UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Efeito do leite fermentado contendo *Lactobacillus casei*
Shirota na microbiota intestinal de crianças sob terapia
antimicrobiana

Jane Harumi Atobe

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Profa. Dra. Elsa M. Mamizuka

São Paulo
2003

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Efeito do leite fermentado contendo *Lactobacillus casei*
Shirota na microbiota intestinal de crianças sob terapia
antimicrobiana

Jane Harumi Atobe

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Profa. Dra. Elsa M. Mamizuka

São Paulo
2003

Jane Harumi Atobe

Efeito do leite fermentado contendo *Lactobacillus casei* Shirota
na microbiota intestinal de crianças sob terapia antimicrobiana

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Elsa M. Mamizuka
Orientador/presidente

Prof. Dr. Bruno Zilberstein
1º examinador

Prof. Dr. Manoel R. Schmal
2º examinador

Prof. Dr. Alfredo E. Gilio
3º examinador

Profa. Dra. Kioko Takei
4º examinador

São Paulo, 15 de agosto de 2003.

**Aos meus pais
Kenji Atobe e Shissako N. Atobe
cujo exemplo de dedicação e compreensão
foram a base de minha formação.**

**Aos meus irmãos,
Kazumi, Yukio e Suemi,
pelo constante apoio, incentivo e colaboração.**

**À Profa. Dra. Elsa M. Mamizuka
minha sincera gratidão e
reconhecimento pela orientação,
dedicação e competência profissional.**

AGRADECIMENTOS

Ao Diretor do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento da YAKULT S.A, Sr. Hiroyuki Minaguchi, e à Pesquisadora Sra. Yassumi O. Kimura, pela colaboração e apoio na realização deste trabalho.

Ao Pesquisador Dr. M. Morotomi, da YAKULT do Japão, pelo apoio científico e pela doação do anticorpo monoclonal anti - *L. casei* Shirota.

À Pesquisadora Sra. Júlia K. Mukai, do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento YAKULT S.A, pela inestimável colaboração, participação, apoio técnico, contribuição científica e valiosa amizade.

Ao pesquisador Sr. José Alfredo Streili, da YAKULT S.A, pelo apoio técnico no desenvolvimento da técnica de HPLC.

Aos colegas Haruki, Cristina, Rita, Ivone e Inês, do Laboratório de Pesquisa da YAKULT S.A, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Alfredo E. Gilio, à Dra. Selma L. B. Ragazzi, à Dra. Denise S. Lo, à Enf. Nanci, à Nutr. Silvana e a todos da equipe de Pediatria e da Creche do Hospital Universitário - USP, pela participação e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À Enf. Ruth e às Educadoras da Creche Primeiros Passos da Prefeitura de São Paulo, pela participação ativa e espírito de colaboração.

À Profa. Assoc. Dra. Arlete E. Cury, e à mestre Viviane Mazo, pela colaboração e assistência técnica na etapa inicial do estudo

À comissão julgadora do exame de qualificação, Prof. Dr. Alfredo E. Gilio e Profa. Dra. Susana M. I. Saad.

Aos colegas Nilton, Gabriela, Cristina, Marco, John, Diogo, Carol, Juliana e Carla, do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelo apoio colaboração e intercâmbio de conhecimentos.

Aos estagiários Sung, Beatriz, Márcia, Celso e Renata pelo apoio técnico e espírito de colaboração.

À Dorlei, Cláudia, Carmen, Rose, Dna. Maria e Marli pela colaboração.

À Bibliotecária Leila Bonadio pela revisão bibliográfica.

Aos colegas, Benê, Elaine e Jorge da Secretaria de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela paciência e colaboração.

À YAKULT S.A pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

1.	Introdução.....	1
1.1.	Ecologia da microbiota intestinal.....	1
1.2.	Distribuição da microbiota intrestinal.....	3
1.3.	Colonização do trato gastrointestinal.....	5
1.4.	Fatores que afetam a microbiota intestinal.....	7
1.5.	Funções da microbiota intestinal.....	10
1.5.1.	Papel dos ácidos graxos de cadeia curta - SCFA (<i>SHORT-CHAIN FATTY ACIDS</i>).....	13
1.6.	Probióticos.....	14
1.6.1.	Origem dos produtos lácteos.....	16
1.6.2.	Seleção de cepas de probióticos.....	17
1.6.3.	Mecanismos de ação dos probióticos.....	20
1.6.4.	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota.....	22
1.6.5.	Terapia de reposição bacteriana.....	24
2.	Objetivos.....	27
2.1.	Objetivo geral.....	27
2.2.	Objetivos específicos.....	27
3.	Materiais e métodos.....	28
3.1.	Casuística.....	28
3.2.	Crítérios para seleção das crianças.....	30
3.2.1.	Crianças sadias.....	30
3.2.2.	Crianças internadas.....	30
3.3.	Estudo da microbiota intestinal de crianças.....	31
3.3.1.	Crianças sadias.....	31
3.3.2.	Crianças internadas no Hospital Universitário.....	31
3.4.	Metodologia.....	33
3.4.1.	Administração do leite fermentado aos pacientes.....	33

3.4.2.	Coleta das amostras.....	33
3.4.3.	Intervalo entre as coletas e número de amostras.....	34
3.5.	Análise das amostras.....	35
3.5.1.	Análise microbiológica.....	36
3.5.1.1.	Identificação bioquímica.....	36
3.5.1.2.	Identificação de <i>L. casei</i> Shirota por <i>Enzyme Linked Immunosorbent assay</i> (ELISA).....	38
3.6.	Análise dos ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) por cromatografia líquida de alta precisão (HPLC).	40
3.7.	Análise dos resultados.....	40
3.7.1.	Avaliação dos parâmetros microbiológicos.....	40
3.7.2.	Avaliação dos parâmetros fisiológicos....	41
3.7.3.	Análise estatística.....	41
4.	Resultados.....	42
4.1.	Análise dos resultados da microbiota fecal das crianças saudáveis.....	42
4.2.	Análise dos resultados das crianças internadas.....	43
4.2.1.	Crianças excluídas do estudo.....	43
4.2.2.	Crianças incluídas no estudo.....	44
4.2.2.1.	Análise da microbiota fecal de crianças internadas e sob tratamento antibiótico pela contagem média do número de microrganismos estudados...	44
4.2.2.2.	Análise da variação média.....	49
4.3.	Comparação entre a microbiota fecal de crianças saudáveis e crianças doentes antes da ingestão do leite fermentado.....	52
4.4.	Análise dos resultados dos ácidos graxos de cadeia curta por cromatografia de alta precisão.....	53

4.5.	Avaliação clínica.....	55
5.	Discussão	56
6.	Conclusões	72
7.	Resumo	74
8.	Abstract	75
9.	Referências Bibliográficas	76
10.	Anexos	96
	Anexo I.....	96
	Anexo II.....	100
	Anexo III.....	101
	Anexo IV.....	102
	Anexo V.....	103
	Anexo VI.....	104
	Anexo VII.....	109

1. INTRODUÇÃO

1.1. ECOLOGIA DA MICROBIOTA INTESTINAL

A microbiota intestinal é a porção mais íntima do ambiente biológico do ser humano e está relacionada à mediação de muitas interações com o ambiente químico. Representa um ecossistema de alta complexidade e o entendimento deste sistema e suas interações ainda é limitado. Esta complexidade da população microbiana pode ser considerada como um ecossistema que compreende um grupo de populações microbianas, coexistindo em equilíbrio em uma região definida no espaço (DUCLUZEAU, 1989).

A microbiota intestinal é compreendida de vários microrganismos que vivem simbioticamente nos tratos digestivos do ser humano e dos animais. Este complexo ecossistema inclui microrganismos aeróbios, anaeróbios e facultativos que habitam cada porção do trato digestivo, mantendo equilíbrio entre si, através de antagonismo entre outros microrganismos e da atividade protetora do próprio hospedeiro que os abriga (BENGMARK, 1998).

Estudos sobre a microbiota intestinal mostram que este ecossistema é composto por duas classes de microrganismos: a da microbiota residente ou endógena, que vive aderida às membranas mucosas do trato digestivo por um período prolongado, e a transitória ou exógena, que atravessa o trato gastrointestinal. Existe uma cooperação sinérgica entre os microrganismos residentes e o hospedeiro, formando uma barreira funcional, denominada de resistência à colonização, que protege o intestino da colonização por microrganismos exógenos e de seus efeitos patogênicos (SIMON & GORBACH, 1984).

Assim, a resistência à colonização é a capacidade que a microbiota normal da mucosa intestinal tem de se proteger contra a fixação de patógenos. O fenômeno está relacionado a uma complexa interação entre

várias bactérias que compreendem a microbiota da mucosa intestinal (ELMER *et al.*, 1996).

Este termo, resistência à colonização, foi introduzido por VAN DER WAAJ *et al.* (1971) para indicar a resistência contra a fixação de microrganismos exógenos potencialmente patogênicos.

A microbiota intestinal inclui cepas com ação protetora ao hospedeiro, independente da presença de certos microrganismos promotores de ação benéfica, como *Lactobacillus* sp e *Bifidobacterium* sp, e um grande número de microrganismos que pode incluir cepas patogênicas. Assim sendo, se o equilíbrio entre os microrganismos da microbiota intestinal é rompido, alguns microrganismos poderão causar moléstias ou distúrbios, do contrário estas cepas consideradas nocivas não causariam patologias (ELMER *et al.*, 1996).

O estudo da microbiota intestinal do ser humano data de 1681, quando foram realizadas as primeiras observações das bactérias e protozoários fecais por Leeuwenhoek. O interesse pelo estudo tem aumentado muito nos últimos anos, graças às técnicas desenvolvidas que permitem o estudo das bactérias dominantes da microbiota humana (MITSUOKA, 1997a).

A análise da microbiota fecal, geralmente, é o reflexo da composição da sua microbiota intestinal, desde que tenham sido empregadas técnicas adequadas para o isolamento dos microrganismos. Sabe-se que a microbiota fecal representa somente os microrganismos do lúmen da região reto-sigmóide, e que difere da região íleo-cecal da microbiota da superfície da mucosa das criptas e das vilosidades, havendo assim diferenças nas populações de microrganismos das regiões superior e inferior do intestino (HILL & DRASAR, 1975).

Estima-se que no intestino de um indivíduo adulto saudável existam de 300 a 400 espécies diferentes de microrganismos que pertencem a mais de 190 gêneros diversos. Porém, uma proporção significativa da microbiota intestinal ainda não é cultivável pelas técnicas existentes (HOLZAPFEL *et al.*, 1998). Estudos mostram que a contagem de microrganismos viáveis em

amostras fecais de um indivíduo normal varia de 2 a 4 x 10¹¹ microrganismos/grama de peso seco (BROWN, 1977).

Os anaeróbios não esporulados são os microrganismos predominantes na microbiota fecal humana, perfazendo uma contagem acima de 99% do total de microrganismos (PEACH *et al.*, 1974).

As espécies anaeróbias são as mais freqüentemente encontradas, cuja proporção na microbiota fecal constituem-se de bacilos Gram-negativos, como *Bacteroides fragilis* (12,1%) e *Fusobacterium prausnitzii* (7,15%), e Gram-positivos como *Bifidobacterium adolescentis* (6,45%), *Eubacterium aerofaciens* (6,02%) e *Peptostreptococcus productus* I e II (5,58%). Os gêneros dominantes são *Eubacterium* (25,5%), com 26 espécies, *Bacteroides* (22,6%), 20 espécies, *Bifidobacterium* (11,5%), 8 espécies, *Peptostreptococcus productus* I e II (8,9%), *Fusobacterium* (7,7%), 5 espécies, *Ruminococcus* (4,5%), 11 espécies; e *Lactobacillus* (2,4%), 7 espécies. Microrganismos pertencentes a outros gêneros compreendem uma pequena parte da microbiota, como *Streptococcus* (1,56%), *Clostridium* (0,6%) e Enterobacteriaceae (0,5%) (BROWN, 1977; PEACH *et al.*, 1974).

Embora menos que 1% da microbiota intestinal normal seja constituída de bactérias aeróbias, a maioria das infecções endógenas é causada por este grupo (VOLLARD & CLASENER, 1994).

1.2. DISTRIBUIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL

A distribuição da microbiota intestinal em um hospedeiro difere em cada região do trato gastrointestinal (Figura 1). Há vários microrganismos que habitam a boca, dentre os quais: *Bacteroides*, Enterobacteriaceae, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, entre outros.

A cavidade oral apresenta pH mais ou menos neutro; já no estômago o pH diminui, variando de 2,5 a 3,5, sendo a população média de 10³ microrganismos/grama, constituída, predominantemente, por microrganismos Gram-positivos como *Streptococcus* sp, *Lactobacillus* sp e

leveduras. O duodeno também representa um ambiente hostil, contendo baixo número de microrganismos transitórios (HOLZAPFEL *et al.*, 1998).

Figura 1. Distribuição e taxa de freqüência de microrganismos da microbiota intestinal humana

Legenda: Coluna à esquerda representa a distribuição dos microrganismos nos diferentes sítios do trato gastrointestinal e a coluna da direita representa a freqüência de bactérias da microbiota intestinal

Fonte: Mitsuoka & Hayawakawa, 1972

A sobrevivência da bactéria no estômago depende do pH do meio. As amostras gástricas apresentam pH abaixo de 3,0 e geralmente contêm poucas bactérias viáveis. O alimento e a saliva tendem a neutralizar a acidez gástrica, permitindo que as bactérias passem viáveis para o intestino delgado. Estas bactérias que constituem a microbiota transitória são

removidas pelo peristaltismo, secreções intestinais e outros fatores. Uma parada na válvula íleo-cecal permite que haja concentração de bactérias no intestino delgado, o que explica a riqueza da microbiota encontrada nesta região. Muitos microrganismos encontrados no intestino são encontrados também na região íleo terminal, embora em pequeno número, e devem ter origem no intestino grosso (BROWN, 1977).

Em indivíduos normais, a microbiota do intestino delgado é relativamente simples e encontra-se um grande número de microrganismos. A contagem total pode alcançar até 10^{10} microrganismos/g. No jejuno e íleo são encontrados, principalmente, *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* e *Fusobacterium*. No ceco a composição aumenta repentinamente e passa a ser similar à encontrada nas fezes, sendo que a concentração pode alcançar 10^{11} microrganismos/grama (MITSUOKA, 1982).

1.3. COLONIZAÇÃO DO TRATO GASTRINTESTINAL

A colonização bacteriana do trato gastrointestinal do recém-nascido começa durante o parto. O feto encontra-se em ambiente estéril até o nascimento. No entanto, o estabelecimento da microbiota é um processo lento e gradual que se faz em vários anos. O recém-nascido é contaminado com microrganismos da mãe e do ambiente.

A microbiota materna é fonte natural de bactérias que colonizam o recém-nascido (BETTELHEIM & LENNOX-KING, 1976). Porém, as práticas obstétricas diminuíram, consideravelmente, a transferência de bactérias da mãe ao recém-nascido durante o parto, o que causa uma demora no estabelecimento de bactérias no intestino, especialmente de anaeróbios. Em compensação, as bactérias são adquiridas a partir do meio ambiente. A rigorosa higiene pode retardar o estabelecimento da microbiota. No início, predominam *Escherichia coli* e outras *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* e *Staphylococcus*, pois as bactérias anaeróbias não podem se desenvolver.

À medida que as bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas consomem o oxigênio, o meio torna-se mais adequado às bactérias anaeróbias, como *Bifidobacterium*, *Bacteroides* e *Clostridium*. Quando os anaeróbios aumentam, as bactérias facultativas diminuem, possivelmente pela falta de oxigênio. Contudo, durante os primeiros meses ou anos de vida pode persistir um número relativamente elevado de bactérias facultativas (BETTELHEIM & LENNOX-KING, 1976; HOLZAPFEL *et al.*, 1998).

Sabe-se que as espécies de microrganismos que compõem a microbiota intestinal diferem entre crianças amamentadas com o leite materno, das amamentadas artificialmente e das que são amamentadas com ambos os tipos de leite, alternadamente. *Bifidobacterium bifidum* é predominante em crianças amamentadas com leite materno enquanto que *E. coli* é notadamente predominante em crianças amamentadas artificialmente. Este fenômeno é considerado como explicativo do fato de crianças amamentadas artificialmente serem mais suscetíveis a doenças do aparelho digestivo, como a diarreia (YUHARA *et al.*, 1983).

A microbiota de crianças assemelha-se à de adultos, quando a contagem média de *Bacteroides* sp, *Eubacterium* sp e *Peptococcus* sp é maior que a de *Bifidobacterium* sp, e quando a contagem média de *E. coli* e *Streptococcus* sp diminui para menos que 10^8 microrganismos/g de fezes (MITSUOKA, 1997b).

Em idosos o número de *Bifidobacterium* sp freqüentemente diminui e o número de *Lactobacillus* sp e de *Clostridium perfringens* aumenta (MITSUOKA, 1982).

Mudanças na composição e funcionamento da microbiota podem ocorrer com a idade (Figura 2). De acordo com MITSUOKA e HAYAWAKAWA (1972), a diminuição na contagem média de *Bifidobacterium* sp e o aumento de *Clostridium* sp, de *Lactobacillus* sp, de *Streptococcus* sp e de Enterobacteriaceae parecem estar associados com a idade.

Em um estudo de KVASNIKRAV e colaboradores (1984) em uma população idosa em Abkhasia, na Rússia, mostrou que pessoas com idade superior a 90 anos apresentavam contagem alta de *Lactobacillus* sp e

Bifidobacterium sp ($>10^8$). Nos idosos ocorre a hipoclorídria, redução na produção de ácido gástrico; esta condição pode levar a um aumento da população de bactérias no estômago e no intestino delgado (PEDROSA *et al.*, 1995).

Figura 2. Influência da idade sobre a flora intestinal

Fonte: Mitsuoka, 1997b

1.4. FATORES QUE AFETAM A MICROBIOTA INTESTINAL

Uma variedade de fatores relacionados ao hospedeiro, ao microrganismo e ao ambiente colaboram para a manutenção da composição e das propriedades funcionais da microbiota intestinal. O desequilíbrio de alguns desses elementos pode levar ao aumento no crescimento de certas bactérias, promovendo distúrbios na saúde do hospedeiro.

Vários fatores do trato gastrointestinal são amplamente influenciados por condições como potencial redox (Eh), pressão parcial do oxigênio (PO₂), pH e outras condições que variam de acordo com cada região do trato gastrointestinal. Os fatores assim influenciados dão origem a mudanças na distribuição da microbiota intestinal ou determinam áreas onde cada grupo

de microrganismo deverá habitar. Tanto os microrganismos anaeróbios como os aeróbios vivem em proporção substancialmente igual na boca, onde a pressão parcial de oxigênio apresenta valor mais alto (150 mmHg) (HOLZAPFEL *et al.*, 1998).

Algumas poucas espécies de microrganismos, em pequena quantidade, são encontradas no estômago, duodeno e jejuno, locais onde os vários sucos digestivos são secretados. Porém, o íleo e o intestino grosso, onde o potencial redox diminui e o pH é neutro, albergam uma microbiota residente extremamente rica, tendo como microrganismos representativos os anaeróbios (*Bacteroides*). Nas fezes constata-se uma quantidade relativamente pequena de microrganismos Gram-positivos, tais como *Lactobacillus*, em oposição à quantidade elevada de Gram-negativos, como os bacilos coliformes (SAVAGE, 1977).

A natureza da microbiota intestinal muda também de acordo com as dietas. Para Holzapfel e colaboradores (1998), os principais fatores que influenciam a sua composição estão resumidos na Tabela 1.

Estes fatores devem estar relacionados às mudanças nas condições fisiológicas do hospedeiro (idade, estado de saúde, estresse, ambiente), composição da dieta e circunstâncias ambientais (contaminação com patógenos, uso de medicamentos). Desta maneira, as condições como pH, disponibilidade de substrato, potencial redox, tempo de trânsito alimentar, fluxo de fluido entérico, secreção de IgA e outras, podem ser moduladas. Isto poderia resultar na diminuição de bactérias da microbiota e aumentar o número de bactérias potencialmente patogênicas. Mudanças na dieta, clima, idade, medicação, doença ou infecção, geralmente, levam ao aumento de bactérias anaeróbias e *E. coli* no intestino delgado, além do aumento de enterobactérias e *Streptococcus* sp com a concomitante diminuição de *Bifidobacterium* sp (MITSUOKA, 1982). Interações implícitas típicas de algumas bactérias intestinais podem também contribuir para a estabilização ou desequilíbrio, pela produção de H₂O₂, ácidos e bacteriocinas (NAIDU *et al.*, 1999).

Tabela 1. Fatores que afetam a microbiota do trato gastrointestinal

FATORES MEDIADOS PELO HOSPEDEIRO	pH, secreções (imunoglobulinas, bile, sais, enzimas) Motilidade (velocidade, peristaltismo) Fisiologia (compartimentalização) Células esfoliadas e mucinas
FATORES MICROBIANOS	Adesão Motilidade Flexibilidade nutricional Esporos, cápsulas, enzimas, componentes antimicrobianos Tempo de geração
INTERAÇÕES MICROBIANAS	Sinergismo <ul style="list-style-type: none"> • Cooperação metabólica • Fatores de crescimento e excreção de vitaminas • Mudanças de E_h, pH e tensão de oxigênio Antagonismo/Estimulação <ul style="list-style-type: none"> • Ácidos graxos de cadeia curta, aminas • Mudanças de E_h, pH e tensão de oxigênio • Componentes antimicrobianos, sideróforos
DIETA	Composição, fibras não digeríveis, drogas

Alterações da microbiota fecal em adultos pela modificação de suas dietas são extremamente difíceis de serem demonstradas. Diferença entre a microbiota fecal de pessoas que fizeram dieta com pouca gordura ou dieta rica em fibras também não apresentaram efeitos detectáveis, nem estudo abrangendo os períodos de 4 a 12 semanas (HILL & DRASAR, 1975).

Em uma dieta ocidental comum, na qual há ingestão principalmente de carne, a maioria das bactérias é constituída de anaeróbios obrigatórios não-esporulados. Esses anaeróbios podem exceder o número de bactérias aeróbias e facultativas em uma proporção de 5000:1, na qual uma fração de 5 a 20% destas bactérias anaeróbias é extremamente sensível ao oxigênio molecular. A principal causa da variação na recuperação desses anaeróbios de amostras fecais provavelmente é devida a sua exposição ao oxigênio (BROWN, 1977).

1.5. FUNÇÕES DA MICROBIOTA INTESTINAL

Quando se discute as funções da microbiota intestinal, é muito importante entender as atividades dos microrganismos, bem como, da sua composição (gênero, espécie, cepas) e o número de microrganismos envolvidos, já que a atividade das bactérias intestinais afeta o trato gastrointestinal e a sua fisiologia (ROBERFROID *et al.*, 1995).

O intestino alberga uma grande quantidade de bactérias que são metabolicamente ativas. Estas bactérias interagem com outras em sinergismo e sua atividade pode ter efeitos tanto benéficos quanto nocivos ao hospedeiro.

A diversidade de bactérias permite essencialmente a quebra de todos os substratos que entram no intestino. A degradação de substratos não digeridos pela microbiota, particularmente de carboidratos da dieta, como fibras, amido, açúcares não absorvidos (GIBSON & ROBERFROID, 1995), e substâncias endógenas como o muco, pode levar a produção de gases (H₂, CO₂, CH₄), de ácidos graxos de cadeia curta (RUMNEY & ROWLAND, 1992), de ácido lático, de ácidos graxos de cadeia ramificada, de etanol e de amônia (ROBERFROID *et al.*, 1995).

Sabe-se que a microbiota intestinal sintetiza vitaminas e proteínas, e que algumas delas são utilizadas pelo hospedeiro. Entre as quais estão as vitaminas B₁, B₂, B₆, B₁₂, K, o ácido nicotínico, o ácido pantotênico, a biotina

e o ácido fólico. Os compostos que contêm nitrogênio, como as proteínas e os aminoácidos, são metabolizados pelos microrganismos intestinais, sendo convertidos em compostos como amônia, aminas, sulfito de hidrogênio, fenóis e compostos esteróides, que são nocivos ao organismo (MITSUOKA, 1997b).

