNA aumenta por progressão geométrica. A repetição dos ciclos de amplificação resulta no acúmulo da sequência de DNA situada entre os dois *primers* utilizados na reação. Em condições ótimas a quantidade de fragmentos de DNAs amplificados (amplicons) pode chegar a 1 bilhão de vezes o número inicialmente presente na reação, tornando viável a sua detecção por eletroforese. Em seguida, sondas genéticas específicas podem ser empregadas para caracterizar a especificidade do produto amplificado (UENO et al., 2002).

Reação em cadeia de polimerase é uma técnica mais simples e de baixo custo e que proporciona resultados rápidos. Através desta metodologia diferentes grupos de iniciadores homólogos, aleatórios e/ou degenerados foram empregados para amplificar regiões da molécula de DNA, produzindo um padrão de bandamento. Polimorfismo no padrão de bandamento possibilita o agrupamento de amostras idênticas ou similares e a diferenciação daquelas não relacionadas. (KOSTMAN, et al, 1995).

Para a técnica de PFGE, convencionou-se que duas ou mais amostras seriam consideradas idênticas quando o padrão de restrição apresentasse o mesmo número de fragmentos de mesmo peso molecular. As amostras similares seriam aquelas que apresentassem um ou dois fragmentos diferentes, e aquelas que apresentassem três ou mais fragmentos diferentes seriam consideradas diferentes ou não relacionadas (BEDENDO e PIGNITARI, 2002). Assim, se existesse uma relação epidemiológica entre bactérias idênticas, provavelmente trataria-se de um surto. Entretanto, bactérias de mesma espécie e mesmo genótipo, isoladas de pacientes que não possuem uma mesma ligação epidemiológica detectável, poderia representar linhagens endêmicas. Assume-se também que bactérias não relacionadas epidemiologicamente, devem possuir genótipos diferentes. Segundo Tenover et al. (1995), bactérias envolvidas em um surto e/ou epidemia devem representar padrões distintos. Uma linhagem é considerada semelhante à outra quando ocorre um único evento genético como uma mutação, uma inserção ou deleção, que altere o padrão de bandas (MAGALHÃES et al., 2005).

Uma mutação tanto pode criar quanto suprimir um sítio de reconhecimento de enzima

de restrição. Se um novo sítio é criado, o padrão apresentará uma banda a menos em relação à linhagem epidêmica e duas bandas menores surgirão. Se um sítio desaparece, o padrão alterado terá uma banda nova de tamanho maior que duas que desaparecerão na linhagem responsável pelo surto (MAGALHÃES et al., 2005).

O PFGE é uma técnica bastante complexa com um poder discriminatório muito elevado. É considerado padrão ouro em epidemiologia molecular, mas é importante ressaltar que métodos de tipagem não substituem dados epidemiológicos somente auxiliam e, se utilizados isoladamente, podem levar a conclusões equivocadas (SOUZA, 2010).

2.2. Caracterização Genotípica de *E. coli* Patogênicas

Escherichia coli é um dos agentes causadores de diarreia que afeta crianças com alta frequência, especialmente em países em desenvolvimento. *E. coli* são diferenciadas como enterotoxigênicas (ETEC), enteroagregativas (EAEC), produtoras de toxina shiga (STEC), enterohemorrágicas (EHEC), enteroinvasora (EIEC) e difusamente aderentes (DAEC) (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004) e EPEC, enteropatogênicas clássicas.

A disponibilidade de testes diagnósticos rápidos e de simples execução é essencial para a rotina bacteriológica de laboratórios de instituições públicas como hospitais e centros de referência em saúde Pública ou para laboratórios clínicos privados. A multiplicidade de agentes bacterianos causadores de doença intestinal como as do gênero de *E. coli* apresentam um lugar de destaque. A microbiota intestinal de humanos contém *E. coli* não patogênica, assim como diferente de outros agentes de diarreia como por exemplo *Salmonella* e *Vibrio*, que podem ser isolados utilizando meios seletivos diferentemente das *E. coli* consideradas não patogênicas, onde não temos meios seletivos, ou provas bioquímicas e que também são insuficientes para diferenciá-las, exceto algumas estirpes que possuem sorotipos que tem sido utilizado nos laboratórios clínicos como método para diferenciar as estirpes patogênicas (SILVA, 2006),

Entretanto existe um grande número de sorotipos de *E. coli* patogênicas, o que torna essa metodologia inadequada para a rotina devido ao elevado número de antissoros que deveriam ser utilizados, o que geraria um elevado custo e, também elevando a mão de obra para a realização dos ensaios. Além disso, o sorotipo não está diretamente associado com a virulência (SAYERS e WHITT, 2002), o que torna a sorotipagem isoladamente insuficiente e não confiável para definir um isolado como patogênico. A multiplicidade de agentes bacterianos causadores de doença intestinal e a consequente necessidade de implantação de rotinas bacteriológicas com crescentes complexidades e custo tem sido um forte estímulo ao desenvolvimento de métodos diagnósticos mais acurados, como os métodos moleculares.

A compreensão dos mecanismos de virulência de agentes enteropatogênicos e a identificação dos genes responsáveis, obtidos em sua maior parte nas últimas décadas, apresentou um quadro ainda mais complexo para o diagnóstico, indicando a existência de agentes enteropatogênicos até então insuspeitos e a constatação da coexistência de estirpes virulentas e avirulentas dentro de uma espécie bacteriana, o que não é perceptível pelos métodos bacteriológicos convencionais. Isto, então, tem tornado os métodos moleculares vantajosos para uso no diagnóstico laboratorial destas bactérias, uma vez que detectam diretamente os genes que determinam a patogenicidade. Dessa forma as técnicas moleculares em especial o PCR, parecem suprir os objetivos de rapidez diagnóstica aliada a elevada especificidade e sensibilidade. Podemos também afirmar em relação ao PCR que sua execução técnica, inicialmente restrita a alguns centros de pesquisa, vem banalizando-se graças a disponibilidade de reativos e equipamentos de grande robustez e simplicidade de operação.

2.2.1. *E. coli* Enteropatogênica (EPEC)

EPEC foi o primeiro grupo de *E. coli* reconhecido como causador de diarreia, em 1945, quando John Bray descreveu estirpes sorologicamente distintas que foram isoladas de crianças com diarreia, mas não de crianças saudáveis (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). Essas bactérias causam doença primariamente em crianças menores de 2 anos de idade. Uma hipótese proposta para explicar a razão da resistência relativa de adultos e crianças mais velhas é a perda de receptores específicos com a idade (NATARO e KAPER, 1998).

EPEC é a principal causa de diarreia infantil nos países em desenvolvimento. Nos países industrializados a frequência desses organismos decresceu, embora continuem a ser uma causa importante de diarreia (KESKIMAKI et al., 2001; TRABULSI, KELLER e TARDELLI GOMES, 2002). No Brasil EPEC é o grupo de *E. coli* diarreiogênica isolado com maior frequência (FRANZOLIN et al., 2005; GIRÃO et al., 2006).

Diarreia aquosa e profusa, vômito e febre baixa são sintomas comuns da infecção por EPEC. Leucócitos fecais, que são um achado característico de bactérias invasoras, não são observados em pacientes infectados por EPEC (MILLER et al., 1994). Na mucosa intestinal ocorre a formação da lesão do tipo A/E, associada com o desarranjo do sistema enzimático digestivo-absortivo, levando a má absorção dos nutrientes (FAGUNDES-NETO, 1996). Como acontece com outras estirpes de DEC, a transmissão de EPEC é fecal-oral, através de mãos, alimentos e fômites contaminados (NATARO e KAPER, 1998).

2.2.1.1. Principais fatores de virulência

Plasmídeo EAF

As estirpes de EPEC geralmente exibem um padrão de aderência específico em células HeLa e Hep-2, que é dependente da presença do plasmídeo EAF (EPEC adherence factor). Esse plasmídeo contém um grupamento de 13 genes que são requeridos para a expressão tanto do BFP quanto da intimina (NATARO e KAPER, 1998).

Ao invés de cobrir uniformemente as células, as EPEC se ligam em determinadas áreas da superfície celular e formam grumos compactos, um padrão conhecido como aderência localizada (LA). O principal fator responsável pela aderência localizada é um tipo de pili denominado bundle-forming pilus (BFP), codificado no plasmídeo EAF, que interconecta as bactérias formando grumos ou microcolônias e promove a sua estabilização (DONNENBERG e WHITTAM, 2001; TRABULSI, KELLER e TARDELLI GOMES, 2002).

Intimina

O mecanismo central da infecção causada por EPEC é a formação de lesões intestinais denominadas “attaching and effacing” (A/E), causadas pela habilidade da bactéria aderir intimamente aos enterócitos, destruir as microvilosidades e induzir alterações no citoesqueleto incluindo o acúmulo de actina polimerizada e a formação de estruturas em pedestal nos locais onde a bactéria adere (DONNENBERG e WHITTAM, 2001; TRABULSI, KELLER e TARDELLI GOMES, 2002).

A formação da lesão A/E depende da expressão de vários genes localizados em uma região de 35 kb do cromossomo de EPEC, denominada Locus of Enterocyte Effacement (LEE) (MCDANIEL et al., 1995; FRANKEL et al., 1998). LEE é considerada uma ilha de patogenicidade porque contém vários genes associados com virulência, e não é encontrada em estirpes de *E. coli* não patogênicas (DONNENBERG e WHITTAM, 18 2001). Sequências homólogas à LEE das EPEC são encontradas em outras bactérias da família Enterobacteriaceae que causam a lesão do tipo A/E, incluindo STEC, RDEC-1 (bactéria que causa diarreia em coelho), *Hafnia alvei* e *Citrobacter rodentium* (NATARO e KAPER, 1998).

Intimina é uma proteína de membrana externa necessária para a formação das lesões A/E. É codificada pelo gene *eae* presente na LEE (JERSE et al., 1990). A intimina é responsável pela adesão íntima da EPEC às células epiteliais através da ligação com o receptor Tir (translocated intimin receptor), que é sintetizado pela bactéria, translocado pelo sistema de secreção tipo III codificado pela LEE e inserido na membrana citoplasmática da célula hospedeira (DONNENBERG e WHITTAM, 2001). O plasmídeo EAF não é essencial para a formação das lesões A/E, mas aumenta a eficiência da formação das mesmas (TRABULSI, KELLER e TARDELLI GOMES, 2002).