Além desses produtos, são também elaboradas substâncias bacterianas tóxicas, como amônia, que é um produto da degradação das proteínas, e os aminoácidos da diaminação das bactérias intestinais, sendo absorvidas e imediatamente desintoxicadas pelo fígado, e então excretadas como uréia. A descarboxilação de aminoácidos no intestino também leva à produção de cadaverina, agmatina, putrecina, γ -aminoacetato, histamina, triptamina e serotonina. Estas substâncias apresentam atividades fisiológicas e farmacológicas que exercem efeitos sobre o organismo. A histamina, além de diminuir a pressão sangüínea, também atua como vasodilatador e participa da migração de leucócitos durante a resposta inflamatória. A cadaverina e a putrecina, que são substâncias de putrefação, agem aumentando a pressão sangüínea (MITSUOKA, 1997b).

O metabolismo bacteriano tem importância significativa na fermentação de carboidratos pelas bactérias anaeróbias e também na produção de ácidos graxos de cadeia curta. A fermentação é descrita como reações que envolvem processos metabólicos anaeróbios, tendo os ácidos graxos de cadeia curta como os principais produtos finais. A fermentação de carboidratos pelos microrganismos anaeróbios intestinais consiste de uma série de reações, na qual o oxigênio molecular serve como receptor final de elétrons. Nestes processos o receptor de elétron orgânico é o produto do substrato que está sendo oxidado, e a diferença no potencial redox entre o substrato e os seus produtos determina a quantidade de ATP que pode ser formada. Com exceção de *Bifidobacterium* sp, a maioria dos microrganismos anaeróbios assacarolíticos do intestino utiliza a via Embden-Meyerhof-Parnas para fermentar os carboidratos (MACFARLANE & GIBSON, 1995).

Uma vez que as diferentes bactérias da microbiota produzem diferentes produtos de fermentação, o número relativo de espécies e

substratos afeta na quantidade e no tipo de produto formado, e a quantidade de substrato disponível para fermentação influencia na via utilizada, conforme mostra a Figura 3.

Figura 3. Metabolismo de carboidratos e principais produtos de fermentação formados por grupos de bactérias anaeróbias

Legenda: NCP: Polissacarídeos não celulose; PEP: fosfoenolpiruvato; CoA: Coenzima A; P: Fosfato

Quando a bactéria intestinal se desenvolve em meio no qual a concentração de carbono é limitada, os principais produtos finais de metabolismo formados são o formato e o acetato, enquanto que quando o carboidrato está em excesso, são formados predominantemente lactato e acetato. Estas observações são justificadas pelo fato da bactéria utilizar o lactato como doador de elétrons para diminuir o poder de redução quando o fornecimento do substrato é abundante e, enquanto o substrato está limitado, o metabolismo está direcionado para a geração de energia (MACFARLANE & GIBSON, 1995).

1.5.1. PAPEL DOS ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA - SCFA (*SHORT-CHAIN FATTY ACIDS*)

Originalmente, os ácidos orgânicos do trato digestivo, gerados a partir da fermentação bacteriana, eram denominados de ácidos graxos voláteis. O termo volátil era utilizado por serem medidos pela destilação a vapor. Atualmente, este tipo de destilação tem sido substituída pela cromatografia gasosa-líquida. Esta terminologia vem sendo substituída por ácidos graxos de cadeia curta ou *short-chain fatty acids* (SCFA). O termo ácidos graxos é erroneamente usado por serem bioquimicamente semelhantes aos carboidratos, sendo miscíveis em água, ao contrário das gorduras. O termo mais preciso para descrevê-los seria ácidos monocarboxílicos alquil saturados e não ramificados de 2 a 4 átomos de carbono (WRONG, 1995).

Em termos práticos, a terminologia SCFA é aplicada para os ácidos acético, propiônico e butírico, os três ácidos mais abundantes no trato digestivo.

Os SCFAs representam o principal constituinte orgânico do intestino grosso. Apresentam vários efeitos na fisiologia intestinal, como o de ser fonte de energia para os enterócitos (ROEDIGER, 1982) e estimular e proliferar enterócitos (KRIPKE *et al.*, 1989). Entre os mais importantes, está o ácido láctico, que fornece até 70% da energia necessária para as células intestinais e que tem sido utilizado como agente terapêutico para várias doenças intestinais, como doença inflamatória intestinal, colite ulcerativa e doença de Crohn; além disso, estes ácidos orgânicos têm mostrado aparente efeito benéfico para o sistema imune (ANDOH *et al.*, 1999) e trato gastrointestinal (ARAKI *et al.*, 2002).

Acetato, propionato e butirato são os principais produtos finais do metabolismo bacteriano de carboidratos no intestino (CUMMINGS, *et al.*, 1987; MORTENSEN & CLAUSEN, 1996). Além disso, uma pequena quantidade de SCFA ramificada, como isobutirato, isovalerato e 2-metil-butirato, é produzida a partir de alguns aminoácidos (MACFARLANE & CUMMINGS, 1991).

O acetato promove o relaxamento da artéria porta-hepática mantendo o fluxo de sangue do fígado e do intestino (MORTENSEN & NIELSEN, 1995), e também aumenta o efeito estimulante do propionato e butirato na absorção de magnésio e outros cátions no intestino (SCHARRER & LUTZ, 1990). Acredita-se que este estímulo auxilia na absorção de fluidos e previne a diarreia.

O propionato tem a capacidade de aumentar a contração muscular intestinal (YAJIMA, 1985), ação que promove o efeito laxante e o alívio da constipação. Além disso, parece estimular a proliferação do epitélio intestinal, podendo aumentar a capacidade de absorção do intestino. Outro efeito possível do propionato é a redução da concentração de colesterol plasmático (SAKATA, 1995).

O butirato parece ser um dos ácidos graxos que mais contribui para a integridade do intestino. Parece ser também o combustível para os enterócitos, contribuindo diretamente na produção de energia (CHEN *et al.*, 1984). O fornecimento de butirato parece auxiliar na manutenção da integridade da mucosa, bem como levar à diminuição dos processos ulcerativos (ILLMAN *et al.*, 1988). Além disso, parece ter importante papel na manutenção de uma célula normal e na redução do risco de carcinoma intestinal (ROEDIGER, 1995).

1.6. PROBIÓTICOS

O interesse pelo uso de microrganismos vivos com propósito de manutenção da saúde, além da prevenção ou auxílio no tratamento de doenças, aumentou nos últimos anos (FULLER, 1997). Muitos desses microrganismos, sob o nome genérico de probióticos (bactérias e leveduras), estão sendo propostos como suplemento alimentar porque podem afetar benéficamente o hospedeiro e atuar no equilíbrio da microbiota intestinal (ROBERFROID, 2000).

A palavra probiótico é de origem grega e significa **para a vida**. Este termo foi originalmente proposto por LILLY e STILLWELL (1965) como o antônimo para o termo antibiótico. Baseia-se na capacidade que certos microrganismos apresentam em produzir substâncias capazes de promover ou não o crescimento de outros microrganismos. LILLY e STILLWELL (1965) estudaram a substância termoestável produzida pelo protozoário ciliado *Colpidium campylum* que favorecia o crescimento de *Tetrahymena pyriformis*. Este efeito estimulador ou inibidor do crescimento de alguns microrganismos já havia sido observado também em bactérias.

O conceito não é novo. Em 1900, ELIE METCHNIKOFF, acreditava que as toxinas produzidas pelas bactérias putrefativas do intestino eram a principal causa do envelhecimento precoce e morte do homem propondo, na ocasião, a hipótese da juventude eterna e longevidade baseada no soro do leite. Acreditava, ainda, que o consumo de microrganismos vivos em produtos lácteos fermentados poderia ser em parte uma explicação para a longevidade dos camponeses da Bulgária (SAAVEDRA, 1999). No entanto, após sua morte (1916) ficou evidente que as bactérias presentes no leite fermentado não colonizavam a microbiota intestinal em função deste entendimento as pesquisas não progrediram por muitos anos (MITSUOKA, 1997).

Em 1974, PARKER definiu probiótico como organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal.

Anos depois, FULLER (1989) ampliou a definição de probiótico para suplemento alimentar contendo microrganismos vivos que afetam o hospedeiro, melhorando o equilíbrio da microbiota intestinal.

Os probióticos são definidos como microrganismos viáveis do suplemento da dieta que afetam benéficamente o hospedeiro através de seus efeitos no trato intestinal. Esta definição, no entanto, foi inicialmente utilizada para rações animais e depois para humanos (SALMINEN *et al.*, 1998).

Atualmente, a definição mais aceita é a de NAIDU *et al.* (1999), que definiram probióticos como dieta microbiana adjuvante que afeta

beneficamente a fisiologia do hospedeiro pela modulação da mucosa e da imunidade sistêmica, bem como o equilíbrio da microbiota do trato intestinal e a conseqüente melhoria do balanço nutricional.

1.6.1. ORIGEM DOS PRODUTOS LÁCTEOS

A origem dos produtos lácteos fermentados data do surgimento da civilização e são mencionados na Bíblia e nos livros sagrados do Hinduísmo. Provavelmente o ambiente e as condições climáticas favoráveis tiveram importância no desenvolvimento de muitos produtos fermentados tradicionais conhecidos. Estes produtos, muitos dos quais são largamente consumidos, foram usados terapeuticamente antes do reconhecimento dos microrganismos (SHORTT, 1999).

Em 1906, COHENDY administrou leite fermentado com *L. bulgaricus*, até então denominado de bacilo bulgárico, em voluntários que exibiam produtos de fermentação do tipo putrefativo. O autor observou que havia uma diminuição de tais metabólitos putrefativos e com isso havia o estabelecimento de bacilos Gram-positivos, que persistiam por 8 a 12 dias após o início da ingestão.

Em 1907, METCHNIKOFF postulou que as bactérias, *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, envolvidas na fermentação do iogurte, suprimiam a fermentação do tipo putrefativa da microbiota intestinal e que o consumo destes iogurtes tinha importante papel na manutenção da saúde.

A descoberta de *Bifidobacterium* da microbiota intestinal de crianças em fase de amamentação por TISSIER (1906) também teve importante papel na introdução do conceito de que esta bactéria tinha papel na manutenção da saúde.

O relato dos benefícios clínicos da terapia bacteriana sobre a modulação da microbiota de crianças com infecção intestinal fez com que muitos céticos da época questionassem, sobre esta terapia, o fato da bactéria do iogurte ser capaz de sobreviver ao trânsito intestinal, colonizar e expressar os benefícios (SHORTT, 1999).

GORDON *et al.* (1957) afirmaram que o sucesso da terapia bacteriana dependia de certos critérios, como o de ser essencial o uso de organismos habitantes da microbiota intestinal, como *L. acidophilus*, e que este deveria ser não-patogênico, capaz de estabelecer-se na microbiota intestinal, sendo necessário um grande número de células viáveis (10^7 - 10^9) para que houvesse um rápido estabelecimento no trato gastrointestinal.

Porém, não são conhecidos probióticos capazes de se instalar no ecossistema digestivo, mesmo após um longo período de ingestão, já que a microbiota local, perturbada ou não, impede essa colonização. Contudo, diversos probióticos, como *L. acidophilus*, *L. casei*, *Saccharomyces boulardii* e *Bifidobacterium*, sobrevivem ao trânsito intestinal. Mas a sobrevivência não é o único fator importante para a atuação de um probiótico. Os níveis populacionais do probiótico devem ser suficientemente elevados para ter impacto no local onde se espera que se desenvolva a sua função. Em ecologia microbiana, considera-se que um microrganismo influi no ecossistema onde se encontra, somente quando sua população é igual ou superior a 10^7 UFC/g ou UFC/mL do conteúdo intestinal (DUCLUZEAU & RAIBAUD, 1979).

Na década de 50 os iogurtes eram freqüentemente usados para restabelecer o equilíbrio da microbiota intestinal modificada pelo uso de antibióticos e para aliviar ou prevenir alguns sintomas como diarreia, constipação, dispepsia, cistite, colite ulcerativa crônica e dermatite. Assim, a partir daquele período, quando a classificação das bactérias e as metodologias microbiológicas ainda eram deficientes, aliadas à limitação do conhecimento da microbiota intestinal, é que foram determinados os critérios para os probióticos, comumente aceitos até hoje (SHORTT, 1999).

1.6.2. SELEÇÃO DE CEPAS DE PROBIÓTICOS

A seleção das cepas de probióticos tem sido em grande parte histórica, baseada em vários anos de uso de cepas que não apresentaram efeitos

colaterais (SALMINEN *et al.*, 1998a). Outros critérios para uso de cepas apropriadas incluem a capacidade de (1) exercer efeito benéfico no hospedeiro, (2) sobreviver ao trânsito intestinal, (3) aderir ao epitélio intestinal, (4) produzir substâncias antimicrobianas para os patógenos, (5) estabilizar a microbiota intestinal (KAILASAPATHY & CHIN, 2000; KOPP-HOOLIHAN, 2001).

Na prática, os probióticos devem também ter longa vida-de-prateleira, conter um grande número de células viáveis no consumo e não devem ser patogênicos ou tóxicos. Geralmente, os probióticos adicionados em alimentos apresentam pelo menos alguns destes critérios. Alguns dos probióticos comercialmente disponíveis encontrados em alimentos ou concentrados sob a forma de suplemento são: *Lactobacillus* sp, *Bifidobacterium* sp, *Lactococcus* sp, *Leuconostoc* sp, *Streptococcus* sp, *Enterococcus* sp, *Pediococcus* sp, *Weissella* sp, *Carnobacterium* sp, *Tetragenococcus* sp e *Saccharomyces* sp (Kopp-Hoolihan, 2001; Mattila-Sandholm, 1999; Salminen *et al.*, 1998a). *Saccharomyces boulardii* é uma levedura não patogênica encontrada em uma fruta chinesa. Os membros dos gêneros *Lactobacillus* e *Lactococcus* são conhecidos como *generally-recognised-as-safe* (GRAS), geralmente reconhecidos como seguros, enquanto que os gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus* podem conter alguns patógenos oportunistas (SALMINEN *et al.*, 1998b).

As bactérias ácido lácticas compreendem vários gêneros que incluem um considerável número de espécies. Geralmente são bacilos Gram-positivos, catalase negativos, que crescem sob condições de microaerofilia a anaerobiose estrita, não são esporulados e fermentam carboidratos, tendo como principal produto final o ácido láctico (STILES & HOLZAPFEL, 1997). Apresentam baixo conteúdo de guanina + citosina (G+C <50%) (SCHLEIFER & LUDWIG, 1995).

A energia fornecida para as bactérias lácticas depende mais da fosforilação do substrato do que da fosforilação oxidativa com o sistema de transporte de elétrons. Assim, são incapazes de sintetizar as proteínas heme, como a citocromo, que está envolvida na cadeia respiratória e,

portanto, não pode utilizar moléculas de oxigênio diretamente para o metabolismo de energia. Entretanto, algumas espécies são resistentes à toxicidade do oxigênio pela ativação de mecanismos de defesa ou por adaptação das enzimas envolvidas no metabolismo de energia em um ambiente aeróbio.

O gênero *Lactobacillus* está dividido em três grandes grupos: Grupo *L. acidophilus*, Grupo *L. casei* e Grupo *L. reuteri/fermentum* (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação do gênero *Lactobacillus*

GRUPO	ESPÉCIES
L. acidophilus	<i>L. acidophilus sensu stricto</i> ^{*a} <i>L. crispatus</i> [*] <i>L. amylovorus</i> <i>L. gallinarum</i> <i>L. gasseri</i> [*] <i>L. johnsonii</i> [*]
L. casei	L. zeae <i>L. casei</i> [*] <i>L. rhamnosus</i> ^{*b} <i>L. paracasei</i> ^{*c}
L. reuteri/fermentum	<i>L. reuteri</i> ^{*d} <i>L. fermentum</i> [*]

* cepas utilizadas como probióticos para o ser humano ou animais

a: descrita por Moro (1900) como *Bacillus acidophilus* e renomeada por Hansen e Moquot (1970)

b: anteriormente era considerada como uma subespécie de *L. casei*

c: a nomenclatura *L. paracasei* deverá ser rejeitada e incluída como *L. casei*

d: produz uma bacteriocina de interesse em nutrição animal, preparações farmacêuticas e iogurtes

1.6.3. MECANISMOS DE AÇÃO DOS PROBIÓTICOS

O processo pelo qual a bactéria inibe a colonização por outras cepas é denominado de resistência à colonização (ROLFE, 2000). A perturbação da microbiota por antimicrobianos e outros agentes pode diminuir essa resistência à colonização (LEVY, 2000). O objetivo da terapia probiótica é recuperar a resistência à colonização antes do restabelecimento da microbiota normal que havia sido, de alguma forma, destruída (ELMER, 2001).

Vários mecanismos de proteção do trato gastrointestinal do hospedeiro foram propostos como função dos probióticos. Assim, alguns podem inibir diferentes patógenos por diferentes mecanismos (ROLFE, 2000). Os seus efeitos protetores contra infecções intestinais foram demonstrados em modelos animais (MARTEAU *et al.*, 2001).

Os probióticos podem antagonizar patógenos diretamente pela produção de compostos antimicrobianos, assim como as citocinas e ácido butírico, reduzindo o pH por meio de estimulação do ácido láctico produzido pela microbiota. Podem, ainda, exercer atividade de competição por sítios de ligação aos receptores que os patógenos ocupam pela disponibilidade de nutrientes e outros fatores de crescimento, ou pela produção da lactase, enzima que digere a lactose.

Outros mecanismos de ação propostos são a melhora da função imune pela estimulação imunomodulatória das células e competição com patógenos (KOPP-HOOLIHAN, 2001); a inibição competitiva por sítios de adesão na superfície do epitélio intestinal (GOLDIN *et al.*, 1992; KOPP-HOOLIHAN, 2001; ROLFE, 2000); e a degradação da toxina receptora na mucosa intestinal que protege o hospedeiro da infecção por *C. difficile* (CASTAGLIUOLO *et al.*, 1999).

Evidências sugerem que a estimulação da imunidade específica e não específica pode ser outro mecanismo pelo qual os probióticos podem proteger o hospedeiro contra infecções intestinais (KAILA *et al.*, 1992; MALIA *et al.*, 1996).

Ainda não se sabe se é necessária a adesão dos microrganismos probióticos para se ter efeito benéfico à saúde (MATTILA-SANDHOLM, 1999). Porém, alguns pesquisadores acreditam que a adesão é necessária e que esta propriedade é dependente da concentração de bactérias, do pH, do tempo de trânsito intestinal e de fatores nutricionais. Outros pesquisadores acreditam que os probióticos exercem seus efeitos somente pela fraca afinidade pela camada mucosa, o que não requer sítios específicos para adesão. Os microrganismos podem exercer efeitos sem aderir à mucosa se consumidos regularmente, como no caso das bactérias do iogurte que ajudam na digestão da lactose (KOPP-HOOLIHAN, 2001).

Vários estudos mostram que as bactérias probióticas podem preservar a integridade da mucosa do intestino e diminuir os efeitos de um grande número de doenças intestinais, como a diarreia associada aos antibióticos (GOTZ *et al.*, 1979; ORRHAGE *et al.*, 1994; POUCHAPIN, 2000; SIITONEN *et al.*, 1990; THOMAS *et al.*, 2000), doenças inflamatórias dos intestinos (SHULTZ & SARTOR, 2000), diarreia infantil (GUANDALINI *et al.*, 2000; ISOLAURI *et al.*, 1991), diarreia do viajante (HILTON *et al.*, 1997; OKSANEN *et al.*, 1990), colite (KRUIS *et al.*, 1997), bem como para restabelecer a microbiota vaginal (REID *et al.*, 2001; SHALEV *et al.*, 1996). Embora muitos destes estudos tenham sido feitos com pequeno número de pacientes, as evidências sugerem que as bactérias probióticas possam ser benéficas no tratamento de algumas doenças intestinais (KOPP-HOOLIHAN, 2001).

O uso de probióticos para controlar determinadas infecções e restabelecer a microbiota intestinal humana começou a ganhar aceitação. Os fatores que têm levado a esse interesse incluem o aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos e a aplicação de técnicas moleculares para selecionar os agentes probióticos que possam assegurar seu impacto clínico (ALVAREZ-OLMOS & OBERHELMAN, 2001).

No entanto, para se melhor demonstrar os benefícios dos probióticos no ser humano, é necessário que sejam realizados estudos clínicos bem conduzidos. Ultimamente, vários estudos sobre probióticos têm mostrado seu uso potencial nas doenças infecciosas.

Vários estudos clínicos têm mostrado o valor dos probióticos na profilaxia e tratamento de doenças diarreicas, especialmente em crianças com gastroenterite aguda causada por rotavírus, que é um dos importantes patógenos causadores de diarreia no mundo (ALVAREZ-OLMOS & OBERHELMAN, 2001).

RIBEIRO e VANDERHOOF (1998) mostraram que crianças de creche que ingeriram probióticos tiveram a incidência de doenças respiratórias diminuídas.

Os probióticos podem ajudar a aliviar alguns sintomas de alergia alimentar como àquelas que estão associadas à proteína do leite, possivelmente por degradar estas proteínas em peptídeos menores e aminoácidos que leva à diminuição dos sintomas de dermatite atópica (MAJAMAA & ISOLAURI, 1997).

Pessoas com intolerância à lactose geralmente não ingerem produtos lácteos, o que leva à deficiência de vários nutrientes, especialmente o cálcio. Evidências mostram que cepas de bactérias lácticas podem aliviar estes sintomas por degradar a lactose, reduzindo, assim, os sintomas de intolerância à lactose em crianças e adultos (MARTEAU *et al.*, 1990).

A microbiota e o sistema imune têm importante papel na modulação da carcinogênese e ambos podem ser influenciados pelos probióticos. Vários autores mostraram que alguns probióticos podem diminuir a concentração de enzimas fecais e sais biliares secundários que podem estar envolvidos na carcinogênese do cólon (WOLLOWSKI *et al.*, 2001). A administração de lactobacilos diminui a concentração de mieloperoxidase intestinal que freqüentemente está associada com inflamação (VANDERHOOF, 2001).

1.6.4. *Lactobacillus casei* Shirota

É um bacilo Gram-positivo que mede aproximadamente 1 a 2,5 µm de comprimento e 0,5 µm de diâmetro (Figura 4). Foi, inicialmente, isolado do

trato intestinal de crianças por Minoru Shirota (YAKULT CENTRAL INTITUTE FOR MICROBIOLOGICAL RESEARCH, 1999).

Desprovido de flagelos ou cílios, sua parede celular tem cerca de 20-30 nm e é composta de peptidoglicano (mureína), ácido teicóico e proteínas (Figura 4). Seu conteúdo de G+C é de 46,1%.

L. casei Shirota tem a capacidade de utilizar a lactose e esta capacidade é controlada por um plasmídeo (KADOTA, 1990). Apesar das infecções oportunistas terem se tornado um sério problema, a cepa de *L. casei* Shirota não desenvolveu qualquer tipo de resistência entre as bactérias intestinais; além disso, a cepa não apresenta plasmídeos de resistência aos antibióticos, apresenta apenas o plasmídeo da lactose, que não mostrou conter qualquer gene de resistência. Esta cepa parece produzir uma bacteriocina que inibe o crescimento bacteriano em cultura mista.

Figura 4. *Lactobacillus casei* Shirota

Legenda: (A) Cultura em meio LLV; (B) Coloração de Gram; (C) Microscopia eletrônica

Quando semeado em meio que contém glicose ou lactose como principal fonte de carboidrato, *L. casei* Shirota produz, predominantemente, ácido láctico como produto de fermentação. Assim, esta cepa pertence ao grupo homofermentativo das bactérias lácticas. A bactéria homofermentativa produz 2 moles de ácido láctico e 2 moles de ATP a partir de 1 mol de glicose. A eficiência da formação de ATP no processo de fermentação homoláctica é duas vezes maior que na fermentação heteroláctica, portanto a eficiência com a qual *L. casei* Shirota obtém energia é mais alta que a da bactéria heterofermentativa. As bactérias ácido lácticas são geralmente classificadas como homofermentativas e heterofermentativas. As bactérias homofermentativas são classificadas ainda em obrigatórias - são homofermentativas sob quaisquer condições de cultivo, e facultativas - podem apresentar o padrão homofermentativo com uma mudança da fonte de carbono e/ou das condições de cultivo. Como *L. casei* Shirota também produz ácido acético e etanol, esta cepa é homofermentativa facultativa (YAKULT CENTRAL INSTITUTE FOR MICROBIOLOGICAL RESEARCH, 1999).

1.6.5. TERAPIA DE REPOSIÇÃO BACTERIANA

Em 1877, PASTEUR e JOUBERT já haviam observado a interação antagonista entre algumas cepas bacterianas e Metchnikoff havia discutido a possibilidade da terapia de reposição bacteriana (BENGMARK, 1998).

Diferentes probióticos foram utilizados em estudos duplo-cegos e randomizados, verificando seus efeitos comparados ao placebo na prevenção da diarreia associada a antibióticos (Tabela 3). Várias espécies de *Lactobacillus* têm sido usadas como suplemento oral para manter ou restabelecer o equilíbrio da microbiota intestinal durante e após a antibioticoterapia (GOTZ *et al.*, 1979; TANKANOW *et al.*, 1990; ORRHAGE *et al.*, 1994; VANDERHOOF *et al.*, 1999; ORRHAGE *et al.*, 2000; HATAKKA *et al.*, 2001; THOMAS *et al.*, 2001). *Saccharomyces boulardii*, uma levedura

não patogênica, também tem sido testada na prevenção da diarreia associada a antibióticos (ELMER, 2001; MACFARLAND & BERNASCONI, 1993).

Tabela 3. Estudos duplo-cegos, randomizados e controlados com *Lactobacillus* sp na prevenção da diarreia associada aos antibióticos, em adultos e crianças

Experimento	Nº de Pacientes	Sexo (M-F) %	Antibiótico	Probiótico	Pacientes sem diarreia (%)	
					Tratamento	Placebo
Gotz <i>et al.</i> , 1979	79 ^a	44 - 56	Ampicilina	<i>L. acidophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i>	100	86
Tankanow <i>et al.</i> , 1990	38 ^c	58 - 42	Amoxicilina	<i>L. acidophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i>	34	31
Orrhage <i>et al.</i> , 1994	20 ^a	30 - 70	Clindamicina	<i>L. acidophilus</i> e <i>B. longum</i>	80	30
Arvola <i>et al.</i> , 1999	119 ^c	-	Vários	<i>Lactobacillus</i> GG	95	84
Vanderhoof <i>et al.</i> , 1999	188 ^c	45 - 55	Vários	<i>Lactobacillus</i> GG	93	74
Orrhage <i>et al.</i> , 2000	29 ^a	-	Cefpodoxime proxetil	<i>L. acidophilus</i> e <i>B. longum</i>	42	8
Hatakka <i>et al.</i> , 2001	571 ^c	54 - 46	Vários	<i>Lactobacillus</i> GG	-	-
Thomas <i>et al.</i> , 2001	267 ^a	54 - 46	Cefpodoxime proxetil	<i>Lactobacillus</i> GG	51	37

a: adultos, c: crianças

Durante os últimos 50 anos, o interesse dos pesquisadores esteve voltado para o estudo e uso dos quimioterápicos e antibióticos para o tratamento das doenças infecciosas. Há várias razões para inovar o interesse no controle de infecções que incluem: (1) o reconhecimento de que a antibioticoterapia não tem sido um sucesso como o esperado, uma vez que embora resolva o problema da infecção, cria outros; (2) o aumento na conscientização de que o tratamento antibiótico leva ao desequilíbrio da microbiota gastrointestinal, predispondo a infecções; (3) o aumento da resistência microbiana, resultado do uso de antimicrobianos com espectro cada vez mais amplo, excesso na prescrição e uso indevido de antibióticos; (4) o receio das indústrias farmacêuticas não serem capazes de desenvolver

antibióticos efetivos, em uma taxa eficiente, para competir com o desenvolvimento da resistência bacteriana aos antibióticos antigos; (5) a difusão do interesse público em métodos alternativos frente aos avanços na tecnologia e no desenvolvimento de novos antibióticos; (6) a mortalidade associada com a bacteremia (BENGMARK, 1998).

Uma importante meta da terapia com probióticos é tentar frear a proliferação de patógenos até o momento em que a microbiota possa ser restabelecida. A capacidade de "ganhar tempo" para restabelecer a resistência à colonização é provavelmente um importante mecanismo para o êxito da terapia com probióticos. Apesar de ter dado muita importância à minimização da ingestão de bactérias patogênicas, melhorando-se as condições de higiene e diminuindo-se o grau de contaminação dos alimentos e de bebidas, outros desafios surgem. As drogas antimicrobianas prejudicam o equilíbrio da microbiota intestinal, ao mesmo tempo em que destroem a microbiota sensível. Os antibióticos oferecem solo fértil para o desenvolvimento da microbiota multirresistente. Os problemas causados por organismos multirresistentes são de âmbito mundial, afetando também a população brasileira (ZAJICEK, 1996).

Acreditando no processo natural de recuperação do estado de higidez, com o reequilíbrio da microbiota intestinal, com o emprego do probiótico, aliado à escassez de trabalhos experimentais na população infantil, planejou-se desenvolver o atual estudo em pacientes pediátricos sob antibioticoterapia.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito do consumo de leite fermentado contendo *Lactobacillus casei* Shirota na microbiota intestinal de crianças sob antibioticoterapia.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a microbiota intestinal de crianças saudáveis lactentes e não lactentes.
- Correlacionar variação da microbiota intestinal, do grupo de crianças hospitalizadas sob vigência de antibioticoterapia, antes, durante e depois de receber o leite fermentado contendo *Lactobacillus casei* Shirota ou o placebo.
- Avaliar o efeito do antimicrobiano sobre algumas espécies bacterianas.
- Correlacionar, em crianças saudáveis e doentes, a microbiota intestinal e a concentração dos ácidos graxos de cadeia curta da microbiota intestinal, de crianças saudáveis e doentes.
- Correlacionar os parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes durante o período de internação e após a alta hospitalar.
- Verificar a permanência de *Lactobacillus casei* Shirota no trato intestinal de crianças doentes após a interrupção da sua ingestão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

No período de julho de 2000 a fevereiro de 2003 foram analisadas amostras de fezes de 137 crianças, sendo 28 crianças saudáveis de creche que não apresentavam queixa clínica e não estavam sob tratamento médico, e 109 pacientes internados na Enfermaria da Pediatria do Hospital Universitário - Universidade de São Paulo (HU - USP) (Figura 5) (Tabela 4). Das 28 crianças saudáveis, 9 eram da Creche da Universidade de São Paulo, 9 lactentes da Creche do Hospital Universitário - USP e 10 crianças da Creche Primeiros Passos (Tabela 5 e 6). As crianças de creche apresentaram idade média de 3,8 anos ($\pm 0,97$) e as crianças internadas no hospital, 4,7 anos ($\pm 3,6$), e a mediana foi de 3 anos tanto para o grupo de crianças internadas como para o de crianças saudáveis (Anexo I).

O projeto de pesquisa sob cadastro 063/99 foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário, em 18 de fevereiro de 2000 e também pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, em 24 de junho de 2002 (Anexo II). Todos os responsáveis pelos pacientes e pelas crianças de creches submetidas ao estudo assinaram o termo de consentimento para participar do projeto (Anexo III). Os dados pessoais e clínicos dos pacientes internados no Hospital Universitário e das crianças de creches foram arquivados (Anexo IV e V).

Tabela 4. Crianças saudáveis e pacientes internados selecionados para o estudo da microbiota intestinal

Local	Crianças	%
Pediatria do Hospital Universitário	109	79,6
Creche da USP e Creche Primeiros Passos	19	13,8
Creche do Hospital Universitário	9	6,6
Total	137	100,0

Tabela 5. Crianças sadias de creche

		SEXO			
		M	(%)	F	(%)
Idade	1 - 2 anos	4	(14,3)	5	(17,8)
	3 - 7 anos	8	(28,6)	11	(39,3)
Total		12	(42,9)	16	(57,1)

Figura 5. Crianças internadas no Hospital Universitário

3.2. CRITÉRIOS PARA SELEÇÃO DAS CRIANÇAS

3.2.1. CRIANÇAS SADIAS

As crianças de creches foram selecionadas de acordo com os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

Crítérios de Inclusão

- Termo de consentimento assinado pelos pais ou responsáveis.

Crítérios de Exclusão

- Crianças com sintoma gastrintestinal anormal ou com história médica de cirurgia estomacal ou intestinal acompanhada de doença orgânica.
- Crianças sob antibioticoterapia.
- Crianças com dificuldade para evacuar.

3.2.2. CRIANÇAS INTERNADAS

As crianças internadas na enfermaria do Hospital Universitário foram selecionadas de acordo com os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

Crítérios de Inclusão

- Pacientes recebendo principalmente antibióticos β -lactâmicos.
- Pacientes com consentimento dos pais ou responsáveis.
- Pacientes com idade entre 1 a 15 anos.

Crítérios de Exclusão

- Pacientes sob tratamento antibiótico há mais de três dias e/ou que estivessem ingerindo produtos contendo probióticos.
- Pacientes com sintomas gastrintestinal anormal ou com história médica de cirurgia estomacal ou intestinal acompanhada de doença orgânica.

- Pacientes que estavam tomando antiácidos, anti-diarréicos e supressores de secreção gástrica.
- Portadores de imunodepressão, desnutridos graves, neuropatas graves.
- Recém-nascidos e pacientes que estavam recebendo somente leite materno.

3.3. ESTUDO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE CRIANÇAS

3.3.1. CRIANÇAS SADIAS

Cada criança de creche selecionada para o estudo forneceu apenas uma amostra de fezes, sendo que nenhum produto probiótico foi oferecido. Estas amostras de fezes foram analisadas conforme o item 3.5.

3.3.2. CRIANÇAS INTERNADAS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO

O estudo da microbiota intestinal das crianças internadas no Hospital Universitário - USP consistiu de um ensaio clínico prospectivo, duplo-cego, randomizado e controlado. Estas crianças estavam sob vigência de antibioticoterapia, sendo selecionadas por critérios de inclusão e exclusão, e sorteadas de acordo com a randomização de casos determinada por Shieh (Anexo I), sendo divididos em dois grupos: um grupo que recebeu o Leite Fermentado contendo *Lactobacillus casei* Shirota (LF) e o outro que recebeu o placebo. Foram selecionados 109 pacientes do Hospital Universitário - USP para o estudo, sendo que 63 (57,8%) pacientes foram incluídos no estudo e divididos em dois grupos: o grupo LF, com 30 (47,6%) pacientes, e o grupo placebo, com 33 (52,4%) pacientes, que apresentaram idade média de 4,5 ($\pm 3,4$) anos e 4,8 ($\pm 3,8$) anos, respectivamente (Tabela 6). Estes pacientes tiveram seus dados clínicos e pessoais agrupados conforme mostrado na Tabela 7. Os antibióticos administrados aos pacientes neste estudo foram da classe dos β -lactâmicos, tais como cefalosporinas e

penicilinas (Tabela 8). O período médio de tratamento das 63 crianças internadas foi de 12 ($\pm 2,0$) dias, sendo que para as crianças tratadas por até 10 dias, o período médio foi de 8,2 ($\pm 0,06$) dias e para as crianças tratadas por mais de 10 dias, o período médio foi de 13,9 ($\pm 2,9$) dias.

Tabela 6. Pacientes do Hospital Universitário selecionados para o estudo da microbiota intestinal

	Grupo LF (%)	Grupo Placebo (%)	Total (%)
Pacientes Incluídos	30 (47,6)	33 (52,4)	63 (57,8)
Pacientes Excluídos	25 (54,3)	21 (45,7)	46 (42,2)
Total	55 (50,5)	54 (49,5)	109 (100)

Tabela 7. Características dos 63 pacientes do Hospital Universitário que completaram o estudo

PACIENTES DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO		Grupo LF (%) N= 30	Grupo Placebo (%) N= 33
SEXO	Masculino	20 (66,7)	16 (48,5)
	Feminino	10 (33,3)	17 (51,5)
IDADE	0 - 2 anos	10 (33,4)	13 (39,4)
	3 - 7 anos	16 (53,4)	9 (27,3)
	8 - 10 anos	0 (0)	6 (18,2)
	11 - 14 anos	4 (13,2)	5 (15,1)
DIAGNÓSTICO	Doença Respiratória	15 (50,0)	19 (57,6)
	Doença Não-Respiratória	15 (50,0)	14 (42,4)

Tabela 8. Antibióticos utilizados pelos pacientes internados no Hospital Universitário

CATEGORIA	Pacientes do Hospital Universitário	
	Grupo LF (N=30)	Grupo Placebo (N=33)
Penicilinas	24 (80,0)	26 (78,8)
Cefalosporinas	3 (10,0)	5 (15,2)
Penicilinas + Cefalosporinas	3 (10,0)	2 (6,0)

3.4. METODOLOGIA

3.4.1. ADMINISTRAÇÃO DO LEITE FERMENTADO AOS PACIENTES

Aos pacientes internados no Hospital Universitário foram administrados os leites fermentados por *Lactobacillus casei* Shirota (LF) ou o placebo, que consistiu de leite fermentado sem *Lactobacillus* preparado no Laboratório de Pesquisa da Yakult S.A. Estes pacientes sob antibioticoterapia receberam por dia, de forma randomizada, dois frascos contendo 120 mL cada de leite fermentado ou placebo, até o último dia de tratamento (Anexo I). Os voluntários de creches não receberam o leite fermentado ou placebo.

3.4.2. COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de fezes coletadas dos pacientes do Hospital Universitário e das crianças das creches foram conservadas em meio de transporte Cary-Blair, meio semi-sólido contendo gás nitrogênio para manter as condições de anaerobiose até o processamento no laboratório. As amostras foram mantidas sob refrigeração para evitar a multiplicação excessiva de bactérias. A amostra colhida e conservada desta maneira foi imediatamente enviada ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para o seu processamento em um período máximo de 6 horas.

3.4.3. INTERVALO ENTRE AS COLETAS E NÚMERO DE AMOSTRAS

Foram colhidas de 3 a 5 amostras de cada paciente, de acordo com a frequência de evacuação e o aspecto das fezes, e transportadas em gelo. O aspecto das fezes foi classificado de acordo com as quatro categorias: sólida (-), pastosa (+), difusa (++) e líquida (+++).

As coletas das amostras de fezes dos pacientes do Hospital Universitário foram realizadas no dia de admissão do paciente ou até no máximo dentro de três dias do início do tratamento antibiótico e a cada 72 horas da coleta anterior, ou, então, após a ingestão de pelo menos 240 mL de leite fermentado ou de placebo. A última amostra foi colhida uma semana após a suspensão do antibiótico e do leite fermentado ou do placebo (Figura 6). Os voluntários sadios forneceram apenas uma amostra de fezes.

Figura 6. Esquema de coleta das amostras das crianças internadas no Hospital Universitário

3.5. ANÁLISE DAS AMOSTRAS

As amostras de fezes colhidas nas creches e no Hospital Universitário foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP e submetidas à análise microbiológica quantitativa e qualitativa, à identificação de *Lactobacillus* por API 50CH e ELISA, além da análise de ácidos graxos de cadeia curta, conforme mostra a Figura 7. Uma alíquota de cada amostra colhida foi mantida a -80°C .

Figura 7. Fluxograma do procedimento para análise das amostras

3.5.1. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Esta fase consistiu-se de duas etapas: a análise quantitativa e a qualitativa de microrganismos aeróbios e de anaeróbios.

Para a análise quantitativa, aproximadamente 0,5 g de fezes foi homogeneizada em 4,5 mL de solução salina no *glove box* com injeção de uma mistura padrão de gases contendo dióxido de carbono (CO₂) balanço e hidrogênio (H₂) 3% (White Martins Gases Industriais S. A.). Da suspensão inicial foram realizadas diluições seriadas até a concentração 10⁻⁸ (Figura 7).

A análise qualitativa foi realizada semeando-se as diferentes diluições da amostra em meios de cultura seletivos e diferenciais de acordo com o microrganismo a ser pesquisado (Tabela 9).

Para a contagem das colônias dos microrganismos isolados foram consideradas as menores diluições em que fosse possível contar pelo menos 30 colônias semelhantes, confirmadas pela identificação bioquímica. Para os meios de cultura distribuídos em placas foram consideradas as diluições 10⁻¹ a 10⁻⁶. Caso o microrganismo não fosse detectado inclusive na menor diluição, o resultado considerado foi o log de 2,3. O mesmo foi considerado para os microrganismos isolados em meios distribuídos em tubo para os microrganismos anaeróbios, porém as diluições utilizadas foram 10⁻⁴ a 10⁻⁸. Caso o microrganismo não fosse detectado inclusive na menor diluição, o resultado considerado foi o log de 5,2.

3.5.1.1. Identificação bioquímica

Para os microrganismos aeróbios foram realizadas contagens das diferentes colônias isoladas e coloração de Gram. Os bacilos Gram-negativos foram identificados por testes como oxidase, EPM, MiLi e citrato, e quando identificada alguma bactéria potencialmente patogênica, como *E. coli* (enteropatogênica e enteroinvasora), *Shigella* sp ou *Salmonella* sp, foi realizada a reação de aglutinação com soros policlonais e monoclonais. Os cocos Gram-positivos foram identificados por testes como: reação de catalase, coagulase, hidrólise de bile-esculina e crescimento em NaCl 6,5%.

Os microrganismos anaeróbios foram identificados por teste de respiração, reação de catalase e morfologia.

Tabela 9. Meios de cultura utilizados no estudo da microbiota intestinal

MICROORGANISMO	MEIO DE CULTURA	DILUIÇÃO	INCUBAÇÃO	OBSERVAÇÕES
Aeróbios Totais	TSA (placa)	-1 a -6	48 h/ 35° C ($\pm 1^\circ$ C) aerobiose	
<i>Escherichia coli</i>	Agar McConkey (placa)	-1 a -6	48 h/ 35° C ($\pm 1^\circ$ C) aerobiose	
<i>P. aeruginosa</i>	Agar cetrimide (placa)	-1 a -2	48 h/ 35° C ($\pm 1^\circ$ C) aerobiose	
<i>Streptococcus</i> spp	COBA (placa)	-1 a -6	48 h/ 35° C ($\pm 1^\circ$ C) aerobiose	Ácido Oxolínico
<i>Enterococcus</i> spp	KF (placa)	-1 a -6	48 h/ 35° C ($\pm 1^\circ$ C) aerobiose	
<i>Staphylococcus</i> spp	Agar Chapman (placa)	-1 a -2	48 h/ 35° C ($\pm 1^\circ$ C) aerobiose	
Leveduras	Agar Sabouraud Dextrose (placa)	-1 a -2	72 h/ 35° C ($\pm 1^\circ$ C) aerobiose	
Anaeróbios Totais	VLM (tubo)	-5 a -8	120 h/35°C ($\pm 1^\circ$ C) anaerobiose	
<i>Bacteroides</i> spp	VLM + antibióticos (tubo)	-4 a -7	120 h/35°C ($\pm 1^\circ$ C) anaerobiose	Kanamicina: Vancomicina (9:1)
<i>Bifidobacterium</i> spp	TOS (tubo)	-4 a -7	72 h/35°C ($\pm 1^\circ$ C) anaerobiose	Ácido propiônico (Beerens H., 1991)
<i>Clostridium</i> spp	TSC (placa)	-1 a -6	24 h/35°C ($\pm 1^\circ$ C) anaerobiose	Tryptose sulphite cycloserine
<i>Lactobacillus</i> Totais	LBS (placa)	-1 a -6	120 h/35°C ($\pm 1^\circ$ C) anaerobiose	
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	LLV (placa)	-1 a -6	72 h/35°C ($\pm 1^\circ$ C) anaerobiose	

TSA: *Trypticase Soy Agar* (Oxoid), COBA: *Columbia Blood Agar Base* (Oxoid), KF: *KF Medium* (Merck), VLM: *Viande et de Levures*, TOS: *Transoligossacarídeo*, TSC: *Tryptose Sulphite Cycloserine*, LLV: *Lactitol*, LBS, *Agar Vancomicina*.

A identificação bioquímica de *Lactobacillus* foi realizada pelo estudo do metabolismo de carboidratos. O sistema utilizado foi a galeria API 50 CH (bioMérieux), sendo testados os substratos: glicerol, eritritol, D-arabinose, L-arabionose, ribose, D-xilose, L-xilose, adonitol, β -metil-D-xiloside, galactose, glicose, frutose, manose, sorbose, ramnose, dulcitol, inositol, manitol, sorbitol, α -metil-D-manoside, α -metil-D-glucoside, N-acetil-glucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiose, maltose, lactose, melibiose, sacarose, trealose, inulina, melezitose, rafinose, amido, glicogênio, xilitol, gentiobiose, D-turanose, D-lixose, D-tagatose, D-fucose, D-arabitol, gluconato, 2-ceto-gluconato e 5-ceto-gluconato.

3.5.1.2. identificação de *L. casei* Shirota por *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

A técnica foi realizada conforme descrito por VOLLER *et al.* (1976) e YUKI *et al.* (1999). A colônia de bacilo Gram-positivo isolada dos meios LBS e LLV foi ressuspensa em tampão carbonato (Na_2CO_3 15 mM e NaHCO_3 35 mM) pH 9,6 com densidade óptica 1 em leitura realizada com filtro de 660 nm. Uma alíquota de 100 μL desta suspensão foi inoculada em placa de microtitulação e incubada por 18-20 horas a 4° C.

Após a incubação, a placa de microtitulação foi lavada com tampão fosfato (NaCl 0,8%, KCl 0,02%, Na_2HPO_4 10mM, KH_2PO_4 15 mM) adicionado de 0,05% de Triton X-100. A placa foi bloqueada com 120 μL de tampão carbonato contendo soro albumina bovina (1%) e incubada a 37°C por 90 min.

A placa foi novamente lavada com tampão fosfato e adicionada de 90 μL do anticorpo monoclonal anti - *L. casei* Shirota diluído em tampão carbonato com soro albumina bovina (1%) e incubada a 37° C/90 min.

O anticorpo monoclonal foi gentilmente doado pela Yakult do Japão. Este anticorpo foi preparado pela técnica de fusão de células, como descrito por KÖHLER e MILSTEIN (1975).

Em seguida a placa foi lavada e adicionada de 100 µL conjugado de peroxidase (ICN Pharmaceuticals, Inc.) diluída em tampão carbonato com soro albumina bovina (1%) e novamente incubada a 37° C/90 min.

Após a incubação, a placa foi lavada e adicionada de 100 µL do agente revelador (0,4 mg/mL de o-phenylenediamine) diluído em tampão citrato (ácido cítrico 0,51%, Na₂HPO₄ 50 mM, 0,02% de H₂O₂ 30%); pH 5,0 incubados a 37°/10 min. A reação foi interrompida com 50 mL de H₂SO₄ 2,5 M.

A absorbância de cada amostra foi medida em leitora de ELISA utilizando filtro de 492 nm para determinar a quantidade de substrato que foi consumido.

Foram realizadas diluições do anticorpo monoclonal e do conjugado para determinar as concentrações utilizadas nesta metodologia. Também foram realizados testes de sensibilidade do anticorpo monoclonal em diferentes diluições da suspensão contendo *L. casei* Shirota e também de especificidade com outros bacilos Gram positivos como (*Bifidobacterium* sp e outras espécies de *Lactobacillus*).

Para a interpretação do resultado, considerou-se uma reação positiva quando a absorbância era igual a 1,0, correspondendo ao limiar de reatividade de cerca de 10⁸ UFC/mL da colônia de *L. casei* Shirota.

3.6. ANÁLISE DOS ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA (SCFA) POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRECISÃO (HPLC)

Para a análise dos SCFA das amostras de fezes foi realizada a extração dos seguintes ácidos orgânicos: ácido succínico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico e ácido valérico.