O modelo para a patogênese de EPEC indica que a bactéria inicialmente adere às células epiteliais através de uma adesina cuja identidade ainda não foi estabelecida. O sistema de secreção tipo III codificado pela LEE é ativado e várias proteínas efetoras incluindo Tir, são translocadas para o interior da célula hospedeira. EPEC então liga-se à célula hospedeira através da interação da intimina com Tir inserido na membrana, e numerosas proteínas do citoesqueleto acumulam-se sob o local onde a bactéria está ligada. As proteínas translocadas ativam vias de transdução de sinal nas células eucarióticas, e a diarreia provavelmente resulta de múltiplos mecanismos, incluindo a secreção ativa de íons, permeabilidade aumentada, perda da superfície absorptiva resultante da destruição das microvilosidades (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004).

EPEC típica e EPEC atípica

Em 1995, durante o Segundo Simpósio Internacional sobre EPEC, foi aprovada a seguinte definição de EPEC “estirpes diarreiogênicas de *E. coli* que produzem uma lesão característica denominada attaching and effacing (A/E) nas células intestinais e que não produzem toxinas Shiga. As EPEC típicas de origem humana possuem o plasmídeo de virulência EAF que codifica o bundle-forming pilus (BFP), necessário para a adesão localizada (LA) em células epiteliais, e um complexo regulador de vários genes de virulência, enquanto as EPEC atípicas (aEPEC) não possuem este plasmídeo”.

Enquanto as estirpes típicas apresentam exibem somente aderência LA, as aEPEC atípicas geralmente apresentam um padrão de aderência denominado LA-like (LAL), caracterizado por microcolônias de bactérias menos compactas e menos densas que o LA. Entretanto essas estirpes também podem apresentar aderência difusa (DA) e agregativa (AA) (TRABULSI, KELLER e TARDELLI GOMES, 2002). Recentemente foram descritas estirpes de EPEC que apresentam o padrão LA de adesão, mas a estrutura que media a agregação bacteriana nas microcolônias não é conhecida (HERNANDES et al., 2006).

As EPEC típicas correspondem aos sorotipos clássicos de EPEC e são causas

importantes de diarreia em países em desenvolvimento, mas raras nos países industrializados, onde as atípicas são a principal causa de diarreia (TRABULSI, KELLER e TARDELLI GOMES, 2002; ROBINS-BROWNE et al., 2004). No Brasil até a década de 90 uma elevada frequência de EPEC típica era observada, no entanto, estudos recentes têm demonstrado aumento na frequência da aEPEC (atípica) como causa de diarreia (FRANZOLIN et al., 2005).

Detecção

As EPECs podem ser isoladas através de cultura em meios seletivos, e detectadas através da aglutinação com anticorpos contra o antígeno somático. Cinco a dez colônias lactose positivas de *E. coli* devem ser investigadas utilizando anticorpos específicos para os antígenos somáticos associados com EPEC. Estirpes que aglutinam com estes anticorpos devem ser confirmadas por laboratórios de referência através da determinação do antígeno H, para a sorotipagem completa (GRAY, 1995). Os principais sorotipos de EPEC encontrados são: O55:[H6], O86:H34, O111:[H2], a O114:H2, O119:[H6], O127:H6, O142:H6, O142:H34 (típicas) e O26:H[11], O55:[H7], 20 O55:H34, O86:H8, O111ac:[H8], O111:[H9], O111:H25, O119:H2, O125ac:H6, O128:H2 (atípicas) (TRABULSI, KELLER e TARDELLI GOMES, 2002).

O fenótipo das lesões A/E pode ser identificado através de cultura de células Hep-2 ou HeLa e através da análise da biópsia intestinal. Testes moleculares utilizando hibridização de DNA ou PCR estão disponíveis para o diagnóstico de EPEC, e tem como alvo a detecção do gene *eae* que codifica a intimina e marcadores do plasmídeo EAF além de verificar a ausência de genes que codificam a toxina Shiga (NATARO e KAPER, 1998). A diferenciação entre aEPEC e tEPEC é realizada através da detecção do gene *bfp*, uma vez que este gene está presente somente das estirpes de tEPEC.

2.2.2. *E. coli* Enteroagregativa (EAEC)

Este grupo foi descrito em 1987, quando se observou que estirpes de *E. coli* aderiam à células HEP-2 gerando um fenótipo diferente do padrão localizado da EPEC. Este padrão diferenciado de adesão foi dividido em duas subcategorias: a aderência agregativa (AA), caracterizada pela autoaglutinação proeminente entre as bactérias na superfície celular; e a aderência difusa (DA), onde as bactérias ficam dispersas sobre a superfície celular. As EAEC são definidas como estirpes de *E. coli* que não secretam toxina LT nem ST, e que aderem à células Hep-2 através do padrão autoagregativo, no qual as bactérias aderem uma à outra adquirindo uma configuração em tijolos empilhados (stacked-brick) (NATARO e KAPER, 1998). É provável que essa definição englobe tanto estirpes patogênicas quanto não-patogênicas (ELIAS et al., 2002), entretanto pelo menos um subgrupo de EAEC é comprovadamente patogênico para humanos (NATARO, STEINER e GUERRANT, 1998).

Linhagens de EAEC são cada vez mais reconhecidos como causa de diarreia aguda, persistente em crianças e adultos, tanto nos países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento (COHEN et al., 1993; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004). Pacientes infectados com EAEC podem manifestar inflamação intestinal, notada pela presença de lactoferrina fecal e citocinas pró-inflamatórias, como a IL-8 (GREENBERG et al., 2002).

2.2.2.1. Principais fatores de virulência

A estratégia básica da patogênese da EAEC compreende a colonização da mucosa intestinal seguida pela secreção de enterotoxinas e citotoxinas, que resulta em diarreia secretória e lesão da mucosa (NATARO, STEINER e GUERRANT, 1998). Nenhum fator de virulência isoladamente foi associado com EAEC, os estudos indicam a participação de diversos fatores, de localização plasmídeo e também cromossomal (ELIAS et al., 2002; HARRINGTON, DUDLEY e NATARO, 2006). A inflamação ocorre em resposta a uma proteína flagelar da EAEC, que induz a liberação de IL-8. A secreção desta citocina estimula a migração de neutrófilos através do epitélio e secreção de líquidos celulares (STEINER et al., 2000). EAEC também provoca secreção de muco, que envolve a bactéria formando um biofilme. O papel da produção de muco pode estar relacionado com a diarreio gênese destas bactérias e, talvez, com sua habilidade de causar uma colonização persistente (NATARO e KAPER, 1998).

Plasmídeo de aderência agregativa (pAA)

O plasmídeo de aderência agregativa (pAA), também chamado de CVD432, tem sido utilizado em muitos estudos epidemiológicos como marcador para EAEC. Alguns genes codificados no pAA são as fímbrias de aderência agregativa (AAF-I e II) (CZECZULIN et al., 1997), o ativador transcricional AggR (NATARO et al., 1994), a toxina termo-estável de *E. coli* enteroagregativa 1 (EAST-1) (SAVARINO et al., 1993), e a citotoxina Pet (HENDERSON, HICKS et al., 1999). Entretanto a distribuição destes fatores de virulência é bastante heterogênea (NATARO e KAPER, 1998).

Fímbria de Aderência Agregativa (AAF)

As estirpes de EAEC aderem à células Hep-2 e à mucosa intestinal através das fímbrias de aderência agregativa (AAFs) (CZECZULIN et al., 1997). Pelo menos quatro tipos de AAF existem, cada um presente numa minoria de estirpes (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004).

Outros fatores de virulência

EAST1 (toxina termo-estável enteroagregativa 1) é uma enterotoxina de origem plasmídeo e apresenta homologia com o domínio enterotóxico da toxina termo-estável de ETEC (Stx) (SAVARINO et al., 1993). Acredita-se que a EAST1 contribui para a diarreia aquosa, no entanto, o gene da EAST1 (astA) também pode ser encontrado em muitos isolados de *E. coli* comensais e, conseqüentemente, o papel dessa toxina na patogênese da diarreia permanece controverso (MENARD e DUBREUIL, 2002). Outras categorias de *E. coli*, como estirpes de STEC, produzem a EAST1 com uma frequência maior que as estirpes de EAEC (SAVARINO et al., 1996).

A toxina codificada por plasmídeo (Pet) induz efeitos citotóxicos causando contração do citoesqueleto e perda da tensão das fibras de actina (CANIZALEZ-ROMAN e NAVARRO-GARCIA, 2003). Embora a Pet desempenhe um papel na patogênese da EAEC, ela está presente na minoria das estirpes (CZECZULIN et al., 1999), o que indica heterogeneidade em termos de virulência nessas bactérias.

ShET1 e Pic são duas toxinas codificadas pelo mesmo locus cromossomal, mas em sentidos opostos. O gene maior codifica a protease com atividade de mucinase, chamada Pic. A outra extremidade codifica a enterotoxina oligomérica que é conhecida como enterotoxina Shigella 1 (ShET1), que parece estar relacionada com a diarreia secretória que acompanha a infecção por EAEC e por Shigella (HENDERSON, CZECHULIN et al., 1999).

Outros genes de virulência (aggR, astA, aafA, pet, aggA aap, irp2, pic, shf, aggC e aafC) foram detectados em EAEC (MOON, PARK e KIM, 2005; UBER et al., 2006), mas são distribuídos de forma heterogênea entre as estirpes, reforçando a diferença em termos de virulência entre essas bactérias.

Detecção

O diagnóstico de EAEC pode ser realizado pelo teste de aderência à células HEp-2 ou através da detecção de genes responsáveis pela aderência agregativa (NATARO e KAPER, 1998). A PCR para detectar o plasmídeo de virulência pAA também tem sido utilizado como método para o diagnóstico de EAEC (SCHMIDT et al., 1995).

3. MATERIAL E MÉTODOS

As técnicas de PCR e PFGE foram realizadas no laboratório de referência em enterinfecção da FIOCRUZ.

3.1. Coleta de Amostras

Foram analisadas 39 amostras de isolados de *E. coli*, sendo oito de isolados de amostras fecais (P1 a P8) e 31 isoladas de “swabs” retais de lactentes atendidos por três hospitais da rede pública do estado do Rio de Janeiro, sendo 10 amostras de *swabs* da maternidade de Seropedica (S1 a S10), 10 amostras do Hospital Rocha Faria (R1 a R10) e 11 do Instituto Fernandes Figueiras (F1 a F11). Estes dois últimos são atendidos por Banco de leite Humano, sendo o Instituto Fernandes Figueiras referência Ibero Américo no controle de qualidade em aleitamento materno.