A extração desses ácidos orgânicos das fezes foi realizada conforme descrito por CHONAN e WATANUKI (1995). Este procedimento consistiu no tratamento das amostras com ácido perclórico (0,15 M), diluição na proporção de 1:8, filtração em filtro de 0,45 µm (Millipore) e injeção do volume de 30 µL no cromatógrafo para análise dos ácidos.

A análise foi realizada por HPLC equipado com 2 colunas REZEX - Organic Acid em forno a 60° C (300 mm x 7,8 mm, 8µ - 8%), detector com arranjo de fotodiodos ($\lambda=205$ nm). O tempo de corrida foi de 200 minutos com integração entre 35 e 100 minutos e fase móvel com ácido sulfúrico (0,01 N) pH 2,0. A concentração dos ácidos orgânicos foi calculada usando substâncias-padrão.

3.7. ANÁLISE DOS RESULTADOS

3.7.1. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS

Foram consideradas as contagens médias de microrganismos considerados como índice de saúde, como microrganismos aeróbios e anaeróbios totais, *Bifidobacterium* sp, *Lactobacillus* e *Escherichia coli*, além de outros microrganismos como *Streptococcus* sp, *Enterococcus* sp, *Staphylococcus* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, leveduras, *Bacteroides* sp, *Clostridium* sp e *L. casei* Shirota. Estas avaliações foram realizadas por meio de comparações entre a contagem média de microrganismos e o valor encontrado transformado em logaritmo.

As avaliações foram realizadas para a população do grupo de crianças saudáveis dividindo-se as crianças em dois grupos: lactentes, com até dois anos de idade, e não lactentes, com idade acima de 2 anos. As crianças do Hospital Universitário também foram divididas em dois grupos, pela randomização de casos, sendo um grupo constituído por crianças que receberam o LF e o outro por crianças que receberam o placebo.

Além disso, as crianças saudáveis tiveram a contagem média de microrganismos encontrada comparada com a das crianças que estavam sob tratamento antibiótico.

3.7.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

A avaliação clínica dos pacientes foi realizada por médicos pediatras do Hospital Universitário que os atenderam durante a internação até a alta hospitalar e, depois, no retorno ambulatorial. Foram considerados como parâmetros clínicos a ocorrência ou não de diarreia e distensão abdominal.

3.7.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados encontrados foram calculados por análise de variância (ANOVA) e as médias individuais comparadas pelo teste T de Tukey. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$ (Neter *et al.*, 1996; MAGALHÃES & LIMA, 2002).

A variação média das contagens de microrganismos no decorrer das coletas foi calculada entre os dois grupos estudados, LF e placebo, pela análise e comparação entre as diferenças e os respectivos desvios-padrão das contagens médias de cada período de coleta.

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE DOS RESULTADOS DA MICROBIOTA FECAL DAS CRIANÇAS SADIAS

A análise microbiológica das amostras de fezes das 28 crianças sadias de creche, lactentes e não-lactentes, apresentou uma contagem média do Log₁₀ de UFC/g de fezes dos microrganismos pesquisados, como: bactérias aeróbias, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* sp, *Enterococcus* sp, *Staphylococcus* sp, leveduras, bactérias anaeróbias, *Bacteroides* sp, *Bifidobacterium* sp, *Lactobacillus* sp, *L. casei* Shirota e *Clostridium* sp, como mostram a Tabela 10 e a Figura 8.

Tabela 10. Relação da contagem de microrganismos da microbiota fecal de crianças sadias, com os respectivos desvios-padrão

Microrganismos	Média do Log ₁₀ de UFC/g de fezes (DP)				Teste T de Tukey
	Lactentes		Não-lactentes		
Aeróbios Totais	8,80	(±0,60)	7,91	(±0,79)	0,208
Escherichia coli	8,08	(±1,07)	6,96	(±0,90)	0,014*
<i>P. aeruginosa</i>	2,53	(±0,67)	2,37	(±0,30)	0,401
<i>Streptococcus</i> sp	8,69	(±3,15)	7,70	(±1,04)	0,013*
<i>Enterococcus</i> sp	7,70	(±0,93)	5,80	(±1,70)	0,007*
<i>Staphylococcus</i> sp	4,30	(±1,78)	3,00	(±1,17)	0,004*
Leveduras	3,32	(±1,30)	3,46	(±0,99)	0,798
Anaeróbios Totais	9,87	(±0,87)	9,47	(±0,68)	0,220
<i>Bacteroides</i> sp	9,50	(±0,96)	8,36	(±0,79)	0,004*
<i>Bifidobacterium</i> sp	10,07	(±0,61)	9,15	(±0,46)	0,0003*
<i>Lactobacillus</i> sp	6,08	(±2,71)	5,19	(±2,12)	0,361
<i>L. casei</i> Shirota	<2,30	(0)	<2,30	(0)	1
<i>Clostridium</i> sp	<2,30	(0)	2,59	(±0,68)	0,208

Legenda: *: p<0,05

Figura 8. Contagem de microrganismos encontrados na microbiota fecal de crianças saudáveis de creche

4.2. ANÁLISE DOS RESULTADOS DAS CRIANÇAS INTERNADAS

4.2.1. CRIANÇAS EXCLUÍDAS DO ESTUDO

Do total de 109 crianças internadas, 46 (42,2%) crianças foram excluídas do estudo por diferentes razões, tais como: 30 pacientes receberam alta e não colheram a amostra na residência (65,2%), 7 pacientes apresentaram diagnóstico que promoveu a mudança no tratamento (15,2%), 6 crianças selecionadas não obedeciam aos critérios de inclusão (13,0%), 2 crianças recusaram o leite fermentado (4,4%) e 1 criança era moradora de outro Estado (2,2%) (Figura 9).

Figura 9. Motivos de exclusão dos pacientes do Hospital Universitário do estudo da microbiota fecal

4.2.2. CRIANÇAS INCLUÍDAS NO ESTUDO

Dentre o total de 109 crianças hospitalizadas no setor de Pediatria do Hospital Universitário selecionadas para o estudo, 63 (57,8%) foram incluídas no estudo, sendo analisadas de 3 a 5 amostras de cada paciente selecionado.

4.2.2.1. ANÁLISE DA MICROBIOTA FECAL DE CRIANÇAS INTERNADAS E SOB TRATAMENTO ANTIBIÓTICO PELA CONTAGEM MÉDIA DO NÚMERO DE MICRORGANISMOS ESTUDADOS

Os aspectos das amostras de fezes, avaliados de acordo com as quatro categorias foram: sólida, pastosa, difusa e líquida, sendo considerado para os 2 grupos estudados durante os 3 períodos de ingestão dos leites fermentados (Tabela 11).

Tabela 11. Aspecto das amostras fecais das crianças internadas no Hospital Universitário

Período de Ingestão dos		Aspecto (%)		
Leites Fermentados		Grupo LF (%)		Grupo Placebo (%)
Antes	Sólida	8,3	Sólida	15,6
	Pastosa	91,7	Pastosa	71,9
	Difusa	0	Difusa	12,5
Durante	Sólida	8,3	Sólida	6,3
	Pastosa	79,2	Pastosa	84,3
	Difusa	12,5	Difusa	9,4
Depois	Sólida	12,5	Sólida	3,1
	Pastosa	87,5	Pastosa	87,5
	Difusa	0	Difusa	9,4

O resultado da contagem média de microrganismos (Log do N° de UFC/g de fezes) das amostras das 63 crianças incluídas no estudo está apresentado na tabela 12. Estes resultados foram comparados entre as contagens das amostras dos dois grupos de pacientes: o grupo de 30 crianças que recebeu o Leite Fermentado contendo *Lactobacillus casei* Shirota (LF) e o grupo placebo com 33 crianças. A Figura 10 apresenta os resultados das contagens médias dos microrganismos e os respectivos desvios-padrão para as coletas analisadas.

A comparação da contagem média de microrganismos entre os grupos LF e placebo das coletas das primeiras amostras foi maior ($p < 0,05$) para *Streptococcus* sp, mostrando que a amostragem inicial dos 2 grupos era diferente.

Durante o período de ingestão do leite fermentado e do placebo a contagem média de *Lactobacillus* sp e de *L. casei* Shirota foi maior ($p < 0,05$)

no grupo que recebeu o LF. O grupo placebo apresentou resultado maior, no mesmo período, para a contagem média de *Pseudomonas aeruginosa* ($p<0,05$) e *Clostridium* sp ($p<0,05$).

Uma semana após o término do tratamento antibiótico e da ingestão dos leites fermentados, a contagem média de microrganismos permaneceu alta para *Lactobacillus* sp ($p<0,05$) e *L. casei* Shirota ($p<0,05$), indicando que *L. casei* Shirota ainda permanecia na microbiota intestinal.

Tabela 12. Microrganismos da microbiota fecal das 63 crianças sob tratamento antibiótico do Hospital Universitário (média e desvio-padrão)

MICRORGANISMOS	MÉDIA do Log ₁₀ de UFC/g de FEZES					
	Grupo LF (N=30)			Grupo Placebo (N=33)		
	ANTES	DURANTE	DEPOIS	ANTES	DURANTE	DEPOIS
Aeróbios Totais	8,28 (±0,9)	8,02 (±0,9)	8,11 (±0,8)	8,04 (±1,1)	8,0 (±0,7)	7,6 (±0,7)
Escherichia coli	7,77 (±1,1)	7,44 (±1,1)	6,96 (±1,0)	7,45 (±1,1)	7,34 (±0,8)	6,75 (±1,1)
<i>P. aeruginosa</i>	2,41 (±0,5)	2,36 (±0,3)	2,45 (±0,6)	2,56 (±0,7)	2,70 (±0,8)	2,58 (±0,7)
<i>Streptococcus</i> sp	7,06 (±1,2)	7,05 (±1,5)	7,65 (±1,0)	6,34 (±1,6)	6,6 (±1,5)	7,27 (±1,0)
<i>Enterococcus</i> sp	6,08 (±1,6)	5,97 (±1,9)	6,6 (±1,5)	5,45 (±1,7)	5,84 (±1,7)	6,36 (±1,1)
<i>Staphylococcus</i> sp	2,96 (±0,9)	2,73 (±0,8)	3,36 (±1,4)	2,92 (±0,9)	2,95 (±0,8)	3,45 (±1,2)
Leveduras	3,25 (±0,9)	3,60 (±1,2)	3,17 (±0,9)	3,37 (±1,2)	3,70 (±1,2)	3,32 (±1,1)
Anaeróbios Totais	9,56 (±0,8)	9,55 (±0,6)	9,76 (±0,7)	9,39 (±0,9)	9,55 (±0,7)	9,49 (±0,6)
<i>Bacteroides</i> sp	8,70 (±0,9)	8,82 (±0,8)	8,56 (±1,3)	8,53 (±1,1)	8,71 (±1,0)	8,66 (±0,8)
<i>Bifidobacterium</i> sp	8,47 (±1,0)	8,74 (±1,0)	8,93 (±0,9)	7,67 (±2,3)	8,07 (±1,9)	8,67 (±1,6)
<i>Lactobacillus</i> sp	4,86 (±2,0)	6,98 (±1,3)	6,41 (±1,9)	4,18 (±2,2)	4,76 (±2,1)	4,96 (±2,3)
<i>L. casei</i> Shirota	2,3 (0)	6,74 (±1,5)	4,05 (±1,9)	2,3 (0)	2,3 (0)	2,3 (0)
<i>Clostridium</i> sp	2,53 (±0,6)	2,50 (±0,6)	3,05 (±1,4)	3,19 (±1,6)	2,84 (±1,0)	3,06 (±1,4)

Figura 10. Contagem média dos microrganismos pesquisados nas amostras fecais de crianças sob antibioticoterapia do Hospital Universitário (média e respectivo desvio-padrão)

Legenda: *: $p < 0,05$

4.2.2.2. ANÁLISE DA VARIAÇÃO MÉDIA

A variação média da contagem dos microrganismos pesquisados foi avaliada durante os 3 períodos de coleta; antes, durante e depois da ingestão do leite fermentado, sendo consideradas as diferenças da contagem média em cada período estudado. Essas diferenças, quando negativas, indicam que a contagem média do microrganismo diminuiu entre as coletas e, quando positivas, que houve um aumento na sua contagem.

Assim, a média das diferenças entre a primeira coleta e as coletas intermediárias, ou seja, as coletas durante o período de ingestão do leite fermentado, indicam a variação média ocorrida devido a administração do leite fermentado.

As médias entre as diferenças da contagem média das coletas realizadas no período de ingestão dos leites fermentados comparadas com a coleta realizada antes da ingestão dos produtos estão representadas na Tabela 13. A variação negativa pode ser confirmada pela diminuição na contagem dos microrganismos aeróbios analisados, como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus* sp e *Staphylococcus* sp. Porém, apesar da variação média de anaeróbios totais ser negativa, as variações para *Bacteroides* sp, *Bifidobacterium* sp, *Lactobacillus* sp e *L. casei* Shirota foram positivas, indicando um aumento na contagem média desses microrganismos. O grupo placebo não apresentou variação para os microrganismos aeróbios e, para anaeróbios, foi positiva, porém as variações observadas foram menores que 0,6 log.

Tabela 13. Variação média da contagem de microrganismos estudados nos grupos de crianças internadas que receberam LF ou placebo nos três períodos de coleta

Microrganismos	Grupo LF			Grupo Placebo		
	1	2	3	1	2	3
Aeróbios Totais	-0,3 (±0,6)	+0,1 (±0,4)	-0,2 (±0,4)	0 (±0,6)	+0,3 (±0,3)	-0,4 (±0,4)
<i>E. coli</i>	-0,4 (±0,5)	-0,5 (±0,5)	-0,8 (±0,4)*	-0,1 (±0,7)	-0,7 (±0,7)*	-0,7 (±0,6)*
<i>P. aeruginosa</i>	-0,1 (±0,2)	+0,1 (±0,3)	0 (±0,2)	+0,1 (±0,1)	-0,1 (±0,1)	0 (±0,1)
<i>Streptococcus</i> sp	0 (±0,6)	+0,6 (±0,4)	+0,6 (±0,6)	+0,3 (±1,0)	+0,7 (±0,6)	+1,0 (±0,7)*
<i>Enterococcus</i> sp	-0,1 (±1,0)	+0,6 (±0,9)	+0,5 (±0,7)	+0,4 (±1,0)	+0,5 (±0,5)	+1,0 (±0,7)*
<i>Staphylococcus</i> sp	-0,2 (±0,5)	+0,6 (±0,8)*	+0,4 (±0,5)	0 (±0,1)	+0,5 (±0,3)	+0,5 (±0,2)
Leveduras	+0,4 (±0,4)	+0,4 (±0,4)	-0,1 (±0,3)	+0,3 (±0,7)	-0,8 (±0,5)	0 (±0,5)
Anaeróbios Totais	0 (±0,3)	+0,2 (±0,2)	+0,2 (±0,2)	+0,2 (±0,4)	-0,1 (±0,2)	+0,1 (±0,3)
<i>Bacteroides</i> sp	+0,1 (±0,4)	-0,3 (±0,6)	-0,1 (±0,5)	+0,2 (±0,5)	0 (±0,2)	+0,1 (±0,3)
<i>Bifidobacterium</i> sp	+0,5 (±0,4)	+0,2 (±0,3)	+0,7 (±0,3)*	+0,4 (±1,0)	+0,6 (±0,5)	+1,0 (±0,7)*
<i>Lactobacillus</i> sp	+2,1 (±1,3)*	+0,6 (±1,2)	+1,6 (±1,0)*	+0,6 (±1,4)	+0,2 (±1,5)	+0,8 (±1,2)
<i>L. casei</i> Shirota	+4,5 (±0,6)*	-2,7 (±1,4)*	+1,8 (±1,0)*	0 (±0,7)	0 (±0,7)	0 (±1,0)
<i>Clostridium</i> sp	0 (±0,1)	+0,6 (±0,7)*	+0,5 (±0,5)	-0,4 (±0,6)	+0,2 (±0,5)	-0,1 (±0,5)

Legenda: *: p<0,05; 1: antes-durante; 2: durante-depois; 3: antes-depois

As diferenças entre as contagens bacterianas obtidas entre as coletas intermediárias e final indicam a variação média ocorrida após a administração do antibiótico. Estas diferenças observadas nos dois grupos estão representadas na Tabela 13.

Pode-se observar que o grupo que recebeu o LF apresentou variação positiva neste período para os microrganismos aeróbios e anaeróbios totais, indicando que houve um aumento na contagem total de microrganismos. Embora a variação da contagem total de microrganismos aeróbios e anaeróbios tenha sido positiva, *E. coli* apresentou variação negativa, enquanto que para os microrganismos anaeróbios, a variação foi também negativa para *Bacteroides* sp e *L. casei* Shirota, indicando que houve uma diminuição desses microrganismos.

O grupo placebo apresentou variação média positiva para a contagem média de aeróbios e negativa para anaeróbios. Embora a variação média tenha sido positiva para aeróbios totais, neste grupo, observa-se que a variação foi negativa para *E. coli*, *P. aeruginosa* e leveduras. Apesar da variação média para anaeróbios ter sido negativa, houve um aumento na contagem média de *Bifidobacterium* sp, *Lactobacillus* sp e *Clostridium* neste período do estudo.

A diferença entre a contagem inicial e a final indica a variação ocorrida durante todo o período do estudo. As diferenças médias observadas nos dois grupos estão representadas na Tabela 13.

Pode-se observar que a variação média da contagem de microrganismos para o grupo LF foi negativa para os microrganismos aeróbios totais, com exceção de *Streptococcus* sp, *Enterococcus* sp, *Staphylococcus* sp, que apresentaram um aumento na contagem média.

No grupo placebo a variação foi negativa para os microrganismos aeróbios, com exceção de *Streptococcus* sp, *Enterococcus* sp e *Staphylococcus* sp, e foi positiva para anaeróbios, com exceção de *Clostridium* sp.

4.3. COMPARAÇÃO ENTRE A MICROBIOTA FECAL DE CRIANÇAS SADIAS E CRIANÇAS DOENTES ANTES DA INGESTÃO DO LEITE FERMENTADO

Foram analisadas as amostras de fezes de 28 crianças sadias e comparadas com as amostras iniciais dos 63 pacientes internados que estavam sob antibioticoterapia com até três dias de tratamento (Tabela 14).

Tabela 14. Avaliação da influência da antibioticoterapia na microbiota fecal de 28 crianças sadias e 63 crianças doentes

Microrganismos	Crianças Sadias n=28	Crianças Doentes n=42	Teste t de Tukey
Aeróbios Totais	7,91	6,76	0,002*
<i>E. coli</i>	6,96	7,76	0,012*
<i>P. aeruginosa</i>	2,37	2,30	0,234
<i>Streptococcus</i> sp	7,66	6,80	0,020*
<i>Enterococcus</i> sp	5,85	5,60	0,620
<i>Staphylococcus</i> sp	3,07	2,66	0,157
Anaeróbios Totais	9,47	9,63	0,452
<i>Bacteroides</i> sp	8,36	8,84	0,061
<i>Bifidobacterium</i> sp	9,16	8,32	0,002*
<i>Clostridium</i> sp	2,59	2,75	0,587
<i>Lactobacillus</i> sp	5,19	5,08	0,870
<i>L. casei</i> Shirota	2,30	2,30	1,0
Leveduras	3,48	3,14	0,291

Legenda: *: $p < 0,05$

4.4. ANÁLISE DOS RESULTADOS DOS ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA POR CROMATOGRAFIA DE ALTA PRECISÃO (HPLC)

As amostras de fezes das 28 crianças saudáveis foram analisadas quanto à quantificação de ácidos graxos de cadeia curta em relação aos grupos de crianças lactentes e não-lactentes (Tabela 15).

Dentre as amostras de fezes fornecidas pelas 63 crianças internadas, foram realizadas as análises dos ácidos graxos de cadeia curta de 42 (66,7%) crianças, sendo que 19 (45,2%) delas receberam o LF e 23 (54,8%) o placebo (Tabela 16). Observa-se que a concentração dos nove ácidos analisados foi maior no grupo de crianças saudáveis.

Os resultados das concentrações de ácidos graxos das crianças saudáveis foram comparados com as primeiras amostras colhidas das 63 crianças internadas sob antibioticoterapia, que ainda não haviam consumido os leites fermentados (Tabela 15).

Tabela 15. Análise dos ácidos graxos de cadeia curta das 28 crianças lactentes e não-lactentes

Ácidos Orgânicos (mg/g)	Lactentes N=9	Não-lactentes N=19	Teste T de Tukey
Acético	6,04 ($\pm 31,1$)	11,65 ($\pm 187,0$)	1,66E-05*
Propiônico	15,36 ($\pm 8,89$)	5,94 ($\pm 6,4$)	0,0016*
Isobutírico	2,67 ($\pm 3,17$)	0,83 ($\pm 1,7$)	0,0583
Butírico	10,11 ($\pm 7,84$)	3,53 ($\pm 5,5$)	0,0166*
Isovalérico	2,14 ($\pm 2,92$)	1,06 ($\pm 2,0$)	0,2620
Valérico	12,57 ($\pm 18,61$)	0,27 ($\pm 0,3$)	0,0067*
Succínico	10,90 ($\pm 7,31$)	7,22 ($\pm 13,3$)	0,4471
Lático	5,39 ($\pm 13,3$)	2,12 ($\pm 4,4$)	0,3365
Fórmico	19,42 ($\pm 18,6$)	3,95 ($\pm 4,0$)	0,0016*

Legenda: *: $p < 0,05$; E: exponencial

Tabela 16. Análise dos ácidos graxos de cadeia curta de 42 pacientes sob antibioticoterapia que receberam leite fermentado ou placebo nos três períodos estudados

Ácidos Orgânicos (mg/g)	LF (N=19)			Placebo (N=23)		
	Antes	Durante	Depois	Antes	Durante	Depois
Acético	7,0 (±13,0)	4,9 (±3,5)	6,4 (±11,0)	9,1 (±17,0)	7,7 (±10,0)	8,7 (±17,0)
Propiônico	5,5 (±10,0)	3,4 (±3,8)	5,4 (±8,2)	8,6 (±14,0)	6,3 (±5,0)	9,3 (±15,6)
Isobutírico	0,7 (±1,4)	0,4 (±0,6)	1,0 (1,8)	0,4 (±0,6)	0,4 (±1,0)	0,8 (±1,9)
Butírico	1,0 (±2,0)	0,7 (±0,5)	1,2 (±1,4)	0,8 (±1,9)	1,3 (±0,9)	1,2 (±1,3)
Isovalérico	1,3 (±4,4)	0,7 (±2,2)	1,0 (±3,3)	0,6 (±1,2)	0,5 (±0,3)	0,5 (±0,8)
Valérico	1,7 (±3,2)	0,9 (±1,5)	2,9 (±10,3)	0,9 (±1,4)	0,8 (±0,9)	0,7 (±1,7)
Succínico	4,6 (±7,2)	5,4 (±10,1)	4,6 (±6,3)	4,4 (±7,0)	6,8 (±11,3)	4,1 (±7,3)
Lático	1,4 (±3,3)	0,4 (±0,5)	1,6 (±5,2)	0,6 (±1,3)	1,1 (±1,7)	0,7 (0,9)
Fórmico	1,7 (±2,3)	1,5 (±2,9)	1,4 (2,0)	1,9 (±2,4)	3,1 (±4,0)	3,6 (±7,4)

Tabela 17. Análise dos ácidos graxos de cadeia curta de 28 crianças sadias e 42 crianças doentes sem a ingestão de leite fermentado ou placebo

Ácidos Orgânicos (mg/g)	Crianças Sadias N=28	Crianças Doentes N=42	Teste T de Tukey
Acético	27,0 (±32)	8,1 (±3,0)	0,000987*
Propiônico	9,3 (±9,1)	7,1 (±3,0)	0,433
Isobutírico	1,4 (±2,8)	0,6 (±0,5)	0,036
Butírico	5,6 (±7,7)	1,1 (±0,9)	0,000216*
Isovalérico	1,4 (±2,8)	0,9 (±2,3)	0,483
Valérico	4,2 (±14)	1,3 (±1,3)	0,850
Succínico	8,4 (±14)	4,5 (±0,1)	0,077
Lático	3,2 (± 9,9)	1,0 (±1,3)	0,098
Fórmico	8,9 (±15)	1,8 (±0,05)	0,00058*

Legenda: *: $p < 0,05$

4.5. AVALIAÇÃO CLÍNICA

O estudo de avaliação da microbiota fecal foi concluído com 63 crianças internadas na Enfermaria da Pediatria do Hospital Universitário. As características relacionadas ao sexo, à idade, ao diagnóstico, aos antibióticos utilizados e ao período de tratamento, dessas crianças (Anexo).