As amostras dos swabs e o material fecal coletado em frascos estéreis foram transportados para o laboratório, em caixa isotérmica, em meio de Cary-Blaire.

Só foram incluídos no estudo os recém nascidos cujos pais concordaram em participar através de consentimento livre e devidamente esclarecido, a despeito de alguma doença de base.

3.2. Isolamento por Semeadura em Placas

O isolamento das linhagens de *E.coli* foi realizado através de sementeiras por esgotamento em placas de Agar eosina azul de metileno segundo Levine - EMB (Difco) dos swabs retais e/ou de diluições decimais do material fecal neste meio. As placas foram incubadas a 37°C por até 48 horas. Nos *swabs* em que não houve crescimento bacteriano após este período, foram semeados novamente em caldo infusão cérebro coração – BHI (Himedia) e incubados pelo mesmo período para posterior isolamento por esgotamento em agar EMB. Foram selecionadas placas contendo crescimento presuntivo de *E.coli*. A seguir foram selecionadas 10 colônias de cada amostra que foram transferidas para Agar triptonso soja (TSA).

3.3. Extração do DNA

De cada 10 colônias isoladas em Agar triptonso soja foi feito um “pool”. O pool das linhagens de cada amostra, obtido como descrito em 3.2 foi suspenso em 800 µl de água ultra-pura para obtenção do DNA bacteriano por lise térmica. O pool de amostras foi tratado a 96°C em banho-maria e resfriado bruscamente, e em seguida, submetido à centrifugação a 13.0000 g por 10 segundos.

3.4. Procedimento de PCR

3.4.1. Oligonucleotídeos iniciadores (“primers”)

As sequências dos “primers” empregados estão descritos na Tabela 1. Os primers foram sintetizados pela Life Tech. Brasil com. Ind. Prod. Biotec. Ltd (São Paulo, SP, Brasil) e fornecidos sob a forma liofilizada. No momento do uso foram diluídos com 250 µl água ultra

pura estéril, ajustando-se a concentração final para 500 ng/ µl de DNA.

Tabela 1: Sequencia dos primers utilizados

Gene Fenótipo		Primer e sequencia (5' - 3')	Tamanho do produto (PB)	Referências
<i>Eae</i> (EAEC)	EP1	AGGCTTCGTCACAGTTG	570	China et al. (1996)
	EP2	CCATCGTCACCAGACGA		
<i>Adesina intimina</i>				
pAA (EAEC)	pAA1	CTGGCGAAAGACTGTATCAT	630	Schimidt et al. (1995)
	pAA2	CAATGTATAGAAATCCGCTGTT		
Plasmídeo aderência agregativa				
<i>aggR</i> (EAEC)	AGGR1	CTAATTGCTACAATCGATGTA	308	Nataro et al. (1994)
	AGGR2	ATGAAGTAATTCTTGAAT		
Regulador de expressão da expressão de vários genes- regulon				
EAF (EPEC)	EAF1	CAGGGDAAAAGAAAGATGATA	397	Franke et al. (1994)
	EAF2	A		
TATGGGGACCATGTATTATCA				
Fator de aderência de <i>E. coli</i>				
BFPa (EPEC)	<i>bfp1</i>	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	326	Gunzburg et al. (1995)
	<i>bfp2</i>	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA		
“Bundle forming pillus”				

3.4.2. Execução do PCR - Condições do “mix” e programas de amplificação

Durante a montagem da reação, todos os reagentes permaneceram à temperatura aproximada de 0°C com auxílio de uma cuba especial (Labtop Cooler Jr., NALGENE, USA) com exceção do DNA molde. As concentrações dos reagentes empregados nas reações de PCR para cada gene pesquisado encontram-se nas Tabelas 2 e 3. Os reagentes foram adicionados na seguinte ordem: água, tampão, cloreto de magnésio, “primers”, dNTPs, DNA molde e Taq DNA polimerase. Inicialmente no interior da câmara de PCR (UV Chamber modelo 825 UVC. PLAS LABS INC., Lasing, Michigan, USA) foram misturados os reagentes exeto o DNA molde e Taq DNA polimerase. O volume da solução de “master mix” foi calculado considerando-se uma reação a mais, com o objetivo de evitar erro na pipetagem de algum dos reagentes. Do “máster mix” foram retiradas as alíquotas (aproximadamente

40µl) de meio reacional e distribuídas em tubos de 0,5 mL (Gene Amp, Sigma Chemical Co. Saint Louis, MO, USA) novos e estéreis. Em seguida, na câmara de fluxo laminar foram adicionados os DNAs molde (5µl) a cada tubo e estes eram levados ao termociclador (MiniCycler ou PTC100TM; MJ Research, INC., Watertown, Massachusetts, USA).

Tabela 2: Concentrações dos reagentes empregados nas reações de PCR para cada um dos genes pesquisados de *E. coli* EAEC.

Reagentes / Concentração do estoque	Paa Vol. Reação (µl) / conc. final reação	Aggr Vol. Reação (µl) / conc. final reação
Água ultra pura – mili Q	33 -	29
Tris-HCl 10X	3,75 0,75 X	5,0 1,0 X
MgCl ₂ 50 Mm	1,25 1,25 mM	1,5 1,5 mM
Oligonucleotídeos 1 (500ng/µl)	PAR 1 0,5 250 ng/µl	Aggr-F 1,0 500 ng/µl
Oligonucleotídeos 2 (500ng/µl)	PAR 2 0,5 250 ng/µl	Aggr-R 1,0 500 ng/µl
dNTP (2,5 mM)	1 0,05 mM	1 0,05 mM
DNA (µL)	5 -	5 -
Taq DNA polimerase (50U/µl)	5 2,5 U/µl	5 2,5 U/µl

Tabela 3 Concentrações dos reagentes empregados nas reações de PCR para cada um dos genes pesquisados de *E. coli* EPEC.

Reagentes / Concentração do estoque	EAF Vol. Reação (µl) / conc. final reação	BfP Vol. Reação (µl) / conc. final reação	Eae Vol. Reação (µl) / conc. final reação
Água ultra pura – mili Q	29 -	29 -	29 -
Tris-HCl 10X	5 1,0 X	5 1,0 X	5 1,0 X
MgCl ₂ 50 mM	2 2 mM	2 2 mM	2 2 mM
Oligonucleotídeos 1 (500ng/µl)	EAF1 1 500 ng/µl	BFP1 1 500 ng/µl	Ep1 1 500 ng/µl
Oligonucleotídeos 2 (500ng/µl)	EAF2 1 500 ng/µl	BFP2 1 500 ng/µl	Ep2 1 500 ng/µl
dNTP (2,5 mM)	2 0,1 mM	2 0,1 mM	2 0,1 mM
DNA (µL)	5 -	5 -	5 -
Taq DNA polimerase (50U/µl)	5 2,5U/µl	5 2,5U/µl	5 2,5U/µl

A reação de PCR foi realizada com partida a quente para evitar que durante o tempo transcorrido do preparo da reação até o primeiro ciclo de aquecimento, fossem gerados, pela taq DNA polimerase, em condições de baixa estringência, produtos não específicos prejudiciais à especificidade e sensibilidade da reação. Neste método ("Hot-Start"), o master-mix foi preparado sem a adição da enzima, o meio reacional distribuído pelos tubos da reação e em seguida o DNA molde foi introduzido. Os tubos foram então levados ao termociclador, e aos 5 ou 8 minutos do primeiro ciclo de aquecimento adicionou-se a Taq DNA polimerase (GIBCO), seguindo-se então o programa especificado na Tabela 4.

Iniciava-se a reação com partida a quente e após o primeiro ciclo, foi adicionada uma alíquota de 5µl de Taq DNA polimerase diluída 1:10 e previamente centrifugada. Após esta etapa cada reação seguiu o protocolo de ciclagem específico para cada gene conforme Tabela 3. Os tubos foram refriados a 4°C e mantidos em freezer -20°C até o momento da eletroforese em gel.

Tabela 4 - Condições de amplificações utilizadas nas demais reações De PCR Neste estudo

Gene/Fen	Etapa	Temperaturas	Tempos (seg.)	No. de Ciclos	Produto
<i>Eae</i>	D	94°C	300	1	630
		94°C	60	35	
	A	55°C	90	35	630
	E	72°C	90	35	630
		72°C	300	1	
	D	94°C	300	1	630
<i>paa</i>	D	94°C	300	1	630
		94°C	40	30	
	A	53°C	120	30	630
	E	72°C	120	30	630
		72°C	300	1	
	D	94°C	300	1	308
<i>aggR</i>	D	94°C	300	1	308
		94°C	60	35	
	A	51°C	60	35	308
	E	72°C	60	35	308
		72°C	480	1	
	D	96°C	300	1	397
EAF	D	96°C	300	1	397
		96°C	40	29	
	A	60°C	60	29	397
	E	70°C	45	29	397
		70°C	300	1	
	D	94°C	300	1	326
<i>BfpA</i>	D	94°C	300	1	326
		94°C	30	29	
	A	56°C	60	29	326
	E	72°C	90	29	326
		72°C	300	1	

(D) Desnaturação, (A) Anelamento, (E) extensão.

Nos “pools” em que se obteve positividade para um gene de virulência foi testada cada colônia individualmente e realizada nova extração de DNA. Ao mesmo tempo foi feito estoque a -20°C em caldo BHI adicionado de 20% de glicerol para posterior análise por PFGE (eletroforese de campo pulsado em gel) (Figuras 1 e 2). A análise de similaridade dos padrões de bandas produzidos por PCR entre as amostras foi feita visualmente, comparando-se o peso molecular dos fragmentos. Foram considerados idênticos aqueles padrões de bandas que apresentaram exatamente o mesmo número de fragmentos com pesos moleculares iguais.

Para a técnica de PFGE, convencionou-se que duas ou mais amostras seriam consideradas idênticas quando o padrão de restrição apresentasse o mesmo número de fragmentos de mesmo peso molecular. Amostras similares seriam aquelas que apresentassem 1 ou 2 fragmentos diferentes, e aquelas que apresentassem 3 ou mais fragmentos diferentes seriam consideradas diferentes ou não relacionadas. A PFGE é um método usado para diferenciar cepas específicas de bactérias por meio da migração de DNA por tamanho em gel

de agarose, estimulado por uma corrente elétrica. È um método mais discriminatório que a eletroforese em gel de agarose. È um método mais sensível e discriminatório que a eletroforese em gel convencional, porque o campo elétrico usado para estimular a migração de DNA é pulsado (de variação constante) em vez de uniforme.

3.5. Teste de Aderência

Confirmou-se a positividade dos testes de PCR através de técnicas de culturas de células e produção de biofilme, realizadas no laboratório de biologia da Universidade Federal Fluminense.

Os testes de aderência conforme descrito por Craviotto et al. (1979), utilizando tempos de incubação de 3 e 6 horas, como sugerido por Scotland et al. (1989). Depois de atingida a confluência, os tapetes foram lavados duas vezes com PBS-D, sendo acrescentado a cada poço da microplaca um mL do meio MEM, sem antibiótico e suplementado com 2% (v/v) de SFB (soro fetal bovino) e 1% (p/v) de D-manose (Merck). Cada poço foi então inoculado com 35 microlitros de um cultivo em TSB (20 horas, 37°C) da amostra bacteriana em teste e a microplaca foi então incubada por três horas em atmosfera enriquecida de CO₂. Após o período de três horas, o meio foi removido e os tapetes foram lavados duas vezes com PBS-D, sendo em seguida os tapetes celulares fixados com metanol (10 minutos). Para os testes de seis horas, após três horas, os tapetes foram lavados e novo volume de MEM foi adicionado aos poços, sendo a placa re-incubada por mais três horas a 37°C, em atmosfera enriquecida com CO₂. Após a fixação por metanol este foi removido e substituído por solução de Giemsa (Merck) diluído a 1:30(v/v) em tampão fosfato pH 6,5. Deixou-se uma noite a 4°C, e as lâminulas recobertas com os tapetes celulares foram removidas, imersas rapidamente em água e colocadas para secar. Em seguida, foram montadas com resina Entelam (Merck) sobre lâminas de microscopia e após o endurecimento da resina foram observados ao microscópio ótico (Nikon-Labophot).

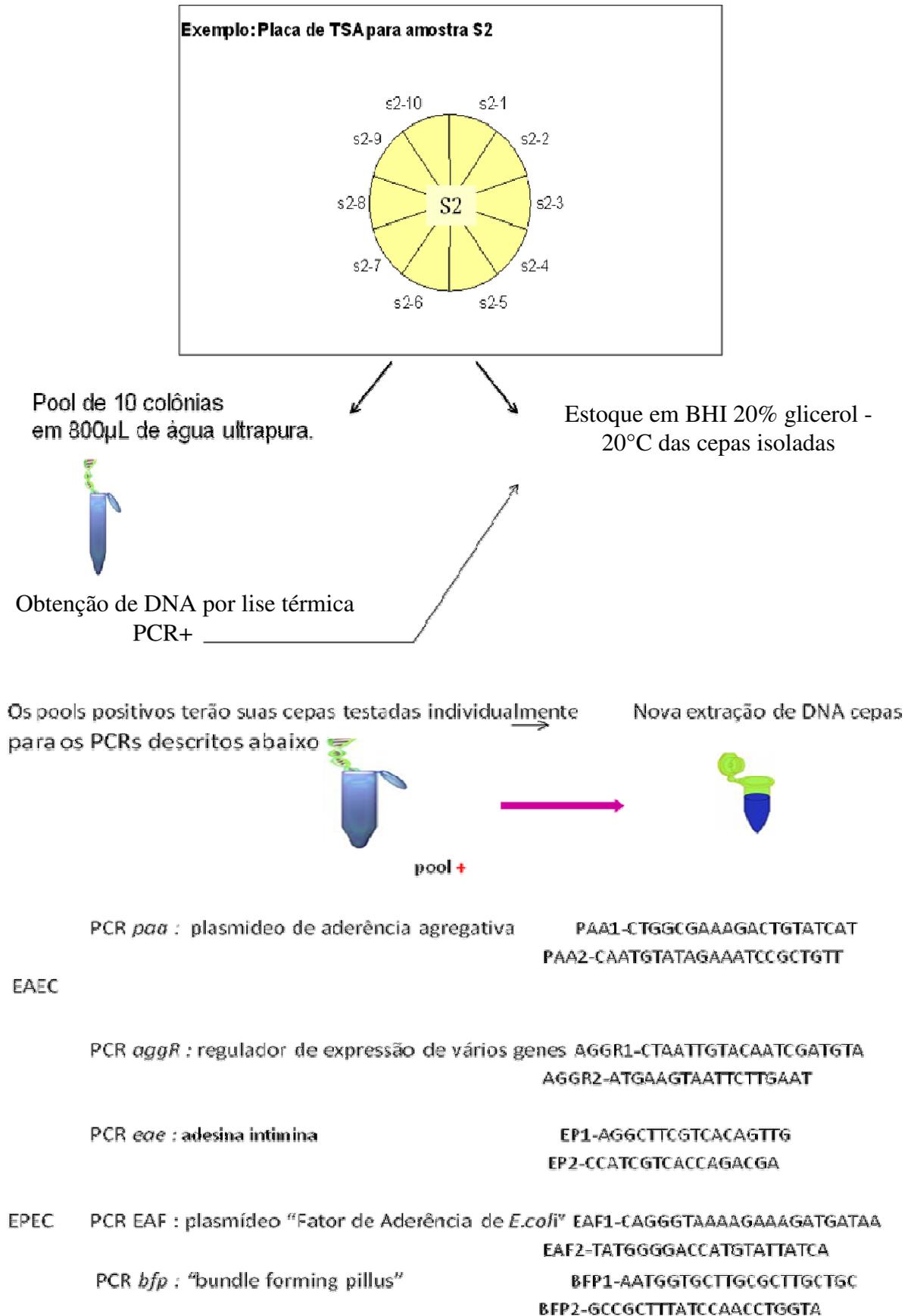


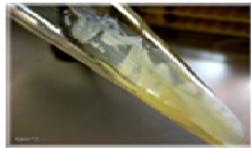
Figura 1: Extração do DNA dos isolados e amplificação por PCR

Estoque BHI 20% glicerol



Repique em TSB
Estufa 37°C por 18 a 20h TSB

Repique Agar inclinado



PFGE

bioquímica

CV
SIM

Citrato Simmons



Figura 2: Procedimento para isolamento de DNA a partir de tubos de cultura congelados

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da coprocultura convencional, que neste estudo voltou-se apenas em detectar a presença de *E. coli* típica ou não, não sendo investigada a presença de outros agentes como por exemplo a ocorrência de infecções por *Salmonella*, sendo possível que infecções por esses agentes tenham passados despercebidos em função das referidas terapêuticas antimicrobianas, uma vez que em crianças, infecções por esses agentes podem ser de elevada gravidade levando os clínicos a uma intervenção terapêutica precoce; em relação a *Shigella*, a sua ocorrência na faixa etária estudada costuma ser muito variável. Dentre as categorias de *E. coli* diarreio genicas pesquisadas por PCR, não foram encontradas *E. coli* enteropatogênicas, em concordância com relatos de outros pesquisadores nacionais, que informam frequência de isolamento muito reduzido para esta faixa etária (GIRALDI et al, 1990; PIVA e GIUGLIANO, 1997, etc).

Do total de 39 amostras, sendo 31 amostras de swabs não houve crescimento em 18, que foram então repicadas em caldo BHI. Os 19 restantes apresentaram crescimento bacteriano sugestivo de *E. coli* em agar EMB. Foram obtidos 10 colônias sugestivas de *E. coli* de cada amostra e feito um pool que foi submetido à PCR. Foi detectada positividade para o pool obtido da amostra do hospital de Seropédica cuja criança apresentava quadro de diarreia e recebia leite em pó Nam 1. A linhagem isolada denominada de S2 foi testada individualmente, considerando um total de 10 colônias que formavam o “pool”. Para o gene PAA assim como para o gene AggR sendo confirmados 5 isolados de 10 testados, para dois marcadores de virulência de *E. coli* enteroagregativa, Agg-R e PAA (Figura 3).

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é definida pela aderência agregativa (AA) às células HEp-2. Como pode ser observado na Figura 3 as amostras foram positivas concomitantemente para 2 dos 3 alvos de virulência de EAEC. De acordo com DUDDLEY et al. (2006), o gene AggR é necessário para a expressão dos genes codificados por plasmídeo que mediam AA da EAEC linhagem 042. Assim, AggR é um gene regulador geral dos determinantes de virulência de EAEC.

A confirmação da origem por PFGE foi realizada após obtenção de um novo pool a partir das 5 colônias positivas no PCR que foram denominadas, S2//2; S2/3; S2/5; S2/7 e S2/8, confirmando-se o resultado obtido, tendo em vista que o padrão de restrição apresentou-se com o mesmo número de fragmentos, e portanto, de mesmo peso molecular. (Figura 4).

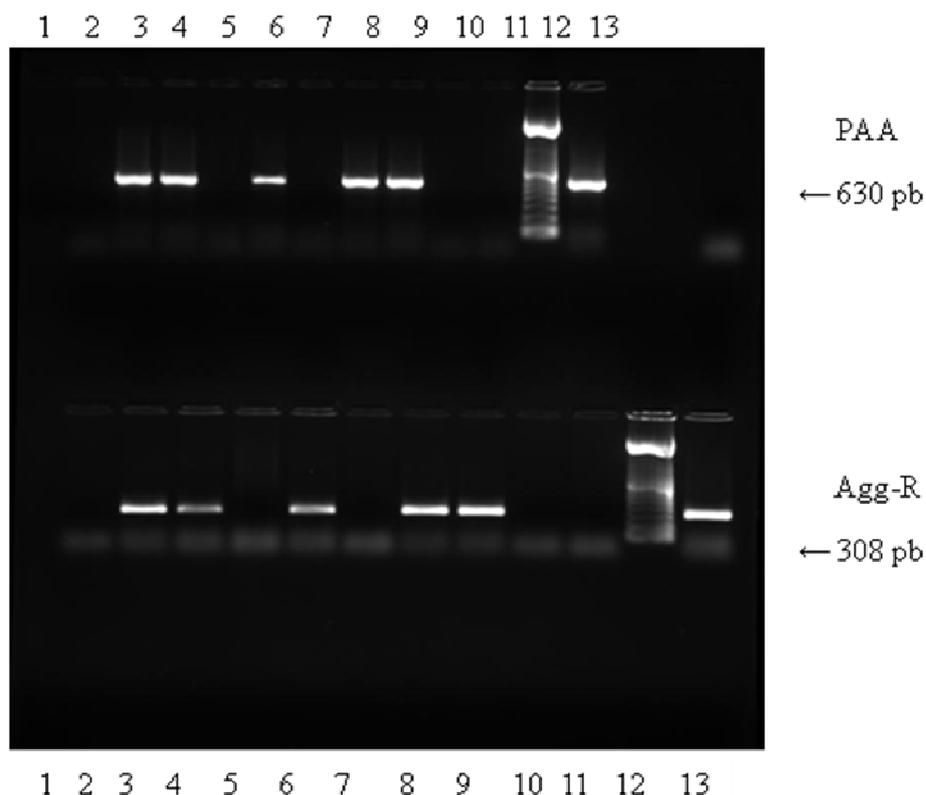


Figura 3: Resultado do PCR para os alvos detectados de virulência dos genes: PAA (parte superior) e Agg-R (parte inferior) - Linha 1, controle negativo (*E. coli* C 600) dos genes PAA e AggR; linhas 2, 5, 7, 10 e 11, amostras negativas; linhas 3, 4, 6, 8 e 9, amostras positivas para ambos os genes; linhas 12, marcadores – 100 pb Ladder; linha 13, controle positivo (*E.coli* EAEC O42).