Do total de crianças estudadas, 57,6% eram do sexo feminino e 42,4% do masculino. A idade dessas crianças variou de 1 a 14 anos, sendo dividida em dois grupos: lactentes com até dois anos e não-lactentes, acima de dois anos. Dos 63 pacientes do estudo da microbiota intestinal, 36 (57,1%) eram do sexo feminino e 27 (42,9%) do sexo masculino, sendo que 30 (47,6%) receberam o leite fermentado e 33 (52,4%) receberam o placebo.

Do total de 63 pacientes do estudo da microbiota intestinal, 23 (36,5%) crianças eram lactentes e 40 (63,5%) eram não-lactentes, cujas idades variaram de 3 a 14 anos. Das 23 crianças lactentes, 10 (43,5%) receberam o LF e 13 (56,5%) o placebo, enquanto que no grupo de crianças não lactentes, 20 (50%) crianças receberam o LF e 20 (50%) o placebo.

Dentre as 63 crianças do estudo, 34 (54%) apresentaram diagnóstico de doenças respiratórias e 29 (46%) de doenças não-respiratórias. No grupo de crianças com o diagnóstico de doença respiratória, 15 (44,1%) ingeriram o LF e 19 (55,9%) receberam o placebo, enquanto que no grupo de crianças com diagnóstico de doença não-respiratória, 15 (51,7%) crianças receberam o LF e 14 (48,3%) o placebo.

As crianças internadas receberam antibióticos do grupo β -lactâmico da categoria cefalosporinas (12,7%), penicilinas (79,4%) ou cefalosporinas e penicilinas (7,9%), durante o período do tratamento. O período médio de tratamento antibiótico dessas crianças foi de 12 ($\pm 2,0$) dias. Vinte e duas (34,9%) crianças receberam tratamento antibiótico por um período de até 10 dias, sendo que 13 (59,1%) ingeriram o LF e 9 (40,9%) o placebo, enquanto que 41 (65,1%) foram tratadas por um período maior que 10 dias e 17 (41,5%) crianças ingeriram o LF e 24 (58,5%) o placebo.

5. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas especial atenção tem sido dada à pesquisa de certos microrganismos em função dos efeitos benéficos sobre a manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal do hospedeiro, os denominados probióticos. Trata-se do estudo de microrganismos vivos, que estão sendo atualmente empregados como suplemento alimentar para indivíduos sadios, dado seu valor nutricional intrínseco, e como terapêutica para várias patologias humanas, particularmente do trato intestinal.

Normalmente a população de microrganismos do ecossistema intestinal do ser humano mantém-se em equilíbrio, porém este equilíbrio pode ser afetado devido a vários fatores, entre os quais o uso de antibióticos. A administração oral de antimicrobianos, além de destruir o agente infeccioso, pode também alterar a microbiota intestinal, promovendo o aumento da população de microrganismos potencialmente patogênicos.

Relatos de estudos na literatura com adultos hospitalizados sob terapia antimicrobiana recebendo probióticos, como *Lactobacillus* sp, são freqüentes, porém os estudos em população infantil são ainda muito escassos. As poucas citações encontradas no rastreo da literatura científica nacional e internacional dos últimos 15 anos resumiram-se em quatro estudos, randomizados, duplo-cegos e controlados, realizados com crianças sob terapia antimicrobiana (TANKANOW *et al.*, 1990; ARVOLA, *et al.*, 1999; VANDERHOOF *et al.*, 1999; HATAKKA, *et al.*, 2001). Estes trabalhos relacionam-se mais à área clínica do que a análise microbiológica.

Assim, o principal objetivo do presente trabalho foi o de estudar o efeito do leite fermentado contendo *Lactobacillus casei* Shirota na recuperação ou no reequilíbrio da microbiota intestinal de crianças sob terapia antimicrobiana.

Para tanto, este estudo foi dividido em três etapas. Inicialmente foi realizada uma avaliação da microbiota intestinal do grupo de crianças sadias, por meio da análise laboratorial das amostras fecais. As crianças sadias que apresentavam menos que dois anos de idade foram reunidas no

grupo de lactentes e as maiores de 2 anos, no grupo de não-lactentes. Na segunda etapa partiu-se para a avaliação da microbiota intestinal do grupo de crianças diagnosticadas clinicamente como portadoras de algum tipo de infecção, e que necessitavam de terapia antimicrobiana. Este grupo foi dividido ainda em dois subgrupos: um fazendo uso do leite fermentado por *Lactobacillus casei* Shirota e outro, do placebo. Na terceira etapa realizou-se a correlação entre a microbiota intestinal encontrada no grupo de crianças sob terapia antimicrobiana com a do grupo de crianças saudáveis.

Sabendo-se que existe o efeito do *L. casei* Shirota na manutenção da composição e fisiologia da microbiota intestinal, e considerando-se que existem vários fatores relacionados ao hospedeiro, aos microrganismos e ao ambiente onde vivem, procurou-se selecionar como controle deste estudo crianças saudáveis frequentadoras de creche, que apresentavam faixa etária e condições de higiene semelhantes às dos pacientes que estavam sob tratamento antibiótico (Tabela 10 e Figura 8). Na avaliação da contagem bacteriana da microbiota intestinal aeróbia de crianças lactentes, verificou-se que a contagem média encontrava-se significativamente maior em relação ao grupo de não-lactentes, quanto às seguintes bactérias: *E. coli* ($p < 0,05$), *Streptococcus* sp ($p < 0,05$), *Enterococcus* sp ($p < 0,05$) e *Staphylococcus* sp ($p < 0,05$). Em relação à população de bactérias anaeróbia também foi encontrada contagem significativamente maior de *Bifidobacterium* sp ($p < 0,05$) e *Bacteroides* sp ($p < 0,05$).

Estes achados foram bastante próximos dos encontrados por MUTAI e TANAKA (1987). Estes autores estudaram a microbiota de crianças saudáveis e observaram, também, um aumento significativo de microrganismos aeróbios e anaeróbios, e um predomínio de *Bifidobacterium* sp, principalmente nos lactentes que receberam amamentação materna exclusiva. Porém, notaram que a microbiota de crianças amamentadas com leite formulado foi mais homogênea, sendo encontrado *Bacteroides* sp, *Enterobacteriaceae* e *Enterococcus* sp na mesma proporção de *Bifidobacterium* sp.

O fato dos lactentes sadios do presente estudo apresentarem contagem aumentada de *Streptococcus* sp ($p<0,05$) e *Enterococcus* sp ($p<0,05$) deveu-se, possivelmente, à substituição precoce da amamentação materna por leite formulado complementado com dieta pastosa.

O aumento na contagem de *Bifidobacterium* sp é considerado como um fator positivo para a saúde do hospedeiro sendo, em geral, um dos pontos relevantes observados na maioria das literaturas consultadas. Esta teoria teve origem no Japão na década de 70 (MITSUOKA, 1997b) e está baseada nas observações de que a contagem de *Bifidobacterium* sp era maior em crianças que recebiam leite materno do que em crianças amamentadas com leite formulado. Muitos aspectos positivos têm sido atribuídos a esta bactéria. Postula-se que os metabólitos ou os próprios componentes celulares de *Bifidobacterium* sp atuem na produção de citocinas, como interleucina-4, e que aumentam a imunidade do hospedeiro (SETOYAMA *et al.*, 2003). Por outro lado, não foi provado que indivíduos portadores de menor quantidade dessa bactéria fossem menos saudáveis ou que apresentassem mais problemas intestinais (HARTEMINK, 1999). O presente estudo mostrou que a contagem de *Bifidobacterium* sp foi alta, predominando na microbiota intestinal tanto de lactentes como de não-lactentes. A contagem individual de todos os microrganismos estudados encontra-se dentro da faixa de variação descrita na literatura (MATA *et al.*, 1969; MALLORY *et al.*, 1973; HILL & DRASAR, 1975; BROWN, 1977).

Dentre as 109 crianças submetidas à terapia antimicrobiana, selecionadas na Enfermaria da Pediatria do Hospital Universitário, foram aproveitadas para este estudo apenas 63 (57,8%), perdendo-se praticamente a metade. Vários fatores concorreram para esta exclusão (Figura 9). As razões mais importantes deveram-se à falta de interesse em completar a coleta das amostras após o recebimento da alta hospitalar (66%), à mudança de classe do antimicrobiano durante o período de internação (15%), e à não observância dos critérios de inclusão previamente estabelecidos (13%).

Assim, uma vez conhecido o padrão qualitativo e quantitativo dos microrganismos encontrados na microbiota fecal de crianças saudáveis da população, iniciou-se o estudo da microbiota intestinal das crianças sob tratamento com antibióticos β -lactâmicos, dentro dos critérios de randomização e duplo-cego controlado. Dessa forma, constituiu-se o grupo de crianças sob tratamento antimicrobiano, composto por crianças que receberam o leite fermentado (LF) por *L. casei* Shirota e o grupo formado por aquelas que receberam o placebo.

As crianças selecionadas para o estudo foram clinicamente avaliadas ao serem admitidas para internação, durante a sua permanência no hospital e no momento da alta. Mesmo antes de finalizar o tratamento antimicrobiano, a maioria das crianças recebeu alta hospitalar e, dessa forma, para que o estudo tivesse continuidade, os pais receberam informações e instruções de coleta das amostras de fezes para que pudessem completar o estudo. Durante este período os pais informavam sobre quaisquer problemas ou sintomas que pudessem ter ocorrido.

Passou-se, assim, a estudar a microbiota fecal das 63 crianças internadas, sob ação de antibióticos, nos três períodos de coleta: **antes**, **durante** e **depois** da suplementação com o LF ou o placebo. Uma das características deste grupo era de que muitas das crianças já haviam iniciado a terapia antimicrobiana com até no máximo três dias antes de se coletar a primeira amostra. Portanto, a microbiota encontrada na primeira amostra fecal já estaria sob ação de antimicrobianos. A Tabela 12 e a Figura 10 representam a contagem média de microrganismos pertencentes aos grupos de crianças que receberam o LF ou o placebo. Verifica-se que a contagem média de aeróbios totais, durante todo o período de antibioticoterapia, foi constante para o grupo LF, enquanto que para o grupo placebo ocorreu uma diminuição dos mesmos, porém esta diferença não foi significativa. A contagem média de anaeróbios também mostrou ser não significativa para os dois grupos analisados.

Porém, na análise específica de alguns microrganismos do grupo placebo, observa-se, na Figura 10, que, nas amostras colhidas no final do

tratamento antibiótico, 12,1% dos pacientes deste subgrupo mostravam a contagem aumentada de *P. aeruginosa* ($p<0,05$) e 24,2% de *Clostridium* sp ($p<0,05$). Ao final do tratamento antibiótico, esta taxa de colonização por estes microrganismos aumentou para 33,4% e 27,3%, respectivamente. No grupo que recebeu o LF, 3,34% e 16,7% das crianças tiveram também cultura positiva para a população de *P. aeruginosa* e *Clostridium* sp na primeira coleta, sendo que no final da terapia antimicrobiana houve uma estabilização ou diminuição para 3,34% e 13,3% na contagem das mesmas.

O aumento na contagem dessas bactérias, principalmente na última amostra, colhida durante a administração do antibiótico, vem ao encontro das observações de KELLY e LAMONT (1993) onde estes microrganismos foram detectados com frequência em pacientes com terapia antibiótica prolongada.

Considerando-se os três períodos de coleta: **antes, durante e depois** da ingestão de LF e placebo, foi avaliada a variação média de microrganismos entre esses períodos. Os resultados das amostras colhidas durante a suplementação pelo leite fermentado foram representados pelo cálculo da média das contagens bacterianas em cada período.

Assim, a diferença entre a contagem bacteriana obtida na coleta **antes** e **durante** a ingestão do LF ou placebo indica a variação média ocorrida durante a administração do leite fermentado contendo *L. casei* Shirota. A diferença entre as contagens bacterianas obtidas nas coletas **durante** e **depois** avalia a variação média ocorrida após o tratamento antibiótico, e a diferença entre as contagens bacterianas obtidas das coletas **antes** e **depois** avalia a recuperação do equilíbrio da microbiota. A variação positiva indica que houve um aumento e a negativa que diminuiu a contagem média de microrganismos.

SUTTER *et al.* (1974) empregam como critério de interpretação a diferença de 2 logaritmos, entre a contagem média de um determinado microrganismo, quando se deseja verificar se houve ou não alguma alteração após a terapia antibiótica.

Se levado em conta este critério, na avaliação do período **antes** e **durante** a ingestão do LF (Tabela 13), o antimicrobiano parece ter causado pouca alteração na microbiota, obtendo-se apenas uma variação de 0,5 log, tanto para a população de bactéria aeróbia como anaeróbia. O grupo que recebeu o LF apresentou um aumento na contagem média de *Lactobacillus* total (+2,1 log), por conta da ingestão contínua do LF contendo *L. casei* Shirota (+4,4 log) durante este período.

Para avaliar o efeito do antimicrobiano sobre a microbiota normal foi realizada uma comparação entre as amostras de crianças saudáveis e a primeira amostra das crianças doentes (Tabela 14). Nota-se que a microbiota aeróbia ($p < 0,05$) nas crianças sob tratamento antibiótico foi a mais alterada, principalmente pelo aumento de *E. coli* ($p < 0,05$) e diminuição de *Streptococcus* sp ($p < 0,05$). Apesar da microbiota anaeróbia como um todo não ter apresentado alterações, *Bifidobacterium* sp ($p < 0,05$) apresentou contagem diminuída. Tais alterações da microbiota também foram encontradas nos estudos de HEIMDAHL e NORD (1979); EDLUND *et al.* (1994), EDLUND *et al.* (1997), BENNET *et al.* (2002) e PALABIYIKOGLU *et al.* (2000), em estudos semelhantes.

Inúmeros trabalhos publicados (HEIMDAHL & NORD, 1979; EDLUND *et al.*, 1994; EDLUND *et al.*, 1997; BENNET *et al.*, 2000; PALABIYIKOGLU, *et al.*, 2000) apresentam resultados relativos à alteração da microbiota com antibioticoterapia que reforçam os achados do presente trabalho. A microbiota aeróbia em geral é a mais alterada, especialmente de *E. coli*, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp, *Streptococcus* sp, *Enterococcus* sp, *Staphylococcus* sp e leveduras. Pode-se ocorrer ainda variações na microbiota anaeróbia, principalmente de *Bacteroides* sp, *Fusobacterium* sp, *Veillonella* sp, *Bifidobacterium* sp, *Clostridium* sp e *Lactobacillus* sp.

Assim, para os antibióticos β -lactâmicos, como os pertencentes ao grupo das penicilinas, BENNET *et al.* (2002) observaram que em 9 crianças tratadas com amoxicilina e duas com pivampicilina, a contagem média de *E. coli* foi menor em relação às outras enterobactérias, como *Klebsiella* sp. No entanto, quando tratadas com fenoximetilpenicilina, a microbiota fecal

daquelas crianças não apresentou variação na contagem de microrganismos.

A administração oral de 500 mg de amoxicilina por 7 dias em 10 adultos saudáveis, em estudo de EDLUND *et al.* (1994), mostrou que ocorreu o desequilíbrio da microbiota intestinal pela elevada colonização por enterobactérias resistentes, durante o período de tratamento. Esta resistência ocorreu em cerca de 30% a 50% dos adultos saudáveis, possivelmente devido à produção de enzimas β -lactamases pela microbiota intestinal normal (LEVY *et al.*, 1988).

Embora as cefalosporinas pertençam à mesma classe dos antibióticos β -lactâmicos, sua ação altera a microbiota intestinal de forma diferente à de amoxicilina, principalmente pelo aumento de *Enterococcus* sp, *Staphylococcus* sp e leveduras (EDLUND & NORD, 1991; CHACHATY *et al.*, 1992). Além desses microrganismos, CHACHATY *et al.* (1993) mostraram que também ocorre um aumento da colonização por *Clostridium difficile*.

Alguns autores (EDLUND & NORD, 1991; EDLUND *et al.*, 1994; BENNET *et al.*, 2002) verificaram que a administração oral de antibióticos β -lactâmicos mostrou moderado distúrbio do ecossistema intestinal aeróbio das crianças, e que a produção de enzimas β -lactamases pela microbiota intestinal é, provavelmente, uma vantagem do ponto de vista ecológico, uma vez que ajuda a preservar a resistência à colonização, protegendo, assim, contra a invasão de microrganismos patogênicos.

Na avaliação da microbiota no período **durante e depois** da ingestão do LF, na qual é verificada a variação ocorrida na microbiota após o tratamento antibiótico, medida pela diferença entre as contagens bacterianas obtidas (Tabela 13), observa-se que a população média de microrganismos dos grupos LF e placebo, tanto da população aeróbia como da anaeróbia total, apresentou variações discretas não significativas, com valores menores que 0,8 log. Porém, na análise individual, o grupo LF apresentou um aumento significativo de *Staphylococcus* sp ($p < 0,05$), *Clostridium* sp ($p < 0,05$) e diminuição de *L. casei* Shirota ($p < 0,05$). Já o grupo placebo apresentou diminuição apenas de *E. coli* ($p < 0,05$) durante o mesmo período.

Os resultados do presente trabalho mostraram que tanto *Staphylococcus* sp quanto *Clostridium* sp mantiveram uma contagem média baixa durante a ingestão do leite fermentado, mas com a suspensão do consumo esta contagem aumentou, voltando aos níveis basais, daí os resultados tornarem-se significativos. Fato comprovado pelo resultado não significativo observado entre a contagem média destes microrganismos em crianças sob terapia antibiótica com as sadias (Tabela 13).

Apesar de SHIROTA *et al.* (1966) terem observado que a ingestão de *L. casei* não alterou a população de *Staphylococcus* sp; HANADA *et al.* (1956) e OHTA (1972) relataram que ocorreu uma diminuição dessas bactérias e que estas tendem a retornar a níveis basais após a suspensão da ingestão.

A diminuição da contagem média de *L. casei* Shirota no grupo que recebeu o LF deveu-se à interrupção da ingestão do leite para a obtenção da última amostra.

SHIROTA e colaboradores (1966), assim como HANADA *et al.* (1956), já haviam observado que, quando há suspensão da ingestão de *L. casei* Shirota, estes tendem a se tornar indetectáveis nas amostras fecais.

Na avaliação geral deste estudo a variação ocorrida durante todo o período, **antes** e **depois** de receber o LF, não mostrou diferenças significativas, na microbiota aeróbia e anaeróbia do grupo LF. Porém, no mesmo período, detectou-se um aumento na contagem de *Lactobacillus* sp ($p<0,05$), *L. casei* Shirota ($p<0,05$) e *Bifidobacterium* sp ($p<0,05$), além da diminuição da contagem média de *E. coli* ($p<0,05$) na sua microbiota. Já no grupo que recebeu o placebo, além da diminuição de *E. coli* ($p<0,05$), também foi observado aumento na contagem de *Streptococcus* sp ($p<0,05$), *Enterococcus* sp ($p<0,05$) e *Bifidobacterium* sp ($p<0,05$).

Portanto, as crianças que receberam o LF não apresentaram alterações significativas na microbiota fecal, mostrando que *L. casei* Shirota parece ter participado de forma positiva no reequilíbrio da microbiota intestinal. Contudo, as alterações significativas encontradas no grupo que recebeu o placebo, indicaram que a microbiota intestinal ainda não havia

atingido o equilíbrio natural, conforme mostra a Tabela 13. Estes dados levam a crer que a ingestão de *L. casei* Shirota pode estar promovendo uma recuperação mais rápida (5 a 7 dias) da microbiota intestinal, corroborando com os estudos de BENNET e NORD (1987) e BENNET *et al.* (2002) que também mostram o reequilíbrio natural da microbiota, sem a interferência do probiótico, que ocorre a partir da segunda semana após o término do tratamento com antimicrobianos.

O mesmo também foi observado por KIKUCHI (1962) quando analisou amostras fecais de pacientes adultos hospitalizados sob tratamento antibiótico e verificou que a administração oral de *L. casei* Shirota diminuiu a contagem média de enterobactérias constatando, porém, que esta voltava a aumentar 2 semanas após a ingestão do probiótico. Por outro lado, OHTA (1972) estudou a microbiota intestinal de 11 adultos, também sob tratamento antibiótico, e verificou que, após a ingestão do probiótico, a contagem média de *L. casei* Shirota aumentava e a de *Staphylococcus* sp diminuía, assim como nos resultados do presente estudo. Porém, neste estudo, foi verificado que a contagem de enterobactérias e de *Enterococcus* sp não havia sofrido alteração.

Nos períodos **antes** e **depois** quase todo *L. casei* Shirota administrado (cerca de 10^8 a 10^9 UFC/mL) foi recuperado (10^5 a 10^9 UFC/g de fezes) das amostras fecais cultivadas. Notou-se ainda que uma semana após o término do período de ingestão de *Lactobacillus* e do antibiótico, ainda era possível recuperá-los em cerca de 10^4 a 10^8 UFC/g de fezes. A contagem média de *Lactobacillus* totais aumentou em 70% durante o período de ingestão do leite fermentado contendo o probiótico, embora este aumento não tenha influenciado na contagem total da microbiota fecal.

Observou-se que durante todo o estudo a microbiota anaeróbia praticamente não sofreu alterações, possivelmente porque pacientes pediátricos freqüentemente fazem uso de agentes β -lactâmicos, especialmente dos antibióticos do grupo das penicilinas (THOMAS *et al.*, 2001). As β -lactamases são enzimas que hidrolisam os antibióticos β -lactâmicos, tais como penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e

carbapenêmicos. Esta produção de enzimas pode ser mediada por plasmídeos ou por cromossomos, tendo como principal papel a resistência da bactéria por agentes β -lactâmicos (NORD & HEDBERG, 1990; NEU, 1992).

Acredita-se que uma das razões da bactéria anaeróbia manter-se como residente no ambiente intestinal seja devido à produção de β -lactamase. Cerca de 3% a 70% do principal microrganismo da microbiota anaeróbia representada por *Bacteroides fragilis* é resistente a estes agentes, devido à produção da enzima cefalosporinase (NEU, 1992), enquanto que outras espécies, como *Bacteroides* sp, *Fusobacterium* sp e *Clostridium* sp, mostraram produzir principalmente penicilinases (NORD & HEDBERG, 1990).

Em relação às funções da microbiota intestinal, sabe-se que o intestino alberga uma grande quantidade de bactérias metabolicamente ativas. O metabolismo bacteriano tem importância significativa na fermentação de carboidratos pelas bactérias anaeróbias e também na produção de ácidos graxos de cadeia curta ou *Short-Chain Fatty Acids* (SCFA). A fermentação é uma reação bioquímica que inclui processos metabólicos anaeróbios, tendo os SCFA como os principais produtos finais. A produção desses ácidos graxos de cadeia curta é uma atividade primária de microrganismos anaeróbios, e a determinação da sua concentração em amostras fecais pode ser empregada como um possível marcador diagnóstico para conferir o desequilíbrio da microbiota intestinal de pacientes sob tratamento antibiótico.

O estabelecimento da produção de ácidos graxos de cadeia curta foi estudado por MIDTVEDT e MIDTVEDT (1992) em fezes de crianças desde o nascimento até 1 ano e 3 meses de idade, sendo determinado que os principais ácidos produzidos foram acético e propiônico, seguidos pelos ácidos valérico e capróico.

O padrão de fermentação, isto é, a composição relativa dos diferentes ácidos orgânicos das fezes, difere entre adultos e recém-nascidos. Porém, aos dois anos de idade a maioria desses ácidos já alcança valores

semelhantes aos encontrados em adultos (LIFSCHITZ, 1995; GUARNER, 2002).