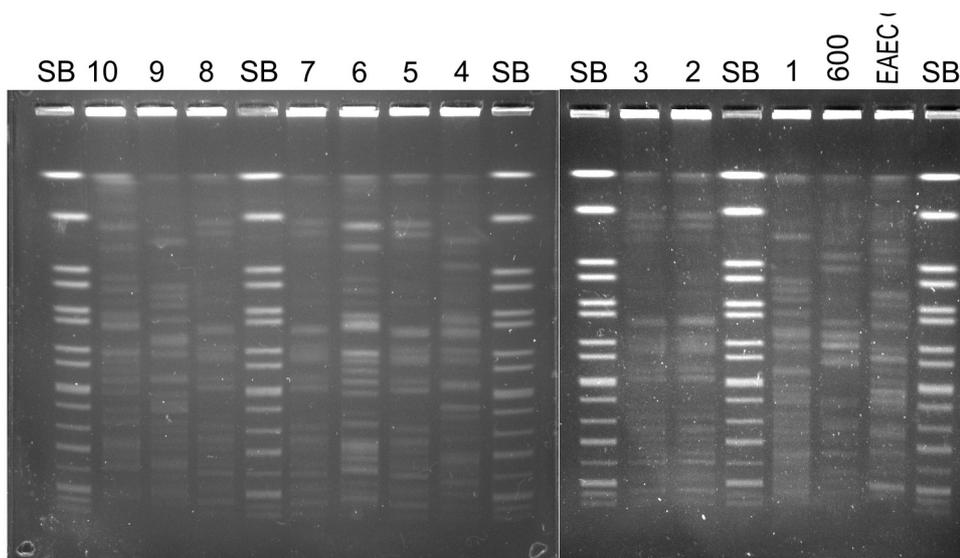


Figura 4: PFGE das colônias componentes do “pool” positivo para os genes Agg-R e pAA. SB, padrão; 600, controle negativo *E. coli* C 600; EAEC 042, controle positivo de *E. coli*; isolados positivos para o PCR (2, 3, 5, 7, 8); isolados negativos para o PCR (1, 4, 6, 9 e 10)

Após esta primeira etapa foram realizados PCR para outros alvos de virulência, (*eae*, *EAF*, *bfp*), mas não foram encontrados resultados positivos para estes alvos.

A linhagem positiva, confirmada pelo PFGE, foi também submetida ao teste de aderência em cultura de células Hep2, apresentado resultado positivo (Figura 5). Também foi realizada avaliação semiquantitativo por ELISA, assim como formação de biofilme, cujos resultados confirmaram a presença de EAEC. Portanto obteve-se uma correlação de 100% entre os marcadores genotípicos e fenotípicos.

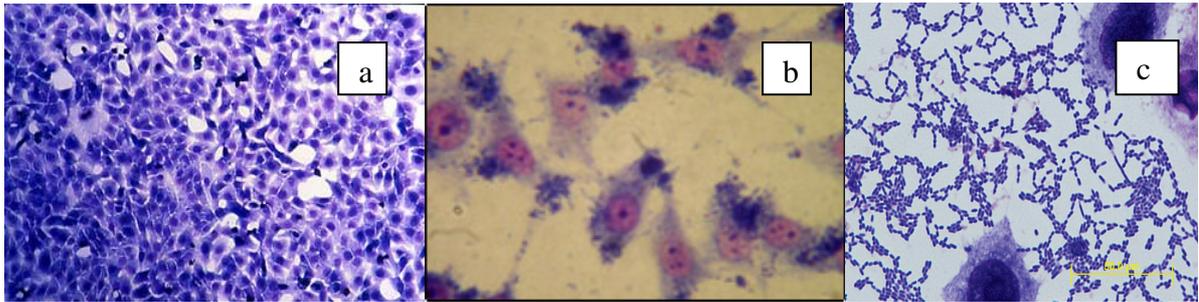


Figura 5: Teste de Aderência em Cultura de células Hep-2. a) aderência de *E. coli* em camada confluenta de células Hep-2; b) aderência agregativa (AA) de *E. coli* às células Hep-2; c) disposição de células de *E. coli* em configuração de tijolos empilhados (stacked-brick).

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados do presente estudo pode-se concluir que:

- A sensibilidade e especificidade da técnica do PCR recomendariam a sua utilização como método de triagem para o diagnóstico de certos agentes de diarreias de difícil caracterização, como é o caso das categorias diarreiogênicas de *E. coli*. Apenas os materiais positivos ao PCR seriam em seguida procesados por métodos convencionais e/ou moleculares, visando o isolamento do agente e o seu estudo posterior.
- O monitoramento de todas as variáveis envolvidas que vai da ordenha a pasteurização do leite humano e a sua distribuição podem possibilitar a identificação de influências na qualidade do leite humano já que o processo de pasteurização pode ser vulnerável as contaminações do ar ambiente recipiente de armazenamento e mão de manipuladores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, M.J.; FARUQUE, S.M.; FARUQUE, A.S.G. et al. Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children. **J Clin Microbiol** 1995; 33: 973-977.
- Andersen, M.R.; OMIECINSKI, C.J. Direct extraction of bacterial plasmids from food for polymerase chain reaction amplification. **Appl Environ Microbiol** 1992 : 58(12) 4080-4082.
- ANDRADE, J.R.C.; VEIGA, V.F.; SANTA ROSA, M.R.; SUASSUNA, L. An Endocytic process in Hep-2 cells Induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. **J Med Microbiol.** 1989 :28 :49-57.
- BALDINI, M.M.; KAPER, J.P.; LEVINE, M.M.; CANDY, D.C.A.; MOON, H.W. Plasmid-mediated adherence in enteropathogenic *Escherichia coli*. **J Ped Gastroenterol Nutr** : 1983, 2 : 534-538.
- BAUDRY, B.; SAVARINO, S.J.; VIAL, P.; KAPER, J.B.; LEVINE, M.M. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*. A recently discovered diarrheal pathogen. **J Infect Dis** 1990; 161: 1249-1251.
- BENJAMIN, P, FEDERMAN, M.; WANKE, C.A. Characterization of invasive phenotype associated with enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun** 1995; 63: 3417-3421.
- BOILEAU, C.R.; D'HAUTEVILLE, H.M.; SANSONETTI, P.J. DNA hybridization technique to detect *Shigella sp* and enteroinvasive *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol** 1984 ; 20 : 959-961.
- BEDENDO, J.; PIGNATARI, A.C.C. Tipagem de *Enterococcus faecalis* por Pulsed Field Gradient gel Electrophoresis e Reação em cadeia de polimerase. **Rev. Ciência Cuidado e Saúde**, 2002; v.1, n.117-122.
- CANIZALEZ-ROMAN, A. e NAVARRO-GARCIA, F. Fodrin CaM-binding domain cleavage by Pet from enteroaggregative *Escherichia coli* leads to actin cytoskeletal disruption. **Mol Microbiol**, v.48, n.4, May, p.947-58, 2003.
- COHEN, M. B., HAWKINS, J. A., WECKBACH, L. S., STANECK, J. L., LEVINE, M. M. e HECK, J. E. Colonization by enteroaggregative *Escherichia coli* in travelers with and without diarrhea. **J Clin Microbiol**, v.31, n.2, Feb, p.351-3, 1993.
- CZECZULIN, J. R., BALEPUR, S., HICKS, S., PHILLIPS, A., HALL, R., KOTHARY, M. H., NAVARRO-GARCIA, F. e NATARO, J. P. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v.65, n.10, Oct, p.4135-45, 1997.
- CZECZULIN, J. R., WHITTAM, T. S., HENDERSON, I. R., NAVARRO-GARCIA, F. e NATARO, J. P. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v.67, n.6, Jun, p.2692-9, 1999.
- CARY, S.G.; BLAI, E.B. New transport medium for shipment of clinical specimen.I, fecal specimens. **J Bacteriol**, 1964, 88: 96-98. CAMPOS L. C.; TRABULSI, L. R.. *Escherichia*. In Trabulsi, L.R.; ALTHERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. (EDS) **Microbiologia**, p. 215-234, 3 ed, Editora Atheneu, 1990; São Paulo.
- CETUS CORPORATION STRATEGIC PLAN, **Tese/ Dissertação**, Ed Emerylle, CA: **The**

Corporation, Rev-Periódico, 1987.

CHIEN, A.; EDGARD, D.B.; TRELA, J.M. Deoxiribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus* **J Bacteriol.** 1976; 127-1550.

CHINA, B.; PIRSON. V.; MAINIL. J. Typing of bovine Attaching and Effacing by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. **Appl Environ Microbio**, 1996, 62:3462-65.

CRYAN, B. Comparison of three systems for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. **J Clin Microbiol.** 1990 : 28 : 792-794.

CRAVIOTO, A. ; GROSS,R.J.SCOTLAND,S.M. e ROWE,B.an : Adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional enteropathogenic serotypes. **Curr Microbiol**,v.3, p.95-99,1979.

DEBROY, C.; YEARLY, J.; WILÇSON, R.A.; BRAN, M.K.; KUMAR, R. Antibodies raised against the outer membrane protein interrupt adherence of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun.** 1995 ; 63 : 2873-2879.

DICKINSON, B.L.; CLEMENTS, J.D. Dissociation of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin adjuvanticity from ADP-ribosyltransferase activity. **Infect Immun** 1995 ; 63 : 1617-1623.

DONNENBERG, M.S.; KAPER Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect Immun.** 1992,60 : 3953-3961.