O presente estudo mostra (Tabela 15) que em 28 crianças sadias a proporção de acetato:propionato:butirato foi de 6:15:10, enquanto que para as 42 crianças que estavam sob tratamento antibiótico, foi de 11:6:3, havendo diferenças significativas dessas proporções entre estes ácidos, respectivamente de $p < 0,001$, $p < 0,01$ e $p < 0,01$. No grupo de crianças internadas foram analisadas apenas as amostras de 42 crianças, pois as amostras recebidas foram insuficientes para realizar a extração de ácidos graxos.

Apesar de terem sido encontradas essas diferenças entre as proporções dos ácidos orgânicos, LIFSCHITZ (1995) encontrou a proporção de 89:5:5 em recém-nascidos e 65:18:11 em adultos para acetato:propionato:butirato, sendo esta diferença bastante significativa ($p < 0,001$). Mesmo havendo diferenças significativas, o autor considera que a exposição aos alimentos e a outros leites que não o materno, e também aos antibióticos, parecem não afetar nas concentrações absolutas e relativas dos ácidos orgânicos a não ser nos primeiros meses de vida.

CUMMINGS (1981) relatou em seu estudo que a proporção para acetato:propionato:butirato encontrada em amostras fecais humanas foi de 60:24:16. O autor considera que, desde que a maioria dos ácidos graxos é absorvida no intestino, a concentração medida nas fezes pode não refletir, necessariamente, as encontradas no intestino. Porém, o estudo *in vitro* de MCBURNEY *et al.* (1988), utilizando um sistema que simula a fermentação do intestino humano, mostrou valores similares aos encontrados em amostras fecais (59:20:21).

O presente estudo mostrou que nas 42 crianças sob tratamento antimicrobiano (Tabela 16), a concentração desses ácidos foi semelhante para os pacientes nos grupos LF e placebo; observou-se também que a proporção de ácido acético é maior em relação aos ácidos propiônico e butírico.

Apesar das concentrações de ácidos graxos encontradas para as crianças dos grupos de crianças saudáveis e sob tratamento antimicrobiano apresentarem-se semelhantes (Tabela 15), a proporção de ácido acético ($p < 0,05$) e butírico ($p < 0,05$) foi maior em crianças saudáveis; o mesmo ocorreu para o ácido fórmico ($p < 0,05$) (Tabela 17).

Provavelmente a ausência de diarreia nas crianças sob terapia antimicrobiana seja pela baixa concentração de ácido acético encontrada nas amostras fecais, uma vez que o acetato promove o relaxamento da artéria porta-hepática, mantendo o fluxo de sangue do fígado e do intestino (MORTENSEN & NIELSEN, 1995), além de aumentar o efeito estimulante do propionato e butirato na absorção de cátions no intestino (SCHARRER & LUTZ, 1990), promovendo a absorção de fluidos que previne a diarreia.

Vários estudos também consideram que a administração oral de certos antibióticos reduz as concentrações de SCFA em indivíduos saudáveis (HEIMDAHL & NORD, 1982; HOVERSTAD *et al.*, 1986a; HOVERSTAD *et al.*, 1986b). No entanto, em estudo *in vitro* de EDWARDS *et al.* (1986) com clindamicina, foi observado que a fermentação bacteriana diminuiu e o conteúdo residual de carboidratos encontrava-se aumentado no meio de cultura líquido.

CLAUSEN *et al.* (1991) analisaram amostras fecais de 68 adultos, sendo que 17 deles não receberam antibiótico, considerados como grupo controle do estudo, e que 44 pacientes receberam tratamento antibiótico, com penicilina, pivampicilina, dicloxacilina ou eritromicina, administrados por via oral, e combinação de ampicilina, netilmicina e metronidazol por via intravenosa. Dos pacientes em tratamento antibiótico, 7 apresentaram diarreia associada ao uso de antibióticos, devido à pivampicilina, dicloxacilina, eritromicina e com a combinação de ampicilina e netilmicina. Na comparação das concentrações de SCFA desses pacientes verificou-se que houve uma redução no grupo que desenvolveu a diarreia (22 mM), quando comparado ao grupo controle (60 mM). No entanto, a concentração desses ácidos também diminuiu nos pacientes tratados e que não apresentaram a diarreia. Estes dados justificam a baixa concentração de

SCFA encontrada nas amostras fecais das crianças sob terapia antimicrobiana do presente estudo.

A diminuição da fermentação induzida pelo uso de antibióticos em indivíduos pode levar ao aumento do risco de diarreia associada aos antibióticos, já que a capacidade da microbiota intestinal em fermentar carboidratos não absorvidos está reduzida (LIFSCHITZ, 1995). Nos próximos anos, o papel dos ácidos graxos na nutrição e na saúde intestinal deverá ser melhor definido e esta informação poderá ser útil no desenvolvimento de terapias para o tratamento da população pediátrica.

Outro objetivo deste estudo foi a de correlacionar os parâmetros clínicos e laboratoriais das 63 crianças que estavam sob tratamento antibiótico (Anexo VII).

A microbiota das 27 crianças do sexo feminino que receberam o LF mostrou um aumento significativo tanto de microrganismos aeróbios ($p < 0,05$) como de anaeróbios ($p < 0,05$), não havendo, porém, alteração significativa para microrganismos específicos. Já as 36 crianças do sexo masculino não apresentaram diferenças significativas entre os componentes da microbiota analisados.

Em relação à idade das crianças sob terapia antimicrobiana, 23 lactentes e 40 não-lactentes, há um predomínio de *P. aeruginosa* ($p < 0,05$) em crianças que receberam o placebo, porém, apenas nas amostras colhidas uma semana após a terapia antibiótica. Já nos não-lactentes que receberam o placebo, tanto *P. aeruginosa* ($p < 0,05$) quanto *Clostridium* sp ($p < 0,05$) predominaram nas amostras de fezes durante todo o tratamento antibiótico.

Os parâmetros clínicos propostos neste estudo foram: aspecto e presença de sangue nas fezes, ocorrência de diarreia devido ao uso de antimicrobianos, distensão abdominal, náusea, vômitos ou perda de apetite.

Estas características clínicas foram avaliadas em vários momentos. Durante a internação até o momento da alta hospitalar, as crianças foram submetidas a avaliações clínicas, e após a alta os responsáveis pelas crianças informaram sobre quaisquer problemas ou sintomas ocorridos.

Estima-se que o risco da diarreia associada ao uso de antibióticos varie de 5% a 30%, dependendo do antibiótico administrado, e os β -lactâmicos estão associados com alto risco para o desenvolvimento da doença (BARTLETT, 1992). Trata-se, pois, de uma complicação comum da terapia antibiótica, especialmente em crianças fazendo uso de antimicrobianos de largo espectro (VANDERHOOF *et al.*, 1999). Entre os casos de diarreia associada ao uso de antibióticos, cerca de 10% a 20% são devidos ao bacilo Gram-positivo anaeróbico, *Clostridium difficile*; entretanto, a grande maioria dos casos não tem agente etiológico conhecido (THOMAS *et al.*, 2001).

Em nenhuma criança deste estudo foi observado sintoma de diarreia ou a presença de sangue, assim como distensão abdominal, náusea, vômito ou perda de apetite. Na análise do aspecto das fezes, observou-se, conforme mostra a Tabela 11, que aproximadamente 80% das amostras do grupo de crianças sob terapia antimicrobiana apresentaram aspecto normal e menos que 13% foram consideradas como difusas.

O fato das crianças deste estudo não terem apresentado diarreia deveu-se possivelmente ao período inferior a duas semanas de tratamento antimicrobiano, além do estado da saúde geral dos pacientes estar em condições favoráveis, já que a maioria recebeu alta hospitalar em 3 a 4 dias da internação.

Tradicionalmente, a duração da terapia antibiótica para o tratamento de infecções respiratórias é de 10 dias. Este período está baseado em estudos comprovados para o uso da penicilina no tratamento de tonsilofaringites, sendo estendido para as outras infecções respiratórias (PICHICHERO, 2000).

Considerando-se que as crianças do presente estudo apresentaram predomínio de infecções respiratórias, avaliou-se dois períodos de tratamento: até dez dias e maior que 10 dias de tratamento.

Dessa forma, passou-se à análise comparativa da microbiota fecal de crianças saudáveis com as que estavam sob terapia antimicrobiana e que receberam o LF e o placebo nos dois períodos de tratamento. Nesta

comparação, nas 13 crianças que receberam o LF e tiveram até dez dias de tratamento antibiótico foi observado que, além do aumento de *Lactobacillus* sp ($p<0,05$) ocasionado pela ingestão de *L. casei* Shirota ($p<0,05$), também ocorreu o aumento de *Staphylococcus* sp ($p<0,05$) em relação à microbiota de crianças saudáveis. Na comparação da microbiota de 9 crianças do grupo placebo, observou-se apenas uma diminuição na contagem média de *Streptococcus* sp ($p<0,05$) em relação ao grupo de crianças saudáveis. Neste período a média de tratamento foi de 8,2 ($\pm 0,1$) dias. O único parâmetro encontrado foi o aumento de 1 log de diferença para *Streptococcus* sp quando comparado com as crianças saudáveis, o que poderia justificar algum desequilíbrio.

Em relação ao diagnóstico, se observada a Tabela 20, pode-se notar que houve um aumento de *P. aeruginosa* no grupo de crianças com diagnóstico de doença respiratória e de *Clostridium* sp no grupo de não-respiratória.

A avaliação da microbiota fecal em 17 doentes que receberam o LF e tiveram mais que 10 dias de tratamento antibiótico (Tabela 14) mostrou que o resultado não foi significativo para os microrganismos aeróbios e anaeróbios, com exceção do aumento de *Lactobacillus* sp ($p<0,01$) e *L. casei* Shirota ($p<0,05$). Já no grupo placebo, com 24 crianças, verificou-se aumento na contagem média de *E. coli* ($p<0,05$) e diminuição de *Streptococcus* sp ($p<0,05$) e *Bifidobacterium* sp ($p<0,05$). Neste período a média de tratamento foi de 13,9 (± 3) dias. Embora dados da literatura relatem que em períodos prolongados de tratamento a chance de aumentar o número de microrganismos oportunistas seja maior, este fato não ocorreu neste estudo.

Presume-se que o impacto maior da ação antimicrobiana nos pacientes deste estudo tenha ocorrido no período inicial do tratamento até 10 dias, na qual se verificou maior desequilíbrio da microbiota, o mesmo não acontecendo no período maior que 10 dias de tratamento.

Neste estudo não foi possível estabelecer uma bactéria que constituísse um marcador da recuperação do equilíbrio intestinal, porém

verificou-se que o equilíbrio é medido pela variação positiva ou negativa da população bacteriana no seu conjunto, daí a importância em subdividir o período da ingestão do leite fermentado e do antibiótico para perceber esta diferença sutil, muitas vezes indetectável numa análise global da microbiota.

Muitos dos efeitos benéficos citados na literatura nem sempre são demonstrados com dados laboratoriais, atendo-se mais aos aspectos clínicos como um todo.

O tempo para recuperação e reequilíbrio da microbiota intestinal é muito importante para o rápido estabelecimento da resistência à colonização, não só para impedir a proliferação de microrganismos potencialmente patogênicos, mas também para manter o papel imunomodulador da microbiota do hospedeiro. Essa premissa justifica que pesquisas sobre este campo sejam efetuadas.

Pôde ser observado neste trabalho que na presença de *L. casei* Shirota o reequilíbrio da microbiota intestinal ocorreu num período de 5 a 7 dias após o término do tratamento. Diferente de outros trabalhos que apontaram um período ao redor de 2 semanas para o reequilíbrio da microbiota intestinal em pacientes sem a ação do probiótico (BENNET & NORD 1987; BENNET *et al.*, 2002).

Também foi possível observar que a análise de ácidos graxos de cadeia curta forneceu importantes subsídios para indicar alterações da microbiota. Cabe registrar que *Bifidobacterium* sp provavelmente possa ter contribuído de forma favorável no estado geral da saúde dos pacientes deste estudo, uma vez que esta bactéria, que tem papel imunomodulador, mostrou-se sempre presente em contagens altas na microbiota dos pacientes sob antibioticoterapia.

Pelo exposto, o presente trabalho possibilitou a demonstração de algumas funções desempenhadas por *Lactobacillus casei* Shirota na microbiota intestinal de crianças expostas a antibioticoterapia. Portanto, o crescente interesse neste campo de conhecimento é justificado pelo grande potencial de aplicação de microrganismos vivos em benefício da saúde humana.

6. CONCLUSÕES

- As crianças saudáveis, lactentes e não-lactentes, apresentaram microbiota normal dentro da faixa da população bacteriana esperada na análise qualitativa e quantitativa. As lactentes mostraram aumento na contagem de microrganismos aeróbios e anaeróbios, com predomínio de *Bifidobacterium* sp, em relação às não-lactentes.
- A variação da contagem média de microrganismos aeróbios e anaeróbios do grupo sob tratamento antibiótico, considerando os três períodos estudados, não foi significativa entre as crianças que receberam o leite fermentado ou o placebo.
- Na avaliação do efeito do antimicrobiano entre as crianças doentes, a microbiota aeróbia foi a que mais sofreu alterações, principalmente por *E. coli* e *Streptococcus* sp.
- A microbiota intestinal de crianças sob terapia antibiótica que ingeriram o placebo mostrou um aumento significativo na contagem média de *P. aeruginosa* e *Clostridium* sp. Porém, com a suspensão do tratamento, estes valores diminuíram, retornando aos níveis basais, depois de uma semana.
- A ingestão de *Lactobacillus casei* Shirota parece não ter induzido o aumento da população de *Bifidobacterium* sp, uma vez que as crianças do grupo placebo também apresentaram aumento durante o estudo.
- A concentração de ácidos graxos de cadeia curta presente na amostra fecal de crianças sob tratamento antibiótico apresentou significativa diminuição, mostrando o desequilíbrio da microbiota intestinal em decorrência do efeito do antibiótico.

- No grupo de crianças sob antibioticoterapia, não foi possível estabelecer a correlação entre os parâmetros clínicos e laboratoriais, nem determinar uma bactéria que constituísse um marcador da recuperação do equilíbrio intestinal.
- Cerca de 50% dos pacientes que ingeriram o leite fermentado ainda eliminaram *Lactobacillus casei* Shirota nas fezes mesmo após uma semana da interrupção da administração do produto.

7. RESUMO

O tratamento antimicrobiano pode destruir o equilíbrio da microbiota gastrointestinal, podendo induzir sintomas clínicos, principalmente a diarreia. A influência de *Lactobacillus casei* Shirota sobre a microbiota intestinal foi avaliada em um estudo prospectivo, randomizado, duplo-cego e controlado. Sessenta e três crianças hospitalizadas com idade de 2 a 14 anos, sob tratamento com antibióticos β -lactâmicos, foram randomizadas para receber o leite fermentado por *L. casei* Shirota, 10^{8-9} UFC/mL, ou o placebo, durante o tratamento antimicrobiano. As amostras de fezes foram colhidas antes da administração do leite fermentado, durante o tratamento antibiótico e uma semana após o término do tratamento com o antimicrobiano e a ingestão do leite fermentado. O número de *L. casei* Shirota aumentou significativamente ($p < 0,001$) durante o período de ingestão do leite fermentado. Foi observado na microbiota do grupo que recebeu o placebo um aumento na contagem de *Pseudomonas aeruginosa* ($p < 0,05$) e *Clostridium* sp ($p < 0,05$), principalmente no último período da terapia antimicrobiana. A alteração da microbiota intestinal em decorrência do tratamento antibiótico foi constatada pela diminuição de acetato ($p < 0,05$), butirato ($p < 0,05$) e formato ($p < 0,05$). Embora nenhuma criança deste estudo tenha apresentado diarreia, na avaliação geral, a microbiota daquelas que receberam o leite fermentado mostrou uma recuperação precoce da microbiota intestinal. Foi observado que a variação da contagem bacteriana realizada não foi significativa para as crianças do grupo que recebeu o leite fermentado, enquanto que no grupo placebo a contagem bacteriana ficou alterada, mostrando desequilíbrio da microbiota. Cerca de 50% das crianças ainda apresentaram *L. casei* Shirota nas fezes após uma semana da ingestão do leite fermentado. Este estudo mostrou que a ingestão do leite fermentado contendo *L. casei* Shirota promoveu um reequilíbrio mais rápido da microbiota intestinal quando comparada com a do grupo que ingeriu o placebo.

8. ABSTRACT

Antimicrobial treatment can destroy the balance of gastrointestinal microflora, which may induce clinical symptoms, mainly diarrhoea. The influence of *Lactobacillus casei* Shirota on the intestinal microflora was assessed in a prospective, randomised, double-blind controlled study. Sixty-three hospitalised children, with ages between 2 and 14 years, under treatment with β -lactam antibiotics were randomised to receive milk fermented by *L. casei* Shirota, 10^{8-9} CFU/mL, or placebo during the antimicrobial treatment. Stool samples were collected before the administration of fermented milk, during the antibiotic treatment, and one week after the end of treatment with the antimicrobial agent and the ingestion of fermented milk. The number of *L. casei* Shirota increased significantly ($p<0.05$) during the period in which fermented milk was ingested. An increase in the *Pseudomonas aeruginosa* ($p<0.05$) and *Clostridium* sp ($p<0.05$) count was observed in the microflora of the group that received placebo, mainly in the last period of antimicrobial therapy. The alteration of intestinal microflora as a result of antibiotic treatment was found by the reduction of acetate ($p<0.05$), butyrate ($p<0.05$) and formate ($p<0.05$). The variation in bacterial count proved not to be significant for the children under antimicrobial treatment who received fermented milk, while the placebo group showed imbalance of microflora with the result of the altered bacterial count. About 50% of the children still presented *L. casei* Shirota in their stools after interrupting the ingestion of fermented milk for one week. This study showed that ingestion of fermented milk containing *L. casei* Shirota promoted a much faster re-balance of the intestinal microflora when compared to the group that ingested a placebo.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ-OLMOS, M.I.; OBERHELMAN, R.A. Probiotic agents and diseases: a modern perspective on a traditional therapy. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.32, p.1567-1576, 2001.
- ANDOH, A.; FUJIYAMA, Y.; TAKAYA, H.; SHIMADA, M.; BAMBA, T. Counter-regulatory effect sodium butyrate on tumor necrosis factor-alpha (TNF-a)-induced complement C3 and factor B biosynthesis in human intestinal epithelial cells. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v.118, p.23-29, 1999.
- ARAKI, Y.; ANDOH, A.; FUJIYAMA, Y.; TAKIZAWA, J.; TAKIZAWA, W.; BAMBA, T. Oral administration of a product derived from *Clostridium butyricum* in rats. **Int. J. Mol. Med.**, Athens, v.9, p.53-57, 2002.
- ARVOLA, T.; LAIHO, K.; TORKKELI, S.; MYKKÄNEN, H.; SALEN, S.; MAUNULA, L.; ISOLAURI, E. Prophylactic *Lactobacillus* GG reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections: a randomized study. **Pediatrics**, Elk Grove Village, v.104, 1999.
- BARTLETT, J.G. Antibiotic-associated diarrhea. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.15, p.573-581, 1992.
- BEERENS, H. Detection of Bifidobacteria by using propionic acid as selective agent. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.57, p.2418-2419, 1991.

- BENGMARK, S. Ecological control of the gastrointestinal tract: the role of probiotic flora. **Gut**, London, v.42, p.2-7, 1998.
- BENNET, R.; NORD, C.E. Development of the faecal anaerobic microflora after Caesarean section and treatment with antibiotics in newborn infants. **Infection**, Muenchen, v.15, p.332-336, 1987.
- BENNET, R.; ERIKSSON, M.; NORD, C.E. The fecal microflora of 1-3month-old infants during treatment with eight oral antibiotics. **Infection**, Muenchen, v.30, p.158-160, 2002.
- BENNO, Y. Changes in intestinal flora. In: SPECIAL 20th anniversary edition of healthist. Tokyo: Yakult, 1997. cap.2, p.25-34.
- BETTELHEIM, K.A.; LENNOX-KING, S.M. The acquisition of *Escherichia coli* by newborn babies. **Infection**, Muenchen, v.4, p.174-179, 1976.
- BROWN, J.P.; LAMANNA, C. Role of gut bacterial flora in nutrition and health: a review of recent advances in bacteriological techniques, metabolism, and factors affecting flora composition. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Lauderdale, v.8, n.3, p.229-336, 1977.
- CASTAGLIUOLO, I.; RIEGLER, M.F.; VALENICK, L.; LAMONT, J.T.; POTHOUKAKIS, C. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. **Infect. Immun.**, Washington, v.67, p.302-307, 1999.
- CHACHATY, E.; DEPITRE, C.; MARIO, N.; BOURNEIX, C.; SAULNIER, P.; CORTHIER, G.; Presence of *Clostridium difficile* and antibiotic and beta-lactamase activities in feces of volunteers treated with cefixime, oral cefpodoxime proxetil, or placebo. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.36, p.2009-2013, 1992.

- CHACHATY, E.; BOURNEIX, C.; RENARD, S.; BONNAY, M.; ANDREMONT, A. Shedding of *Clostridium difficile*, fecal β -lactamase activity, and gastrointestinal symptoms in 51 volunteers treated with cefixime. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.37, p.1432-1435, 1993.
- CHEN, W.J.L.; ANDERSON, J.W.; JENNINGS, D. Propionate may mediate the hypocholesterolemic effects of certain soluble plant fibers in cholesterol-fed rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, Malden, v.175, p.215-218, 1984.
- CHONAN, O.; WATANUKI, M. Effect of galactooligosaccharides on calcium absorption in rats. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, Tokyo, v.41, p.95-104, 1995.
- CLAUSEN, M.R.; BONNEN, H.; TVEDE, M.; MORTENSEN, P.B. Colonic fermentation to short-chain fatty acids is decreased in antibiotic-associated diarrhoea. **Gastroenterology**, Orlando, v.101, p.1497-1504, 1991.
- COHENDY, M. Description du ferment lactique puissant capable de s'acclimater dans l'intestine de l'homme. C. R. Soc. Biol., v.60, p.558, 1906. *apud* SHORTT, C. The probiotic century: historical and current perspectives. **Trends Food Sci. Technol.**, Oxford, v.10, p.411-417, 1999.
- CUMMINGS, J.H. Short chain fatty acids in the human colon, **Gut**, London, v.22, p.763-779, 1981.
- CUMMINGS, J.H.; POMARE, E.W.; BRANCH, W.J.; NEYLOR, C.P.E.; MACFARLANE, G.T. Short chain fatty acids in human large intestine,

portal, hepatic and venous blood. **Gut**, London, v.28, p.1221-1227, 1987.

DIGGLE, P.; LIANG, K.; ZEGER, S.L. **Analisis of longitudinal data**. Oxford: Clarendon Press; New York: Oxford University Press, 1994. 324p.

DUCLUZEAU, R. Role of experimental ecology in gastroenterology. In: BERGONE-BEREZIN, E., ed. **Microbial ecology and intestinal infectious**. Paris: Springer, 1989. p.1-5.

DUCLUZEAU, R.; RAIBAUD, P. **Ecologie microbienne du tube digestif**. Paris: Masson, 1979. p.1996.

EDLUND, C.; NORD, C.E. A model of bacterial-antimicrobial interactions: the case of oropharyngeal and gastrointestinal microflora. **J. Chemother.**, Firenze, v.3, suppl.1, p.196-200, 1991.

EDLUND, C.; STARK, C.; NORD, C.E. The relationship between an increase in β -lactamase activity after oral administration of three new cephalosporins and protection against intestinal ecological disturbances. **J. Antimicrob. Chem.**, Oxford, v.34, p.127-138, 1994.

EDLUND, C.; SJÖSTEDT, S.; NORD, C.E. Comparative effects of levofloxacin and ofloxacin on the normal oral and intestinal microflora. **Scand. J. Infect. Dis.**, Basingstoke, v.29, p.383-386, 1997

EDWARDS, C.A.; DUERDEN, B.I.; READ, N.W. The effect of clindamycin on the ability of a continuous culture of colonic bacteria to ferment carbohydrate. **Gut**, London, v.27, p.411-417, 1986.