DONNENBERG, M. S. e WHITTAM, T. S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **J Clin Invest**, v.107, n.5, p.539-548, 2001. 95

DUDLEY, E. G, THOMSON NR, PARKHILL J, MORIN NP, NATARO JP. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol Microbiol.** Source. Center for Vaccine Development, University of Maryland School of Medicine, 685 W. Baltimore St., Baltimore, MD 21201, USA. Sep;61(5):1267-82.

ECHEVERRIA, P.; TAYLOR, D.N.; SERIWATANA, J.; BROWN, J.E.; LEXOMBOOM, S. Examination of colonies and stol blots for detection of enteropathogens by DNA hybridization with eight DNA probes. **J Clin Microbiol.** 1989 ; 27 : 331-334.

EDWARDS, P.R. ; EWING, W.H. Identification of Enterobacteriaceae. **Burgess Publishing Co.** 1972.Minneapolis Minn.

ELIAS, W. P., UBER, A. P., TOMITA, S. K., TRABULSI, L. R. e GOMES, T. A. Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhoea. **Epidemiol Infect**, v.129, n.1, Aug, p.49-55, 2002.

ELSINGHORST, E.A.; KOPECKO, D.J. Molecular cloning of epithelial cell invasion determinants from enterotoxigenic *Escherichia coli* **Infect immun** 1992.60 : 2409-2417.

FAGUNDES-NETO, U. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in infants: clinical aspects and small bowel morphological alterations. **Rev. Microbiol.** São Paulo. 27: 117-119 p. 1996.

FRANKEL, G., PHILLIPS, A. D., ROSENSHINE, I., DOUGAN, G., KAPER, J. B. e KNUTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Mol Microbiol**, v.30, n.5, Dec, p.911-21, 1998.

FRANZOLIN, M. R., ALVES, R. C., KELLER, R., GOMES, T. A., BEUTIN, L., BARRETO, M. L., MILROY, C., STRINA, A., RIBEIRO, H. e TRABULSI, L. R. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.100, n.4, Jul, p.359-63, 2005.

FRANKEL, G.; GIRON, J.A.; VALMASSOI, J.; SCHOOLNIK, G.K. Multi-gene amplification : simultaneous detection of three virulence genes in diarrheal stool. **Mol microbiol** 1989, 3 :1729-1734.

FRANKE, J.; FRANKE, S.; SCHMIDT, H.; et al. Nucleotide Sequence Analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. **J Clin Microbiol**, 1994, 32:2460-2463.

FEINBERG, A.P.; VOGELSTEIN, P.; Isolation of DNA Fragments for labelling. **Anal Biochem**. 1984 132 : 6-13.

FLORES, J.; OKHYSEN, P.C. Enteroagregative *Escherichia coli*. **Infection. Current Opinion in gastroenterology**, 2008, v.25 p.8-11.

GIRÃO, D. M., GIRÃO, V. B. C., IRINO, K. e GOMES, T. A. T. Classifying *Escherichia coli*. **Infect. Dis.**, v.12, n.8, 2006.

GIRON, J.A.; DONNEMBERG, M.S.; MARTIN, W.C.; JARVIS, K.G.; KAPER, J.B. Distribution of bundle-forming pilus structural gene(bfpA) among enteropathogenic *Escherichia coli* **J Infect Dis**. 1993 ; 168 : 1037-1041.

GIRON, J.A. H.O., A.S.; SCHOOLNIK, G.K. An Inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**. 1991b, 254 : 710-713.

GIRALD,R., GUTH,B.E.C. e TRABULSI, L,R. Production of Shiga like-toxin among *Escherichia coli* strains and other bacteria from diarrhea in São Paulo, Brazil. **J Clin Microbiol**, n.5 ; p.1460-1462. ; 1990.

GOMES,T.A.T., TOLEDO,M.R.F., TRABULSI,L.R.,WOOD,P.K, e MORRIS,J.G.: DNA probes for identification of enteroinvasive *Escherichia coli* **J. Clin Microbiol**, v.25, p.2025-2027., 1987.

GOMES, T.A.T.; RASSI,V. ; Mac Donald,K.L. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo,Brazil. **J Infect Dis**, v.164, p.331-337 ;1991.

RABULSI, L.R.; WOOD, P.K.; MORRIS, J.G. DNA probes for identification of enteroinvasive *Escherichia coli*. **J clin Microbiol** 1987, 25 : 2025-2027.

GUNZER, F.; BOHM, H.; RUSSMAN, H.; BITZAN, M.; LEKSIC, S.; KARCH, H. Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* 0157 in patients with hemolytic-uremic-syndrome. **J Clin Microbiol**. 1992, 30 : 1807-1810.

GUNZBURG, S.T.; TORNIEPORTH, N.G.; RILEY, L. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene, **J clin Microbiol**, 1995, 33 : 1375-1377.

GREENBERG, D. E., JIANG, Z. D., STEFFEN, R., VERENKER, M. P. e DUPONT, H. L. Markers of inflammation in bacterial diarrhea among travelers, with a focus on enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenicity. **J Infect Dis**, v.185, n.7, Apr 1, p.944-9, 2002.

HARRINGTON, S. M., DUDLEY, E. G. e NATARO, J. P. Pathogenesis of

- enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol Lett**, v.254, n.1, Jan, p.12-8, 2006.
- HENDERSON, I. R., CZECZULIN, J., ESLAVA, C., NORIEGA, F. e NATARO, J. P. Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v.67, n.11, Nov, p.5587-96, 1999.
- HERNANDES, R. T., VIEIRA, M. A., CARNEIRO, S. M., SALVADOR, F. A. e GOMES, T. A. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains that express typical localized adherence in HeLa cells in the absence of the bundle-forming pilus. **J Clin Microbiol**, v.44, n.11, Nov, p.4214-7, 2006.
- HICKS, S.; CANDY, D.C.A.; PHILIPS, A.D. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro **Infect Immun** 1996, v. 64, p. 4751-4760.
- HILL, S.M.; PHILIPS, A.D.; WALKER-SMITH, J.A. Enteropathogenic *Escherichia coli* and life threatening chronic diarrhea. **Gut** 1991 ; 32 : 154-158.
- JERSE, A. E., YU, J., TALL, B. D. e KAPER, J. B. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.87, n.20, Oct, p.7839-43, 1990.
- KAPER, J. B., NATARO, J. P. e MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol**, v.2, n.2, Feb, p.123-40, 2004.
- KARCH, H.; BIELASZEWSKA, M.; BITZAN, M e SCHMIDT, H. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v.34, p.229-243, 1999.
- KESKIMAKI, M., EKLUND, M., PESONEN, H., HEISKANEN, T. e SIITONEN, A. EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.40, p.151-156, 2001.
- KESSLER, C. Non radioactive labeling and detection of nucleic acid probes In : Games BD & Higgs SJ(eds) .Gene Probes 1 : A Practical Approach, 1995, pp930114, **Oxford University Press**, New York.
- KLEPPE, K.; OSHSTUKA, E.; KEPPE, R.; MOLINEUX, L.; KHORANA, H.G. Studies on polynucleotides, xcvi. Repairs replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA Polymerase **J Mool Biol.** 1971, 56 :341.
- KOSTMAN, J.R.; et al. The universal approach to bacterial molecular epidemiology by polymerase chain reaction ribotyping. **Journal Infectious disease**, v.17, n.09, p.204-208, 1995.
- LANATA, C.F.; KAPPER, J.B.; BALDINI, M.M.; BACK, R.B.; LEVINE, M.M. Sensitivity and specificity of DNA probes with the stool blot technique detection of *Escherichia coli* enterotoxins. **J. Infect Dis.** n. 152, p.1087-1090, 1985.
- LEVINE, M.M., PRADO, V., ROBINS-BROWNE, R. Et al. Use of DNA probes and Hep2 cell adherence assay to detect diarrheagenic *Escherichia coli*. **J Infect Dis** 1988 ;158 :224-228.
- MAGALHAES, M. ANDRADE, M. e CARVALHO, A.E. Pathogenic *Escherichia coli* associated with infantile diarrhea. **Rev Microbiol(São Paulo)**, v.12 ; p.38-41, 1981.
- MAGALHÃES, V.D.; FERREIRA, C.J., BARELLI, CDARINA, A.L.C.L. Eletroforese em campo Pulsante em Bacteriologia-Uma Revisão Técnica. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 2005.

64(2), 155-161.

MCDANIEL, T. K., JARVIS, K. G., DONNENBERG, M. S. e KAPER, J. B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.92, n.5, Feb 28, p.1664-8, 1995.

MENARD, L. P. e DUBREUIL, J. D. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. **Crit Rev Microbiol**, v.28, n.1, p.43-60, 2002.

MILLER, V. L., KAPER, J. B., PORTNOY, D. A. e ISBERG, R. R. Molecular genetics of bacterial pathogenesis. Washington: **ASM Press**, 1994. 529 p.

MOON, J. Y., PARK, J. H. e KIM, Y. B. Molecular epidemiological characteristics of virulence factors on enteroaggregative *E. coli*. **FEMS Microbiol Lett**, v.253, n.2, Dec 15, p.215-20, 2005. 103

MOSELEY, S.L.; ECHEVERIA, P.; SERINATANA, J.; TIRAPAT, C.; CHACUMPA, N. SAKULDAIPERA, T.; FALKOW, S. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J Infect Dis**, v. 155, p.809-811, 1982.

MULLIS, K.; FALOONA, F. **Methods Enzymolgy**, 1987; 155-335.

MULLIS, K; FALLOONA, F; SCHARF, S.; SAKI, R.; HORN, G.; ERLICH,H; Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. **Cold spring harbor Symposium in quantitative Bioloy**, v.51, p.263-275,1986.

MURRAY, B.E.; MATTHEWSON, J.J.; DUPONT, H.L.; HILL, W.E. Utlity of oligodeoxyribonucleotide probes for detectyngenterotoxigenicity *Escherichia coli*. **J Infect Dis** 1987 ;155 : 809-811.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol, Ver**, n.11, p.142,1990b.

NATARO,J.P., e KAPER,J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v.11,n.1 Jan, p.142-201,1998.

NATARO,J.P. ; YIKANG,D. ; YINGKANG, D. E WALKER,K. Aggr, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria 1 expression in enteroaggregative *Escherichia coli*.**J Bacteriol**, n.176 : 4691-4699. ; 1994.

NATARO,J.P., STEINER,T. GUERRANT,R.L.: Enteroaggregative *Escherichia coli* **Emerg. Infect Dis**,v.4, n.2, Apr-Jun,p.251-261,1998.

NEWLAND, J.W.; NEIL, R,J. DNA pobes for Shiga – like toxins 1 e 2 for toxin- converting bacteriophages. **J Clin Microbiol** 1988; 26: 1292-1297.

NEIL,R.G. Modulation of Na,K-ATP ase expressionin Renal collecting duct.**Curr Topics In Membrane and transport**,v. 34,p.209,1988.

OLIVE, D.M. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* after polymerase chain reaction amplification with a thermostable DNA Polumerase. **J Clin Microbiol**, 1989 ; 27 : 261-265.

PANET, A.; KHORONA, H.G. Studies on polynucleotides.The Linkage of deoxyribopolynucleotide templates to cellulose and ats use thei replçication. **J Biol Chem**, 1974 ; 249 :5213-5221.

PATON, A.W.; PATON, J.C. detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx2,eaeA,enterohemorrhagic *Escherichia coli*

hlyA,rfb0111,and rfb)157.**J Clin Microbiol**, 1998a; 36:598-602.

PATON, A.W.; PATON, J.C.; GOLWATWER, P.N.; MANNING, P.A. Directed Detection of *Escherichia coli* Shiga – like toxin genes in primary fecal cultures by polymerase Chain Reaction. **J Microbiol**,1993,31: 3063-3067.

PERSING, D.H. In viro nucleic acid amplification techniques in: Persing DH,Smith JF,Tenover FC & White TJ(eds) > Diagnostica Molecula Microbiology : Principles and Applications. 1993,51-87. **ASM press**, Washington D.C.

PRADO, E.H.R.B. Detecção de genes específicos de *Escherichia coli* Diarreio gênicas por Reaçã o da Polimerase em Cadeia (PCR) em Diarré ia Infantil Aguda no Rio de Janeiro. **Disertaçã o de Mestrado**, UERJ, 2000.

PIVA,I.C. e GIUGLIANO,L.G. Frequency of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in Brazilian children,D.F.; Brazil **Abstract**, v.180, 3 ed. **International Symposium on Shiga toxin(verocytotoxin)- Producing Escherichia coli** Infections, Jun 22-26, Baltimore,1997.

ROBINS-BROWNE,R.C.S., STILL,M.; MILIOTIS,D. Summer diarrhoea in African Infants and children. **ARCH Dis Child**, v.55, p.923-928; 1980.

ROSA,A.C.P.; MARIANO, A.T.; PEREIRA,A.M.S.; TIBANA, A ., GOMES, T. A . T . e ANDRADE, J. R. C. Enteropatogenicity marers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarroea and health controls in Rio de Janeiro, Brasil. **J Med Microbiol**, v.47; p.781-790.,1998.

RODRIGUES,K.B.: Expressã o de Proteina Recombinante da Capa do *Citrus sudden death-Associated vírus* utilizando o sistema de *Baculovirus* e Produçã o de anticorpo. **Dissertaçã o**-Universidade Cató lica de Brasí lia. Brasí lia,2010.

SANSONETTI, P.J. Molecular and cellular biology of *Shigella flexneri* invasiveness : from cell assay systems to *shigellosis*. **Curr Top Microbiol Immunol**. 1992 ;180 : 1-19.

SAVARINO, S. J., MCVEIGH, A., WATSON, J., CRAVIOTO, A., MOLINA, J., ECHEVERRIA, P., BHAN, M. K., LEVINE, M. M. e FASANO, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. **J Infect Dis**, v.173, n.4, Apr, p.1019-22, 1996.

SALYERS,A.A. e WHITT,D.D. **Bacterial Pathogenesis. A molecular approach**.Washington D.C.: ASM Press, 539 p.,2002.

SAVARINO,S.J.; FASANO,A; WATSON, J., MARTIN,B.M.; LEVINE,M. M., GUANDALINI,S. e GUERRY,P. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamimily of *Escherichia coli* heat-stable toxin. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 90, n.7, Apr 1, p.3093-3097,1993.

SILVA,C.H.P.M. **Bacteriologia e Micologia para o laborató rui clí nico**. Rio de Janeiro: revinter,v.246, p.258-259.; 2006.

SCHMIDT, H., BEUTIN, L. e KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. **Infect Immun**, v.63, n.3, Mar, p.1055-61, 1995.

SCHMIDT, H., KNOP, C., FRANKE, S., ALEKSIC, S., HEESEMAN, J. e KARCH, H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol**, v.33, n.3, Mar, p.701-5, 1995.

STEINER, T. S., NATARO, J. P., POTEET-SMITH, C. E., SMITH, J. A. GUERRANT, R.

- L. Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. **J Clin Invest**, v.105, n.12, Jun, p.1769-77, 2000. 104
- SCHMIDT, H.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* 0157 :h7 strain EDL933. **Infect Immun** ;1995a.63 : 1055-1061.
- SCHULTSZ, C.; POOL, G.J.; VAN KETEL, R.; EVER, B.; SPEELMAN, P.; DANKERT, J. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR, **J Clin Microbiol**. 1994 ; 32 : 2393-2397.
- SMITH, H.R.; SCOTHLAND, S.M.; WILSHAW, G.A.; ROWE, B.; CREVIOTO, A.; ESLAVA, C. Isolates of *Escherichia coli* 044 :h18 of diverse origin are enteroaggregative. **J infect Dis**. 1994 ; 170 : 1610-1613.
- SMITH, H. R.; SOTLAND, R.; WILLSHAN, G.A. Verocytotoxin and presence of *stx* genes in *Escherichia coli* strains of animal origin. **Journal General Microbiology**, v.154, p.829-834, 1988.
- SHULTZ, H.; FABIANEK, R.A.; PELLICOLI, E.C.; HENECKE, H.; THONYMEYER, L. Heme transfer to heme chaperone *CemE* during heme maturation requires the *CemE* protein, which may function independently of the ABC- transporter *CemAB*, **Proc Natl. Acad Sci USA**, n.96, p.6462-6467., 1999.
- SOMMERFELT, H.; LODISH et al. **Molecular Cell Biology**, 1993.
- SOUZA, V.: Epidemiologia Molecular dos *Staphylococcus aureus* isolados em diferentes pontos do fluxograma de produção de leite, **TESE**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária-UNESP-Jaboticabal-S.P., Brasil, 2010.
- TAYLOR, C.J.; HART, A.; BATT, R.M.; McDOUGALL, C.; MCLEAN, L. Ultrastructural and biochemical changes in human jejunal mucosa associated with enteropathogenic *Escherichia coli* (0111) infection. **J pediatr gastroenterol Nutr**. 1986, 5 : 70-73.
- TAYLOR, D.N.; ECHEVERIA, P.; SETHABUTR, O. Clinical and microbiological features of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infections detected by DNA hybridization. **Journal Clinical Microbiology**, v.26, p. 1362-1366, 1988.
- TARDELLI GOMES, T. A., TRABULSI, L. R. e KELLER, R. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis**, v.8, n.5, May, p.508-13, 2002.
- TENOVER, F.C. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by pulsed field gel electrophoresis : Criteria for bacterial strains typing. **Journal of Clinical Microbiology**, 1995, Washington, DC, v.33 : 2233-2239.
- TOLEDO, M.R.F. e TRABULSI, L.R. frequency of enteroinvasive *Escherichia coli* in children with diarrhea and healthy controls in São Paulo, S.P. Brasil. **Rev Microbiol**, v.21, p.1-4, 1990.
- THOMAS, A.; SMITH, H.R.; WILLSHAW, G.A.; ROWE, B. Non-radioactively labelled polynucleotide and oligonucleotide DNA probes for selectively detecting *Escherichia coli* strains producing Verotoxins, VT1, VT2 and VT2 variant **Mol Cell Probes**, 1991; 5: 129-135.
- THOMAS, A.; CHEAST, T.; CHART, H.; ROWE, B. Isolation of verotoxin-producing *Escherichia coli* serotypes O9ab: and O101:h- carrying VT2 variant gene sequences from patients with haemolytic uraemic syndrome. **Eur. J. clin Microbiol. Infect. Dis.**, v.13, p.

1074-1076, 1994.

TORNIEPORTH, N.G.; JOHN, J.; SALGADO, K. Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR. **J. Microbiol**, 1995 ; 33 : 1371-1374.

TRABULSI, L. R., KELLER, R. e TARDELLI GOMES, T. A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis**, v.8, n.5, May, p.508-13, 2002.

WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: Epidemiology, Virulence and detection, 2007. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56,4-8.

WILLSHAW, G.A.; SMITH, H.R.; SCOTLAND, S.M.; ROWE, B. Heterogeneity of *Escherichia coli* phages encoding vero cytotoxins: Comparison of cloned sequences determining VT1 and VT2 and development of specific gene probes. **J. of General Microbiology**, v.133, p.1309-1317, 1987.

VAEL, C.; STIJN, L.; NELEN, V.; GOOSSENS, H.; DESAGER, N.K. Early intestinal *Bacteroides fragilis* colonization and development of Asthma, **BMC Pulm. Med.**, v.26, p.8-19, 2008.

VENKATESAN, M.M.; BUYSSE, J.M.; KOPECKO, D.J. Use of *Shigella flexneri* ipaC and ipaH gene sequences for the general identification of Shigella spp and nteroinvasive *Escherichia coli* **J. Clin Microbol**, 1989, 27: 2687-2691.

VICTOR, T.; DU TOIT, R.; VAN ZYL, J.; BESTER, A.J.; VAN HELDEN, P.D. Improved method for the routine identification of toxigenic *Escherichia coli*. By DNA amplification of a conserved region of the heat-labile toxin A subunit. **J. Clin Microbiol.**, 1991, 29: 158-161.

YANG, J.R., WU, F.T., TSAI, J.L., UM, J.J., LIN, L.F., CHEN, K.L., KUO, S.H., CHIANG, C.S. e WU, H.S. Comparison between O serotyping method and multiplex real-time PCR to identify diarrheagenic *Escherichia coli* in Taiwan. **J Clin Microbiol**, v.45, n.11, Nov, p.3620-3625, 2007.

UBER, A. P., TRABULSI, L. R., IRINO, K., BEUTIN, L., GHILARDI, A. C., GOMES, T. A., LIBERATORE, A. M., DE CASTRO, A. F. e ELIAS, W. P. Enteroaggregative *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. **FEMS Microbiol Lett**, v.256, n.2, Mar, p.251-7, 2006.