- ELMER, G.W. Probiotics: living drugs. **Am. J. Health-Syst. Pharm.**, Bethesda, v.58, p.1101-1109, 2001.
- ELMER, G.W.; SURAWICZ, C.M.; MCFARLAND, L.V. Biotherapeutic agents. a neglected modality of the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.275, p.870-876, 1996.
- FULLER, R., ed. **Probiotics 2**: applications and practical aspects. London: Chapman & Hall, 1997, 212p.
- FULLER. R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.66, p.365-378, 1989.
- 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.
- GOLDIN, B.R.; GORBACH, S.L.; SAXELIN, M.; BARAKAT, S.; GUALTIERI, L.; SALMINEN, S. Survival of Lactobacillus species (strain GG) in human gastrointestinal tract. **Dig. Dis. Sci.**, Dordrecht, v.37, p.121-128, 1992.
- GORDON, D.; MACRAE, I.; WHEATER, D. A lactobacillus preparation for use with antibiotics. **Lancet**, London, p.899-901, 1957.
- GOTZ, V.; ROMANKIEWCZ, J.A.; MOSS, J.; MURRAY, H.W. Prophylaxis against ampicillin-associated diarrhea with a lactobacillus preparation. **Am. J. Hosp. Pharm.**, Washington, v.36, p.754-757, 1979.

- GUANDALINI, S.; PENSABENE, L.; ZIKRI, M.A.; DIAS, J.A.; CASALI, L.G.; HOEKSTRA, H.; KOLACEK, S.; MASSAR, K.; MICETIC-TURK, D.; PAPADOPOULOU, A.; SOUSA, J.S.; SANDHER, B.; SZAJEWSKA, H.; WEIZMAN Z. Lactobacillus GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, Hagerstown, v.20, p.54-60, 2000.
- GUARNER, F. The colon as an organ: habitat of bacterial flora. **Nutr. Hosp.**, Madrid, v.17, suppl.2, p.7-10, 2002.
- HAMILTON-MILLER, J. M.T.; SHAH, S.; SMITH, C.T. Probiotic remedies are not what they seem. **Br. Med. J.**, London, v.312, p.55-56, 1996.
- HANADA, K.; KONDO, F.; KITAHARA, R.; TOKUSHIGE, H.; UENO, T.; KUTANI, T.; OCHIAI, K. Effect of daily administration of *Lactobacillus* fermented milk on children: J. Kobe Institute of Health, p.55-60, 1956. *apud* YAKULT CENTRAL INSTITUTE FOR MICROBIOLOGICAL RESEARCH, ed. **Lactobacillus casei strain Shirota**: intestinal flora and human health. Tokyo: Yakult Honsha, 1999. 290p. (Special edition marking the centenary of birth of Dr. Minoru Shirota).
- HANSEN, P.A.; MOQUOT, G. Lactobacillus acidophilus. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v.20, p.325-327, 1970.
- HARTEMINK, H. Prebiotics effects of non-digestible olig-and polysaccharides. **Ponsen & Looijen**, Wageningen, 1999, p.205.
- HATAKKA, K.; SAVILAHTI, E.; PÖNKÄ, A.; MEURMAN, J.H.; POUSSA, T.; NÄSE, L.; SAXELIN, M.; KORPELA, R. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. **BMJ.**, v.322, p.1-5, 2001.

- HEIMDAHL, A.; NORD, C.E. Effect of phenoxymethylpenicillin and clindamycin on the oral throat and faecal microflora of man. **Scand. J. Infect. Dis.**, Basingstoke, v.11, p.233-242, 1979.
- HILL, M.J.; DRASAR, B.S. The normal colonic bacterial flora. **Gut**, London, v.16, p.318-323, 1975
- HILTON, E.; KOLAKWSKI, P.; SINGER, C, SMITH, M. Efficacy of Lactobacillus GG as a diarrheal preventive in travelers. **J. Travel Med.**, Hamilton, v.4, p.41-43, 1997.
- HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Overview of gut flora and probiotics. **Int. J. Food Microbiol.**, Oxford, v.41, p.85-101, 1998.
- HOVERSTAD, T.; CARLSTEDT-DUKE, B.; LINGAAS, E.; MIDTVEDT, T.; NORIN, K.E.; SAXERHOLT, H.; STEINBAKK, M. Influence of ampicillin, clindamycin, and metronidazole on faecal excretion of short-chain fatty acids in health subjects. **Scand. J. Gastroenterol.**, Basingstoke, v.21, p.621-626, 1986a.
- HOVERSTAD, T.; CARLSTEDT-DUKE, B.; LINGAAS, E.; NORIN, K.E.; SAXERHOLT, H.; STEINBAKK, M.; MIDTVEDT, T. Influence of oral intake of seven different antibiotics on faecal short-chain fatty acid excretion in health subjects. **Scand. J. Gastroenterol.**, Basingstoke, v.21, p.997-1003, 1986b.
- ILLMAN, R.J.; TOPPING, D.L.; MCINTOSH, G.H.; TRIMBLE, R.P.; STORER, G.B.; TAYLOR, M.N.; CHENG, B.Q. Hypocholesterolaemic effects of dietary propionate: studies in whole animals and perfused rat liver. **Ann. Nutr. Metab.**, Basel, v.32, p.97-107, 1988.

- ISOLAURI, E.; JUNTUNEN, M.; RAUTANEN, T.; SILLANAUKEE, P.; KOIVULA, T. A human Lactobacillus strain (Lactobacillus casei sp. strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. **Pediatrics**, Elk Grove Village, v.88, p.90-97, 1991.
- KADOTA, M. Genetics of lactic acid bacteria: Basic research and its application. **Biseibutsu**, Tokyo, v.6, p.35-43, 1990.
- KAILA, M.; ISOLAURI, E.; SOPPI, E.; VIRTANEN, E.; LAINE, S.; ARVILOMMI, H. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human Lactobacillus strain. **Pediatr. Res.**, Baltimore, v.32, p.141-144, 1992.
- KAILASAPATHY, K.; CHIN, J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium spp. **Immunol. Cell Biol.**, Carlton, v.78, p.80-88, 2000.
- KELLY, C.P.; LAMONT, J.T. Treatment of Clostridium difficile diarrhea and colitis. In: WOLFE, M.W., ed. **Gastrointestinal pharmacotherapy**. Philadelphia: W.B. SAUNDERS, 1993. p.199-212.
- KIKUCHI, K.; Changes of the number of bacilli and lactobacilli in human stools by peroral administration of Yakult: Teishin Igaku, v.14, p.65-66, 1962. YAKULT CENTRAL INSTITUTE FOR MICROBIOLOGICAL RESEARCH, ed. **Lactobacillus casei strain Shirota**: intestinal flora and human health. Tokyo: Yakult Honsha, 1999. 290p. (Special edition marking the centenary of birth of Dr. Minoru Shirota).
- KÖHLER, G., MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. v.256, p.495-497, 1975.

- KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylatic and therapeutic uses of probiotics: a review. **J. Am. Diet. Assoc.** Chicago, v.101, n.2, p.229-238, 2001.
- KRIPKE, S.A.; FOX, A.D.; BERMAN, J.M.; SETTLE, R.G.; ROMBEAU, J.L. Stimulation of intestinal mucosal growth and intracolonic infusion of short chain fatty acids. **JPEN, J. Parenter. Enteral Nutr.**, Silver Spring, v.13, p.109-116, 1989.
- KRUIS, W.; SHUTZ, E.; FRIC, P.; FIXA, B.; JUDMAIER, G.; STOLTE, M. Double-blind comparison of an oral Escherichia coli preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, Oxford, v.11, p.853-858, 1997.
- KVASNIKOV, E.; GRIGOROV, I.; KOVALENKO, N. K.; MEDOVAR, B.; SHISHLEVSKAIA, T.; PALEKHA, S.; KOZLOVSKAIA, S.M. Lactobacillus in the digestive tract and food of long-lived persons in Abkhazia. **Mikrobiol. Zh.**, Kiev, v.46, p.11-18, 1984.
- LEVY, J. The effects of antibiotic use on gastrointestinal function. **Am. J. Gastroenterol.**, New York, v.95, suppl, p.S8-S10, 2000.
- LEVY, S.B.; MARSHALL, B.; SCHLUEDERBERG, S.; ROWSE, D.; DAVIS, J. High frequency of antimicrobial resistance in human fecal flora. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.32, p.1801-1806, 1988.
- LIFSCHITZ, C.H. Colonic short-chain fatty acids in infants and children. In: CUMMINGS, J.H.; ROMBEAU, J.L.; SAKATA, T., eds. **Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p.525-535.

- LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, Washington, v.147, p.747-748, 1965.
- MACFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. The colonic flora, fermentation, and large bowel function. In: PHILIPS, S.F.; PEMBERTON, J.H.; SHORTER, R.G., eds. **The large intestine: physiology, pathophysiology, and disease**. New York: Raven Press, 1991. p.52-92.
- MAGALHÃES, M.N.; LIMA, A.C.P. **Noções de probabilidade e estatística**. 4.ed. São Paulo: EDUSP, 2002. 416p.
- MAJAMAA, H.; ISOLAURI, E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. **J. Allergy Clin. Immunol.**, Saint Louis, v.99, p.179-185, 1997.
- MALIA, M.; SUOMALAINEN, H.; SAXELIN, M.; ISOLAURI, E. Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with Lactobacillus GG. **Ann. Nutr. Metab.**, Basel, v.40, p.137-145, 1996.
- MALLORY, A.; SAVAGE, D.; KERN, F.; SMITH, J.G. Patterns of bile acids and microflora in the human small intestine. **Gastroenterology**, Orlando, v.64, p.34, 1973.
- MARTEAU, P.; FLOURIE, B.; POCHART, P.; CHASTANG, C.; DESJEUX, J.F.; RAMBAUD, J.C. Effect of the microbial lactase (EC3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an *In vivo* study in lactase-deficient humans. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.64, p.71-79, 1990.

- MARTEAU, P.R.; DE VRESE, M.; CELLIER, C.J.; SCHREZENMEIER, J.
Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.73, suppl., p.430S-436S, 2001.
- MATA, L.J.; CARRILLO, C.; VILLATORO, E. Fecal microflora in healthy persons in a preindustrial region. **Appl. Microbiol.**, Baltimore, v.17, p.596, 1969.
- MATTILA-SANDHOLM, T.; MATTO, J.; SAARELA, M. Lactic acid bacteria with health claims - interactions and interference with gastrointestinal flora. **Int. Dairy J.**, Oxford, v.9, p.25-35, 1999.
- MCBURNEY, M.I.; THOMPSON, L.U.; CUFF, D.J.; JENKINS, D.J.A.
Comparison of ileal effluents, dietary fibers, and whole foods in predicting the physiologic importance of colonic fermentation. **Am. J. Gastroenterol.**, New York, v.83, p.536-540, 1988.
- MACFARLANE, G.T.; GIBSON, G.R. Microbiological aspects of the production of short-chain fatty acids in the large bowel. In: CUMMINGS, J.H.; ROMBEAU, J.L.; SAKATA, T., eds. **Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p.87-105.
- METCHNIKOFF, E. Prolongation of life: optimistic studies. London: William Heinemann, 1907. *apud* NAIDU, A.S.; BIDLAK, W.R.; CLEMENS, R.A.
Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB) In: CLYDESDALE, F.M.
Crit. Rev. Food Sci. Nutr., Basel, v.39, p.13-126, 1999.
- MIDTVEDT, A.C.; MIDTVEDT, T. Production of short chain fatty acids by the intestinal microflora during the first 2 years of human life. **J. Ped. Gastroenterol. Nut.**, v.15, p.395-403, 1992.

- MITSUOKA, T. Recent trends in research on intestinal flora. **Bifidobact. Microflora**, Tokyo, v.1, p.3-24, 1982.
- MITSUOKA, T. The intestinal flora and its important relationship with health. In: SPECIAL 20th anniversary edition of healthist. Tokyo: Yakult, 1997a. cap.1, p.2-12.
- MITSUOKA, T. History and future prospects of intestinal flora research. In: SPECIAL 20th anniversary edition of healthist. Tokyo: Yakult, 1997b. cap.1, p.13-17.
- MITSUOKA, T.; HAYAWAKAWA, K. The fecal flora of man. I. Communication: the composition of fecal flora of different age groups. **Zentralb. Bakt. Hyg.**, v.223, p.333-342, 1972.
- MORO, E. Über den *Bacillus acidophilus* n. spec. Ein Beitrag zur Kenntnis der normalen Darmbakterien des Säuglings. **Jahrb. Kinderheilkd.**, Basel, v.52, p.38-55, 1900.
- MORTENSEN, P.B.; CLAUSEN, M.R. Short chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. **Scand. J. Gastroenterol.**, Basingstoke, v.216, suppl., p.132-148, 1996.
- MORTENSEN, F.V.; NIELSEN, H. *In vivo* and *in vitro* effects of short-chain fatty acids intestinal blood circulation. In: CUMMINGS, J.H.; ROMBEAU, J.L.; SAKATA, T., eds. **Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p.391-400.
- MUTAI, M.; TANAKA, R. Ecology of *Bifidobacterium* in the human intestinal flora. **Bifidobact. Microflora**, Tokyo, v.6, p.33-41, 1987.

- NAIDU, A.S.; BIDLAK, W.R.; CLEMENS, R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB) in: CLYDESDALE, F.M. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Basel, v.39, p.13-126, 1999.
- NETER, J.; KUTNER, M.H.; NACHTSHEIN, C.J.; WASSERMAN, W. **Applied linear statistical models**. Chicago: Irwin, 1996, 1408p.
- NEU, H.C. The crisis in antibiotic resistance. **Science**, Washington, v.257, p.1067-1072, 1992.
- NORD, C.E.; HEDBERG, M. Resistance to β -lactam antibiotics to anaerobic bacteria. **Rev. Infect. Dis.**, v.12, suppl., p.231S-234S, 1990.
- OHTA, Z.; Effect of a *Lactobacillus* preparation on the abdominal symptoms associated with SMON: Changes in symptoms, intestinal flora, and fecal short-chain fatty acids. *Jpn Med J*, v.2514, p.25-34, 1972. YAKULT CENTRAL INSTITUTE FOR MICROBIOLOGICAL RESEARCH, ed. **Lactobacillus casei strain Shirota**: intestinal flora and human health. Tokyo: Yakult Honsha, 1999. 290p. (Special edition marking the centenary of birth of Dr. Minoru Shirota).
- OKSANEN, P.J.; SALMINEN, S.; SAXELIN, M.; HAMALAINEN, P.; IHANTOLA-VORMISTO, A.; MUURASNIEMI-ISOVIIITA, L.; NIKKARI, S.; OKSANEN, T.; PORSTI, I.; SALMINEN, E. Prevention of travelers diarrhea by *Lactobacillus* GG. **Ann. Med.**, London, v.22, p.53-56, 1990.
- ORRHAGE, K.; BRISMAR, B.; NORD, C.E. Effect of supplements with *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal microbiota during administration of clindamycin. **Microb. Ecol. Health Dis.**, Cambridge, v.7, p.17-25, 1994.

- ORRHAGE, K.; SJOSTEDT, S.; NORD, C.E. Effect of supplements with lactic acid bacteria and oligofructose on the intestinal microflora during administration of cefpodoxime proxetil. **J. Antimicrob. Chemother.**, Oxford, v.46, p.603-611, 2000.
- PALABIYIKOGLU, I.; KEVEN, K.; BENGISUN, J.S.; NERGISOGLU, G.; ATES, K.; KARATAN, O.; ERTUG, E. Comparison of the effects of hospitalization and antibiotic usage on the aerobic intestinal flora. **Scand. J. Infect. Dis.**, Basingstoke, v.32, p.403-406, 2000.
- PARKER, R.B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Anim. Nutr. Health**, San Francisco, v.29, p.4-8, 1974.
- PEACH, S.; FERNANDEZ, F.; JOHNSON, K.; DRASAR, B.S. The non-sporing anaerobic bacteria in human faeces. **J. Med. Microbiol.**, Hagerstown, v.7, p.213-221, 1974.
- PEDROSA, M.C.; GOLNER, B.B.; GOLDIN, B.R.; BARAKAT, S.; DALLAL, G.E.; RUSSELL, R.M. Survival of yogurt-containing organisms and *Lactobacillus gasseri* (ADH) and their effect on bacterial enzyme activity in the gastrointestinal tract of healthy and hypochlorhydric elderly subjects. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.61, p.353-359, 1995.
- PICHICHERO, M.E. Short course antibiotic therapy for respiratory infections: a review of the evidence. **Pediatr Infect Dis J**, , v.19, p.929-937, 2000.
- POUCHAPIN, M. The effect of probiotics on *Clostridium difficile* diarrhea. **Am. J. Gastroenterol.**, New York, v.95, suppl., p.11S-13S, 2000.

- REID, G.; BEUERMAN, D.; HEINEMANN, C.; BRUCE, A.W. Probiotic Lactobacillus dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, Amsterdam, v.32, p.37-41, 2001.
- RIBEIRO, H.; VANDERHOOF, J.A. Reduction of diarrheal illness following administration of Lactobacillus plantarum 199v in a daycare facility. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, Hagerstown, v.26, p.561, 1998.
- ROBERFROID, M.B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.71, suppl., p.1682S-1687S, 2000.
- ROBERFROID, M.B.; BORNET, F.; BOULEY, C.; CUMMINGS, J.H. Colonic microflora: nutrition and health. **Nutr. Rev.**, New York, v.53, p.127-130, 1995.
- ROEDIGER, W.E.W. Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. **Gastroenterology**, Orlando, v.83, p.424-429, 1982.
- ROEDIGER, W.E.W. The place of short-chain fatty acids in colonocyte metabolism in health and ulcerative colitis: the impaired colonocyte barrier. In: CUMMINGS, J.H.; ROMBEAU, J.L.; SAKATA, T., eds. **Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p.337-351.
- ROLFE, R.D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, p.396S-402S, 2000.
- RUMNEY, C.J.; ROWLAND, I.R. *In vivo* and *in vitro* models of the human colonic flora. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Lauderdale, v.31, p.299-331, 1992.

- SAAVEDRA, J.M. Probiotics plus antibiotics: regulation our bacterial environment. **J. Pediatr.**, Saint Louis, v.135, n.5, p.535-537, 1999.
- SAKATA. T. Effects of short-chain fatty acids on intestinal blood circulation. In: CUMMINGS, J.H.; ROMBEAU, J.L.; SAKATA, T., eds. **Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p.289-306.
- SALMINEN, S.; BOULEY, C.; BOUTRON-RUAULT, M.C.; CUMMINGS, J.H.; FRANCK, A.; GIBSON, G.R.; ISOLAURI, E.; MOREAU, M.C.; ROBERFROID, M.; ROWLAND, I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.80, suppl., p.S147-S171, 1998a.
- SALMINEN, S.; WRIGHT, A.; MORELLI, L.; MARTEAU, P.; BRASSART, D.; VOS, W.M.; FONDÍN, R.; SAXELIN, M.; COLLINS, K.; MOGENSEN, G.; BIRKELAND, S.E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Demonstration of safety of probiotics: a review. **Int. J. Food Microbiol.**, Oxford, v.48, p.93-106, 1998b.
- SAVAGE, D.C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v.31, p.107-133, 1977.
- SCHARRER, E.; LUTZ, T. Effects of short chain fatty acids and K on absorption of Mg and other cations by the colon and caecum. **Z. Ernährungswiss**, v.29, p.162-168, 1990.
- SCHLEIFER, K.H.; LUDWIG, W. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. **Syst. Appl. Microbiol.**, Jena, v.14, p.461-467, 1995.

- SETOYAMA, H.; IMAOKA, A.; ISHIKAWA, H.; UMESAKI, Y. Prevention of gut inflammation by *Bifidobacterium* in dextran sulfate-treated gnotobiotic mice associated with *Bacteroides* strains isolated from ulcerative colitis patients. **Microbes Infect.**, v.5, p.115-122, 2003.
- SHALEV, E.; BATTINO, S.; WEINER, E.; COLODNER, R.; KENESS, Y. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* compared with pasteurized yogurt as a prophylaxis for recurrent candidal vaginitis and bacterial vaginosis. **Arch. Fam. Med.**, Chicago, v.5, p.593-596, 1996.
- SHIROTA, M.; ASO, K.; IWABUCHI, A.; Studies on microflora of the human intestine. Alteration of the constitution of intestinal flora by oral administration of *L. acidophilus* strain Shirota to healthy infants. Jpn. J. Bacteriol., v.21, p.274-283, 1966. YAKULT CENTRAL INSTITUTE FOR MICROBIOLOGICAL RESEARCH, ed. **Lactobacillus casei strain Shirota**: intestinal flora and human health. Tokyo: Yakult Honsha, 1999. 290p. (Special edition marking the centenary of birth of Dr. Minoru Shirota).
- SHORTT, C. The probiotic century: historical and current perspectives. **Trends Food Sci. Technol.**, Oxford, v.10, p.411-417, 1999.
- SHULTZ, M.; SARTOR, R.B. Probiotics an inflammatory bowel diseases. **Am. J. Gastroenterol.**, New York, v.95, suppl., p.19S-21S, 2000.
- SIMON, G.L.; GORBACH, S.L. Intestinal flora in health and disease. **Gastroenterology**, Orlando, v.86, p.174-193, 1984.
- STILES, M.E.; HOLZAPFEL, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **Int. J. Food Microbiol.**, Oxford, v.36, p.1-29, 1997.

- SUTTER, V.L.; FINEGOLD, S.M. The effect of antimicrobial agents on human faecal flora; studies with cephalixin, cyclacillin and clindamycin. In: Skinner, F.A.; CARR, J.G.; eds. **Normal microbial flora of man**. London: Academic Press, 1974. p.229.
- TANKANOW, R.M.; ROSS, M.B.; ERTEL, I.J.; DICKINSON, D.G.; MCCORMICK, L.S.; GARFINKEL, J.E. Double-blind, placebo controlled study of the efficacy of Lactinex in the prophylaxis of amoxicillin-induced diarrhoea. **DICP, Ann. Pharmacother.**, Cincinnati, v.24, p.382-384, 1990.
- THOMAS, M.R.; LITIN, S.C.; OSMON, D.R.; CORR, A.P.; WEAVER, A.L.; LOHSE, C.M. Lack of effect of Lactobacillus GG on antibiotic-associated diarrhea: a randomized placebo-controlled trial. **Mayo Clin. Proc.**, Montvale, v.76, p.883-889, 2001.
- TISSIER, I.L. Le traitement des infections intestinales par la méthode de transformation de la flore bactérienne de l' intestine. C. R. Soc. Biol., v.60, p.359-361, 1906. *Apud* SHORTT, C. The probiotic century: historical and current perspectives. **Trends Food Sci. Technol.**, Oxford, v.10, p.411-417, 1999.
- VAN DER WAAJ, D.; BERGHUIS, J.M.; LEKKERKERK-VAN DER WEES, J.E.C. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. **J. Hyg.**, London, v.69, p.405-411, 1971.
- VANDERHOOF, J.A. Probiotics: future directions. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.73, suppl., p.1152S-1155S, 2001.

- VANDERHOOF, J.A.; HITNEY, D.B.; ANTONSON, D.L.; HANNER, T.L.; LUPO, J.V.; YOUNG, R.J. Lactobacillus GG in the prevention of antibiotic associated in children. **J. Pediatr.**, Saint Louis, v.135, p.564-568, 1999.
- VOLAARD, E.J.; CLASENER H.A.L. Colonization resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.38, p.409-414, 1994.
- VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT, A. Enzyme Immo-assays in diagnostic medicine. **Bull. W. H. O.**, Geneva, v.53, p.55-65, 1976.
- WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER, G.; POOL-ZOBEL, B.L. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.73, p.451S-455S, 2001.
- WRONG, O.M. Definitions and history. In: CUMMINGS, J.H.; ROMBEAU, J.L.; SAKATA, T., eds. **Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p.1-14.
- YAJIMA, T. Contractile effect short-chain fatty acids on the isolated colon of the rat. **J. Physiol.**, v.368, p.667-678, 1985.
- YAKULT CENTRAL INSTITUTE FOR MICROBIOLOGICAL RESEARCH, ed. **Lactobacillus casei strain Shirota**: intestinal flora and human health. Tokyo: Yakult Honsha, 1999. 290p. (Special edition marking the centenary of birth of Dr. Minoru Shirota).
- YUHARA, T.; ISOJIMA, S.; TSUCHIYA, F.; MITSUOKA, Y. On the intestinal flora of bottle-fed infant. **Bifidobact. Microflora.**, Tokyo, v.2, p.33-39, 1983.

YUKI, N.; WATANABE, K.; MIKE, A.; TAGAMI, Y.; TANAKA, R.; OHWAKI, M.; MOROTOMI, M. Survival of a probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota, in the gastrointestinal tract: selective isolation from faeces and identification using monoclonal antibodies. **Int. J. Food Microbiol.**, Oxford, v.48, p.51-57, 1999.

ZAJICEK, G. Antibiotic resistance and the intestinal flora. **Cancer J.**, Villejuif, v.9, p.214-215, 1996.

ANEXO I

PACIENTE	PRODUTO	SEXO	IDADE (Anos)	DIAGNÓSTICO
1	B	F	3	Pielonefrite
2	B	M	3	Pneumonia
3	A	F	14	Pneumonia
4	A*	M	2	Celulite
5	B*	M	2	Adenite
6	B	M	5	Pneumonia
7	B	M	2	Pneumonia
8	A*	F	1	Celulite
9	B*	M	1	Pneumonia
10	A*	M	2	Pneumonia
11	B	M	13	Pneumonia
12	B	F	3	Adenite bacteriana
13	A	F	8	Pneumonia
14	B	M	5	IPM
15	A*	M	12	Pneumonia
16	B*	M	4	IVAS
17	B*	F	5	Pneumonia
18	A	F	1	Celulite + erisipela
19	A	M	8	Abscesso retro-auricular
20	A	M	11	Osteomielite
21	A*	M	2	Celulite
22	B*	M	2	Adenite
23	B*	F	3	Pneumonia
24	A	M	3	Pneumonia
25	B*	M	2	IVAS
26	B*	M	5	Pneumonia
27	A	F	3	Meningite
28	A	F	1	Pneumonia
29	B	M	3	Pneumonia
30	A*	F	11	Pneumonia
31	B	F	4	Meningite
32	B	F	5	Abscesso cervical
33	A	M	1	Pneumonia
34	A	M	7	Pneumonia
35	B*	F	5	Adenite
36	B*	F	2	Pneumonia
37	B	F	1	Adenite bacteriana
38	A	F	1	Pielonefrite
39	B	M	2	Adenite cervical
40	B	M	6	Pneumonia
41	A	F	6	Pielonefrite
42	A	M	4	Celulite
43	A*	M	2	Adenite

PACIENTE	PRODUTO	SEXO	IDADE (Anos)	DIAGNÓSTICO
44	B*	M	1	Pneumonia
45	A	M	2	Pielonefrite
46	B	M	3	IVAS
47	B*	F	5	Pneumonia
48	A	M	4	Pneumonia
49	A*	F	1	Pneumonia
50	A	F	2	Pielonefrite
51	A	F	8	Pneumonia
52	B	M	13	Fratura exposta
53	B*	M	9	Pneumonia
54	A	M	2	Pneumonia
55	B	F	2	IVAS
56	B*	M	10	Pneumonia
57	A	M	3	Pneumonia
58	A*	M	1	Pneumonia
59	B	M	1	Pneumonia
60	A	F	4	IPM
61	B	M	3	Pneumonia
62	B	M	5	Pneumonia
63	A	F	12	Abscesso em joelho esquerdo
64	A	F	8	BCP
65	B*	M	3	Celulite
66	B*	M	3	Pneumonia
67	B*	F	8	Pneumonia
68	A*	F	3	Varicela infectada
69	B	F	3	Varicela infectada
70	A*	F	12	Pielonefrite
71	B	F	1	Mordedura de cão
72	A	F	10	ITU
73	A	M	9	Pneumonia
74	B*	F	5	IVAS
75	A*	F	3	Pneumonia
76	B	F	1	Varicela + Pneumonia
77	B	M	5	Varicela
78	A*	F	4	Pielonefrite
79	A	F	1	Pneumonia
80	A	M	2	Pneumonia
81	A*	M	1	Celulite
82	B*	M	3	IVAS
83	A	M	2	Varicela
84	A	F	5	Adenite
85	B	M	11	Celulite
86	A	F	5	Abscesso
87	A*	M	2	Varicela + Celulite

PACIENTE	PRODUTO	SEXO	IDADE (Anos)	DIAGNÓSTICO
88	A*	F	2	Pielonefrite
89	B	M	13	Pneumonia
90	A*	F	8	Pneumonia
91	B*	F	2	Pneumonia
92	B	F	3	Laringite + BCP
93	A	M	2	BCP
94	A	M	2	Pneumonia
95	B*	M	4	Pneumonia
96	B	M	5	Celulite
97	B	M	4	Abscesso em joelho esquerdo
98	A	M	12	Celulite em coxa esquerda
99	B*	F	3	Pneumonia
100	A*	M	2	Pielonefrite
101	B*	F	4	IVAS
102	A	F	2	IVAS
103	B	M	1	IVAS
104	A	F	1	IVAS
105	A	M	2	IVAS
106	B*	F	6	IVAS
107	B*	F	6	IVAS
108	B	M	2	IVAS
109	B	F	2	IVAS

Legenda: IVAS: Infecção de Via Aérea Superior; IPM: Infecção de Partes Moles; BCP: Bronco-Pneumonia; ITU: Infecção do Trato Urinário; *: Pacientes excluídos.

Crianças Sadias de Creche

Nº	SEXO	IDADE (Anos)
1	F	1
2	M	1
3	M	1
4	F	1
5	F	1
6	M	1
7	F	1
8	M	1
9	F	1
10	F	3
11	F	4
12	F	4
13	F	4
14	M	4
15	M	3
16	F	3
17	M	4
18	F	3
19	F	3
20	M	3
21	F	3
22	M	3
23	M	3
24	F	6
25	M	4
26	F	4
27	M	6
28	F	5

ANEXO II

anos
hospital universitário
universidade de são paulo

São Paulo, 08 de agosto de 2001.

Il^{mo}(a). S^{ra}.

Alfredo Elias Gilio

Diretor da Divisão de Clínica Pediátrica
Universidade de São Paulo

Referente: **Projeto de Pesquisa:** “Efeito da ingestão de leite fermentado na flora microbiana gastrointestinal durante antibioticoterapia” - **Cadastro:** 063/99

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião de 18 de fevereiro de 2000, analisou e APROVOU o projeto de pesquisa acima citado, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios parciais (a cada 90 dias) e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10-10-1996, inciso IX 2, letra “c”).

Atenciosamente,

Dr. Sérgio Gomes de Souza
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

ANEXO III

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

I - Identificação do paciente

Nome:

Data de Nascimento:

Endereço:

Nº de atendimento:

Responsável:

II - Dados sobre a pesquisa

Título: "Efeito da ingestão de leite fermentado contendo *L. casei* Shirota na microbiota intestinal de crianças sob terapia antimicrobiana"

Justificativa: Estudar se os lactobacilos presentes no leite fermentado ajudam no equilíbrio da flora intestinal de crianças que tomam antibiótico.

Procedimento: As crianças receberão diariamente 2 frascos de 120 mL de leite contendo lactobacilos vivos ou leite sem estes lactobacilos através de sorteio. Serão colhidas amostras de fezes para análise.

Benefícios que poderão ser obtidos: Melhora na função intestinal e talvez redução na incidência de diarreia associada ao uso de antibióticos.

Desconfortos e riscos: Não há relatos de desconfortos ou riscos.

III - Pesquisadores responsáveis

Dr. Alfredo Elias Giglio

Médico responsável pela enfermaria de Pediatria do HU - USP

Prof. Dr. Elsa M. Mamizuka

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

IV - Consentimento Pós-Esclarecido

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente protocolo de pesquisa.

São Paulo, de 2000

Assinatura do responsável legal

Assinatura do pesquisador

ANEXO IV

PROJETO DE PESQUISA INSTRUMENTO - ENTREVISTA

Data: _____

Nome da criança: _____

Data de Nascimento: _____ RH: _____

Endereço: _____

Tel: _____ SUDS2: ____ Sim ____ Não

Quantas pessoas moram no domicílio: _____

Cuidador (a): _____ Parentesco: _____

Grau de Instrução: _____

Diagnóstico: _____

Antimicrobiano (s): _____

Data de início do ATB: _____

Frequente berçário/creche/escola: ____ Sim ____ Não

Horário: _____

Possui geladeira em casa: ____ Sim ____ Não

Hábito intestinal: _____

____ Fralda ____ Penico ____ Vaso sanitário

Adulto disponível para oferta do leite fermentado e coleta de fezes no domicílio:

____ Sim ____ Não

Incluir no protocolo: ____ Sim ____ Não

ANEXO V

Projeto do Leite Fermentado

Caso n°:

CONTROLE DA INGESTÃO E ELIMINAÇÃO

Data: _____

Nome: _____

Leito: _____

N° atendimento: _____

RH: _____

Sexo: _____ Idade: _____ Peso atual: _____ Kg Altura: _____ cm

Diagnóstico de admissão: _____ Data internação: _____

Diagnóstico de alta: _____

Antibiótico: _____

Dose: _____

Via: _____

Dieta: prescrita: _____

Número de dias	Volume ingerido (mL)		Evacuação (n°/Cons.)	Distensão Abdominal (S/N)	Amostra (dia da coleta)	Observação
	M	T				
0						
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

Data da Alta Hospitalar: _____

ANEXO VI

MEIOS DE CULTURA E REAGENTES UTILIZADOS

1. SOLUÇÃO SALINA PARA A DILUIÇÃO DOS ANAERÓBIOS

Solução salina

Solução 1 75,0 mL

Solução 2 75,0 mL

Resazurine (0,1%)..... 1,0 mL

Na₂CO₃ (8%)..... 37,5 mL

Cloridrato de cisteína 0,5 mg

Água destilada 860,0 mL

Solução 1

KH₂PO₄ 0,3 g

NaCl 0,6 g

(NH₄)₂SO₄ 0,3 g

CaCl₂ 0,03 g

MgSO₄ 0,03 g

Água destilada 100 mL

Solução 2

K₂HPO₄ 0,30 g

Água destilada 100 mL

- Autoclavar a 105°C/15 min.
- Injetar CO₂ até que o indicador (resazurina) fique transparente
- Distribuir 4,5 mL nos tubos de ensaio
- Autoclavar a 121°C/15 min.

2. MEIO TRIPTOSE SULFITO CICLOSERINA (TSC)

Tryptose	6,0 g
Soitone	2,0 g
Extrato de levedura	2,0 g
Metabissulfito de sódio	0,4 g
Citrato de ferro e amônio	0,4 g
Agar	8,0 g

- Acertar o pH para 7,6 e acertar o volume para 400 mL
- Autoclavar a 121°C/15 min.
- Durante a autoclavação preparar as seguintes soluções:

Para 400 ml

D-cycloserine	1,6 mL
Solução de gema de ovo (gema: salina = 1:1).....	8,0 mL

- Resfriar o meio (55°C) e adicionar a solução acima.

SOLUÇÃO DE GEMA DE OVO

- Limpar o ovo com álcool e flambar
- Colocar a gema no Becker e romper a película com a pipeta, aspirando o conteúdo
- Transferir as gemas para a proveta adicionando o mesmo volume de gema e solução salina (0,85%)
- Distribuir 4,0 mL da solução em tubos de rosca e manter a 4°C.

3. MEIO LBS

LBS - Agar (BBL) 84,0 g

Lab-lemco (OXOID) 8,0 g

Acetato de sódio 15,0 g

- Deixar em ebulição por 1 hora e adicionar 3,7 mL de ácido acético
- pH 5,5

4. AGAR LLV: LACTITOL - LBS - VANCOMICINA

Trypticase Peptona 10,0 g

Extrato de levedura..... 5,0 g

KH₂PO₄ 6,0 g

Tri-Amônio citrato 2,0 g

Tween 80 1,0 g

Acetato de sódio (3H₂O) 25,0 g

Solução de sais I 5,0 mL

Lactitol 20,0 g

Agar 15,0 g

Vancomicina 10,0 µg/mL

Água destilada 1000,0 mL

Solução de Sais

MgSO₄ . 7 H₂O 11,5 g

FeSO₄ . 7H₂O 0,68 g

MnSO₄ . 2H₂O 2,4 g

Água destilada 100,0 mL

- Aquecer todos os reagentes com exceção da vancomicina e adicionar 1000 mL de água destilada
- Adicionar a vancomicina (10 µg/mL)
- pH = 6,1
- Distribuir em placas

5. MEIO TRANSOLIGOSSACARÍDEO (TOS)

TOS-S	10,0 g
Ácido propiônico.....	15,0 g
Casitone	10,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
K ₂ HPO ₄	4,8 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0 g
MgSO ₄	0,2 g
L-cisteína	0,5 g
Agar	15,0 g
Água destilada	completar 1000 mL

- Autoclavar a 115°C/15 min.
- pH 6,8
- Distribuir em placas

6. VLM

Solução de sais I	75 mL
Solução de sais II ..	75 mL
Água destilada	815 mL
Resazurina (0,1%).....	1 mL
Casitone	10 g
Extrato de levedura	5 g
Lab Lemco	2 g
Agar	15 g
Cloridrato de cisteína	0,15 g

- Aquecer até que o indicador (azul) fique transparente
- Em seguida adicionar:

Hemina (0,05%).....	10 mL
Cloridrato de cisteína.....	0,15 g
Vitamina K ₁	0,1 mL

Na ₂ CO ₃ (8%).....	50 mL
Glicose	5 g
Celobiose	2 g
Maltose	2 g

- Aquecer novamente até tornar-se transparente
- pH 6,8
- Distribuir em tubos sob injeção de gás
- Autoclavar a 121°C/15 min.

Solução de sais I

KH ₂ PO ₄	0,300 g
NaCl	0,600 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,300 g
CaCl ₂	0,040 g
MgSO ₄	0,062 g
H ₂ O	100 mL

Solução de sais II

K ₂ HPO ₄	0,300 g
H ₂ O	100 mL

Obs.: Em alguns dos VLMs deve-se acrescentar o antibiótico, cuja formulação é a seguinte:

- Kanamicina (266,7 mg/100 mL de H₂O)
- Vancomicina (26 mg/100 mL de H₂O)

Assim que as soluções estiverem prontas, filtrar os antibióticos em uma proporção de 9:1 (Kanamicina : Vancomicina), aliquotar e manter a -20° C.

ANEXO VII

Avaliação da microbiota fecal das 63 crianças internadas no Hospital Universitário de acordo com o sexo

MICRORGANISMOS	FEMININO						MASCULINO					
	LF (10) x PLACEBO (17)						LF (20) x PLACEBO (16)					
	ANTES		DURANTE		DEPOIS		ANTES		DURANTE		DEPOIS	
Aeróbios Totais	8,45	7,68	8,13	7,95	8,18*	7,52	8,20	8,43	7,97	7,96	8,07	7,82
E. coli	7,84	7,14	7,11	7,22	6,85	6,61	7,73	7,77	7,61	7,47	7,02	6,90
P. aeruginosa	2,30	2,68	2,30	2,88	2,60	2,58	2,46	2,43	2,39	2,51	2,38	2,59
<i>Streptococcus</i> sp	7,18	6,49	7,47	6,97	7,57	7,09	7,01	6,18	6,84	6,20	7,70	7,47
<i>Enterococcus</i> sp	5,89	5,85	6,44	6,58	6,53	6,26	6,17*	5,04	5,73	5,05	6,63	6,47
<i>Staphylococcus</i> sp	3,19	2,87	2,73	2,61	3,93	3,57	2,84	2,97	2,74	3,31	3,08	3,33
Anaeróbios Totais	9,86	9,39	9,73	9,70	9,98*	9,56	9,41	9,38	9,46	9,38	9,65	9,43
<i>Bacteroides</i> sp	9,06	8,68	8,98	8,91	8,87	8,79	8,53	8,36	8,74	8,50	8,41	8,53
<i>Bifidobacterium</i> sp	8,01	7,39	8,90	7,90	8,81	8,39	8,36	7,96	8,67	8,26	8,99	8,96
<i>Clostridium</i> sp	2,55	3,14	2,50	2,76	3,39	2,88	2,52	3,25	2,50	2,92	2,88	3,24
<i>Lactobacillus</i> sp	4,69	3,98	7,05*	5,01	6,39	5,37	4,95	4,39	6,94*	4,50	6,43*	4,53
<i>L. casei</i> Shirota	2,30	2,30	6,67*	2,30	4,64*	2,30	2,30	2,30	6,77*	2,30	3,75*	2,30
Leveduras	3,44	3,35	3,56	4,18	3,34	3,26	3,15	3,39	3,63	3,19	3,09	3,39

Legenda: *: p<0,05

Avaliação da microbiota fecal das 63 crianças internadas no Hospital Universitário de acordo com a idade

MICRORGANISMOS	LACTENTES						NÃO-LACTENTES					
	LF (10) x PLACEBO (13)						LF (20) x PLACEBO (20)					
	ANTES		DURANTE		DEPOIS		ANTES		DURANTE		DEPOIS	
Aeróbios Totais	8,58	7,92	8,62	8,10	8,37	8,12	8,14	8,12	7,72	7,87	7,89*	7,37
<i>E. coli</i>	7,99	7,32	7,81	7,45	7,35	5,84	7,66	7,53	7,26	7,28	6,77	6,69
<i>P. aeruginosa</i>	2,62	2,95	2,47	3,03	2,25	2,97*	2,30	2,30	2,30	2,48*	2,55	2,34
<i>Streptococcus</i> sp	7,49	6,74	7,27	7,47	7,66	7,78	6,85	6,08	6,94	6,03	7,65*	6,96
<i>Enterococcus</i> sp	6,97	5,88	6,88	6,38	7,33	6,93	5,63	5,18	5,51	5,48	6,23	5,99
<i>Staphylococcus</i> sp	3,34	3,35	3,13	3,19	3,84	3,99	2,77	2,64	2,54	2,80	3,13	3,11
Anaeróbios Totais	9,82	9,02	9,76	9,38	9,39	9,54	9,43	9,63	9,45	9,66	9,94*	9,58
<i>Bacteroides</i> sp	8,58	8,05	8,94	8,31	7,99	8,40	8,77	8,84	8,76	8,97	8,85	8,83
<i>Bifidobacterium</i> sp	8,47	7,05	9,50	8,07	9,19	8,41	8,25	8,07	8,37	8,07	8,80	8,84
<i>Clostridium</i> sp	2,67	2,30	2,56	2,47	2,86	2,62	2,46	3,78*	2,47	3,08*	3,14	3,25
<i>Lactobacillus</i> sp	4,30*	2,93	7,05*	3,43	6,30*	3,99	5,14	4,99	6,95*	5,63	6,47	5,59
<i>L. casei</i> Shirota	2,30	2,30	6,77*	2,30	4,46*	2,30	2,30	2,30	6,71*	2,30	3,84*	2,30
Leveduras	3,22	3,92	4,05	3,92	3,65	3,65	3,26	3,02	3,38	3,56	2,93	3,11

Legenda: *: p<0,05

Avaliação da microbiota fecal das 63 crianças internadas no Hospital Universitário de acordo com o diagnóstico

MICRORGANISMOS	DOENÇA RESPIRATÓRIA						DOENÇA NÃO-RESPIRATÓRIA					
	LF (15) x PLACEBO (19)						LF (15) x PLACEBO (14)					
	ANTES		DURANTE		DEPOIS		ANTES		DURANTE		DEPOIS	
Aeróbios Totais	8,53	8,16	8,24	8,06	8,13	7,73	8,03	7,87	7,80	7,82	7,85	7,57
<i>E. coli</i>	7,87	7,58	7,44	7,53	6,97	6,98	7,66	7,26	7,44	7,09	6,96	6,43
<i>P. aeruginosa</i>	2,30	2,34	2,30	2,57*	2,50	2,52	2,51	2,85	2,41	2,88	2,40	2,67
<i>Streptococcus</i> sp	7,12	6,25	7,01	6,31	7,70	7,33	7,01	6,46	7,08	7,00	7,61	7,19
<i>Enterococcus</i> sp	6,59*	5,09	5,97	5,41	6,73	6,42	5,57	5,95	5,96	6,42	6,47	6,28
<i>Staphylococcus</i> sp	3,07	2,95	2,97	3,15	3,01	3,55	2,84	2,88	2,49	2,67	3,60	3,33
Anaeróbios Totais	9,69	9,48	9,76	9,68	9,69	9,47	9,43	9,26	9,35	9,45	9,82	9,74
<i>Bacteroides</i> sp	8,85	8,58	8,75	8,94	8,04	8,67	8,56	8,45	8,88	8,40	9,09	8,65
<i>Bifidobacterium</i> sp	8,42	7,82	9,07	8,36	9,03	8,86	8,18	7,45	8,42	7,68	8,82	8,40
<i>Clostridium</i> sp	2,59	3,19	2,62	2,62	2,96	2,71	2,47	3,20	2,38	3,13*	3,07	3,53
<i>Lactobacillus</i> sp	4,59	4,07	7,30*	4,57	6,39	5,27	5,13	4,32	6,66*	5,08	6,43*	4,54
<i>L. casei</i> Shirota	2,30	2,30	6,88*	2,30	3,79*	2,30	2,30	2,30	6,59*	2,30	4,31*	2,30
Leveduras	3,10	3,37	3,80	3,48	3,09	3,12	3,39	3,37	3,41	4,00	3,25	3,61

Legenda: *: p<0,05

Avaliação da microbiota fecal das 63 crianças internadas no Hospital Universitário de acordo com o período de tratamento antibiótico

MICRORGANISMOS	≤ 10 DIAS DE ANTIBIOTICOTERAPIA LF(13) x PLACEBO (9)						≥ 10 DIAS DE ANTIBIOTICOTERAPIA LF(17) x PLACEBO (24)					
	ANTES		DURANTE		DEPOIS		ANTES		DURANTE		DEPOIS	
Aeróbios Totais	8,48	7,96	7,99	7,57	8,19*	7,53	8,14	8,07	8,04	8,10	7,69	7,71
<i>E. coli</i>	7,98*	7,11	7,51	7,04	7,08	6,71	7,61	7,57	7,39	7,46	6,97	6,76
<i>P. aeruginosa</i>	2,55	2,30	2,43	2,55	2,26	1,87	2,30	2,65	2,30	2,76	2,59	2,66
<i>Streptococcus</i> sp	6,79	7,31	6,78	6,45	7,87*	7,13	7,27*	5,98	7,25	6,65	7,49	7,33
<i>Enterococcus</i> sp	5,97	5,81	5,39	5,50	6,76	5,84	6,16	5,32	6,40	5,96	6,47	6,55
<i>Staphylococcus</i> sp	3,32	3,03	3,04	3,08	3,80	3,67	2,68	2,88	2,50	2,90	3,03	3,38
Anaeróbios Totais	9,65	9,51	9,73	9,30	9,76	9,70	9,49	9,34	9,41	9,64	9,75	9,42
<i>Bacteroides</i> sp	8,92	8,42	8,88	8,44	8,47	8,72	8,54	8,57	8,77	8,81	8,64	8,64
<i>Bifidobacterium</i> sp	8,06	7,30	8,90	8,35	9,18	9,11	8,51	7,80	8,63	7,97	8,74	8,50
<i>Clostridium</i> sp	2,78	3,20	2,62	2,40	3,06	3,40	2,34	3,19*	2,41	3,00*	3,22	2,93
<i>Lactobacillus</i> sp	5,47*	3,57	7,12*	4,74	6,95	5,42	4,39	4,41	6,87*	4,70	6,01*	4,79
<i>L. casei</i> Shirota	2,30	2,30	7,28*	2,30	5,28*	2,30	2,30	2,30	6,32*	2,30	3,11*	2,30
Leveduras	2,75	3,58	3,32	3,67	3,07	3,10	3,63	3,30	3,82	3,71	3,25	3,41

Legenda: *: $p < 0,05$