UENO, M; JORGE, A.O.C.: Comparação de Técnicas Moleculares de Análise de DNA Cromossomal de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina. **Rev. Biocienc.**, v.8, n.2, p.43-50, jul-Dez, 2002., 2002.

ANEXOS

MEIOS E REAGENTES

Diluyente:

Caldo Wilkins-Chalgren pré reduzido (será usado para preparar as diluições)

1. Preparar o caldo Wilkins-Chalgren conforme informações do fabricante. Preparar quantidades de 100 mL nos frascos grandes com tampa recravável. Ferver em banho-maria ou microondas para expulsar oxigênio. Esperar esfriar até temperatura ambiente. Se o tubo for fechado muito quente, um vácuo se forma a temperatura ambiente e o ar será sugado para dentro dos tubos na abertura. Se os tubos forem fechados muito frios, pressão será desenvolvida a temperatura ambiente e tenderá a soltar as tampas durante a estocagem. Portanto o melhor é fechar a temperatura ambiente.
2. Adicionar 0,2 mL solução de resazurina por 100 mL
3. Distribuir em quantidades de 8 mL e esterilizar em autoclave
4. Manter os tubos protegidos da luz, a qual inativa a resazurina.
5. Antes de usar adicionar 1 mL da solução redutora (cisteína) e aquecer para expulsar o oxigênio. Os meios só devem ser usados se estiverem claros, pois quando estão vermelhos significa presença de oxigênio.

Solução indicadora de potencial redox

100 mg de resazurina em 100 mL de água destilada previamente esterilizada. Manter esta solução na geladeira ao abrigo da luz.

Solução redutora

0,25 g de Cisteína hidrocloreto em 100 mL de água. Purgar com nitrogênio e esterilizar.

PREPARARO DAS DILUIÇÕES PARA PLAQUEAMENTO

1. Pesar o tubo contendo aproximadamente 1 grama de fezes e, em seguida juntar 8 mL de caldo Wilkins-Chalgren pré-reduzido adicionado de 1 mL de solução redutora (peso do tubo + amostra)
2. Pesar novamente (peso do tubo+ amostra +caldo diluyente)
3. Homogeneizar bem. Esta fica sendo a diluição 10^{-1}
4. Prepare as diluições decimais subseqüentes até 10^{-7}
5. Semeie em superfície nos meios respectivos.

Ex.: N° de colônias contadas x 8,5 x Fator de diluição x 10 (se inoculação em superfície)

ENUMERAÇÃO DE DIFERENTES POPULAÇÕES BACTERIANAS

Serão preparadas diluições decimais (até 10^{-8}) em caldo Wilkins-Chalgren pré reduzido. Alíquotas de 0,1 mL das diluições desejadas serão semeadas em duplicata, em placas contendo os seguintes meios:

- **Anaeróbios totais** - Agar Wilkins-Chalgren
Incubar jarra anaerobiose a 36°C por 4 a 5 dias
- **Bacteroides spp** - Agar Wilkins-Chalgren adicionado de suplemento antibióticos GN (ou Agar Shaedler da Biomerieux)
Incubar jarra anaerobiose a 36°C por 4 a 5 dias

- ***Bifidobacteria spp*** - Agar MRS suplementado com antimicrobianos (HARMSEN et al., 1999)
Incubar jarra anaerobiose a 36°C por 4 a 5 dias
- ***Clostridium sp*** – Agar SPS
Incubar jarra anaerobiose a 36°C por 4 a 5 dias
- ***Lactobacillus spp*** - Agar LAMVAB (HARTEMINK, 1997)
Incubar em sacos plásticos retirando oxigênio com bomba manual seguida de amarradura (para dar condições de microaerofilia) a 36°C por 4 a 5 dias

- **Aeróbios totais – PCA**
Incubar a 36°C por 2 a 3 dias
- ***Escherichia coli*** - agar MacConkey
Incubar a 36°C por 2 a 3 dias
- **Fungos** – Agar Sabouraud
Incubar a 30°C por 2 a 3 dias. Caso não tenha havido crescimento deixar até 5 dias.

Colônias representativas de cada meio seletivo serão identificadas a nível de gênero pela morfologia (coloração de Gram) e testes bioquímicos.

TERMO DE CONSENTIMENTO E PROTOCOLO DE ESTUDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DE ACORDO COM AS NORMAS DA RESOLUÇÃO Nº 196, DO

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE DE 10 DE OUTUBRO DE 1996.

Projeto: Potencial Prebiótico do Leite Humano Comparado ao do Leite em Pó Modificado na Modulação da Microbiota Colônica e Sanidade de Lactentes.

Pesquisadora Responsável: Geraldo dos Santos Oliveira, Doutorando em Tecnologia de Alimentos e Mestre em Microbiologia.

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa sobre a colonização da microbiota intestinal de seu bebê que tem como objetivo geral estudar o efeito prebiótico do leite materno comparando ao de formulas de leite em pó como também determinar o perfil da colonização cutânea. Para analisar a epidemiologia de leveduras do gênero *Candida* isoladas de sítios anatômicos como a região do mamilo das aureolas da mãe e da boca e regiões intertriginosas das crianças. Sua participação não é obrigatória, mas **voluntária**, você pode se recusar a participar da pesquisa ou desistir de participar, a qualquer momento, sem que este fato cause qualquer constrangimento ou penalidade. Os pesquisadores se obrigam a não revelar sua identidade em qualquer publicação resultante deste estudo e você receberá aconselhamento e orientação caso se faça necessário durante sua participação no estudo. Os exames e procedimentos que venham a ser necessário será gratuitos.

Antes de assinar este termo, você deve se informar plenamente sobre ele, fazendo todas as perguntas que ache necessário. Devendo ficar esclarecido(a) quanto às informações que se seguem:

- A) Neste estudo os pesquisadores estarão avaliando o perfil da colonização intestinal de seu filho (bebê), avaliando os possíveis microrganismos que estarão se estabelecendo em seu intestino.
- B) A sua participação estará contribuindo para aumentar os conhecimentos da epidemiologia das possíveis infecções intestinais causadas por espécies de *Candida* e outros microorganismos que possam causar diarreias nos bebês.
- C) Sua participação nessa pesquisa consistirá em fornecer amostras de fezes de seu bebê e, através de swabs quando houver sinais de colonização cutânea por espécies de *Candida* em alguns sítios anatômicos (região do mamilo, boca do bebe, etc.) seu e/ou do bebê.

É importante salientar que não há risco nestes procedimentos. A fezes será coletada da fralda do bebê e o método de coleta através de swabs é inteiramente inócuo, não oferecendo qualquer tipo de risco no momento da coleta.

- D) Por participar dessa pesquisa seus registros médicos serão usados como fonte de informação para a condução do estudo, mas a informação obtida através dessa pesquisa será confidencial e asseguramos o sigilo sobre a sua participação. Os dados não serão divulgados de forma que possam possibilitar sua identificação ou de seu bebê. Os resultados serão divulgados em apresentações ou publicações com fins científicos ou educativos e, sua identidade e de seu bebê jamais será exposta. O comitê de ética do IFF pode ter acesso aos registros.
- E) Participar dessa pesquisa não implicará em nenhum custo para você, e, como voluntário, você não receberá qualquer valor em dinheiro como compensação pela participação. Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador(s) responsável(s), podendo tirar dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou em qualquer momento.

Pesquisadores Responsáveis: Geraldo dos Santos Oliveira, Rosa Helena Luchesi, Franz dos Reis Novak.

Médica Responsável: Dra. Maria Elisabeth Lopes Noronha.

Instituto Fernandes Figueiras, Av. Rui Barbosa nº 716, CEP 222.50-020

Telefones (21) 2554.1700

PROTOCOLO DE ESTUDO COLONIZAÇÃO INTESTINAL EM LACTANTES

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Data de atendimento/internação: ____/____/____

Data do parto: ____/____/____

Local do parto: _____

Banco de leite:

() Ambulatório _____

() Enfermaria _____

Nome: _____ Nº _____

Tel: _____ Data do Parto: _____

Profissão: _____

Queixa Principal: _____

DADOS DE INVESTIGAÇÃO

Usou ou usa:

Pomadas () _____ Cascas () Conchas () Bicos de silicone ()

Chupetas () Protetores de mamilos () Bomba tira leite ()

HISTORIA MATERNA PREGRESA

Presença de Secreção Vaginal () Prurido genital ()

Mastite () Fissura () Ardor () Prurido na mama () Dor ()

Referir tipo de dor _____

Doenças de base: Sim () Qual _____ Não ()

HISTÓRIA MATERNA ATUAL.

Presença de Secreção Vaginal () Prurido perineal ()
Mastite () Fissura () Ardor () Coceira () Dor ao amamentar ()
Vermelhidão nas mamas () Descoloração mamilar () Descamação ()
Pontos esbranquiçados na aureola e mamilos () Saída de Secreção Purulenta ()
Obstrução de ductos mamilares ()

CONDUTA TERAPEUTICA

Não Tem () Antibiotico () Qual _____
Antifúngico Tópico () Qual _____
Antifúngico oral () Qual _____
Vaginitose: Sim () Não ()
Cariomniiose: Sim () Não ()

DADOS DO BEBÊ

Nome: _____
Bebê apresentou () ou apresenta ()
Descamação () Assadura perineal ()
Alergia perineal () Vermelhidão na pele ()

CONDUTA TERAPÊUTICA PARA O BEBÊ

Antibiótico () Qual _____
Antifúngico Tópico () Qual _____
Antifúngico oral () Qual _____

COLETA DE MATERIAL PARA EXAME LABORATORIAL

Da Mãe: Swab da aureola mamilar ()

Ordenha de leite humano ().

Do Bebê: Fezes () Swab oral ()

Swab perineal () Swab cervical ()

Tipo de Alimentação do Bebê

Leite materno () Leite em pó modificado ()

Bebê Internado: Sim () Não ()

Enfermaria: UTI/Alojamento.

Qual: _____

ACOMPANHAMENTO SEMANAL DO BEBÊ

Data do nascimento: _____

1 ^a . Semana	2 ^a . Semana	3 ^a . Semana	4 ^a . Semana	5 ^a . Semana	6 ^a . Semana	7 ^a . Semana	8 ^a . Semana	9 ^a . Semana	10 ^a . Semana

Data da Alta: ___/___/___

Data do Retorno: ___/___/___

Ambulatório () Qual _____

Banco de leite () Qual _____

Obs.: A colonização será estudada semanalmente através de coletas de fezes e o tipo de alimentação por período de dez semanas ou até que ocorra a alta.