



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ISABELLA FREIRE GASPARETTO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE PROBIÓTICOS EM *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORA DE CARBAPENEMASE, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* E *Shigella flexneri*

CAMPINAS

2020

ISABELLA FREIRE GASPARETTO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE PROBIÓTICOS EM *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORA DE CARBAPENEMASE, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* E *Shigella flexneri*

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, na área de Saúde da Criança e do Adolescente.

ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS EMILIO LEVY

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA ISABELLA FREIRE GASPARETTO, E ORIENTADO PELO PROF. DR. CARLOS EMILIO LEVY.

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

G213a Gasparetto, Isabella Freire, 1985-
Atividade antimicrobiana *in vitro* de probióticos em *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* e *Shigella flexneri* / Isabella Freire Gasparetto. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Carlos Emilio Levy.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Enterobacteriáceas resistentes a carbapenêmicos. 2. *Klebsiella pneumoniae*. 3. *Lactobacillus*. 4. Espectrometria de massas. I. Levy, Carlos Emilio, 1949-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: *In vitro* antimicrobial activity of probiotics in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* and *Shigella flexneri*

Palavras-chave em inglês:

Carbapenem-resistant enterobacteriaceae

Klebsiella pneumoniae

Lactobacillus

Mass spectrometry

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Carlos Emilio Levy [Orientador]

Fernando Augusto de Lima Marson

Alessandro Lia Mondelli

Data de defesa: 25-11-2020

Programa de Pós-Graduação: Saúde da Criança e do Adolescente

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3818-1340>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2735366153279049>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO/DOCTORADO

ISABELLA FREIRE GASPARETTO

ORIENTADOR: CARLOS EMILIO LEVY

MEMBROS:

1. PROF. DR. CARLOS EMILIO LEVY

2. PROF. DR. FERNANDO AUGUSTO DE LIMA MARSON

3. PROF. DR. ALESSANDRO LIA MONDELLI

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 25/11/2020

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Carlos e Maria Elisabete Gasparetto, grandes professores que sempre tiveram muita paixão e dedicação à pesquisa, e sempre reforçaram a importância dos estudos sem medir esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos. Vocês me inspiram diariamente e me dão forças para continuar nessa jornada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu orientador Professor Dr. Carlos Emilio Levy pela oportunidade de aprender mais a fundo sobre a área da microbiologia, pela confiança em mim depositada e por acreditar no meu potencial. Obrigada por toda dedicação e paciência, e obrigada por todos os ensinamentos passados ao longo desse processo.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia da divisão de Patologia Clínica do HC-Unicamp, em especial à Cristiane Piveta, por dividirem seu espaço de trabalho, por transmitirem seus conhecimentos e pela ajuda sempre que solicitado.

À Professora Dra. Maristela da Silva do Nascimento, do Laboratório de Higiene e Legislação de Alimentos, do Departamento de Tecnologia de Alimentos, FEA, Unicamp, pela doação da cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC® 11454™ usada nesse estudo.

À aprimoranda Beatriz Dovadoni, pela grande ajuda em parte dos testes realizados.

Ao meu marido Maurício Massarotti, pelo companheirismo e por participar de todas as fases dessa pesquisa sempre me auxiliando e me apoiando.

À minha irmã Patrícia Gasparetto, que apesar da distância, sempre esteve presente.

Aos meus amigos que participaram diretamente deste trabalho, obrigada pela troca de experiências que muitas vezes auxiliaram no processo. E aos amigos que participaram indiretamente, obrigada por sempre me apoiarem.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e Recursos Faepex Unicamp.

RESUMO

O uso de probióticos tem sido crescente para o tratamento e prevenção de diarreia causada por enteropatógenos, e os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* têm sido os mais utilizados. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de alguns probióticos contra enterobactérias patogênicas e seu potencial uso para descolonização de pacientes. Probióticos comercialmente disponíveis foram semeados e incubados para contagem de colônias (UFC) e identificação por espectrometria de massas (MALDI-TOF MS). Para teste de sensibilidade a drogas, os probióticos foram submetidos ao E-test®. A atividade antimicrobiana dos probióticos contra *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC), *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* e *Shigella flexneri* foi avaliada pelo método de co-cultura, na concentração de 10⁶ UFC/mL, tanto das enterobactérias como de cada microrganismo isolado dos produtos. Amostras foram semeadas nos tempos T0, 24hs, 48hs e 72hs para contagem de UFC remanescentes. Para *Lactobacillus reuteri* foi adicionado 1% de glicerol. Encontramos 40 produtos probióticos disponíveis no comércio, entre medicamentos e alimentos contendo probióticos, e um total de 23 espécies de diferentes microrganismos. Foram selecionados e submetidos à identificação 6 medicamentos, 5 produtos alimentícios lácteos e uma cepa padrão ATCC® para controle. Para o teste de atividade antimicrobiana foram testados: *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 Colidis®, *Lactobacillus rhamnosus* SD5217 AtillusMulti®, *Lactobacillus acidophilus* LA14 Prolive®, *Lactobacillus casei* Shirota Yakult®, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Lactococcus lactis* Activia® Shot, *Bacillus clausii* Enterogermina® e *Saccharomyces boulardii* 17 Floratil AT®. O MALDI-TOF/MS permitiu a identificação de todos os gêneros e a maioria das espécies dos probióticos analisados. A contagem de UFC dos produtos analisados se mostrou igual ou muito próxima as contagens que constam nas bulas e rótulos. As CIMs dos probióticos mostraram que todos os *Lactobacillus* foram resistentes à Vancomicina e com exceção do *L. reuteri*, resistentes ao Meropenem, sendo os demais resultados variáveis, mas sempre sendo sensíveis a dois ou mais antibióticos. Todos *Lactobacillus* e *Lactococcus* apresentaram atividade inibitória contra todas enterobactérias testadas, sendo >99% de redução em 48hs contra KPC, enquanto que *B. clausii* e *S. boulardii* não mostraram atividade inibitória. Em conclusão, todos

os *Lactobacillus* spp e *Lactococcus* spp analisados mostraram potencial uso para inibição da colonização intestinal por enterobactérias patogênicas, incluindo KPC, em pacientes hospitalizados com risco de translocação bacteriana.

Palavras-chave: Enterobacteriaceae Produtoras de Carbapenemase; *Klebsiella pneumoniae*; *Lactobacillus*; Espectrometria de Massas.

ABSTRACT

Probiotics have been progressively used for treatment and prevention of diarrhea caused by enteropathogens with genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* most commonly used. This study aimed to evaluate antimicrobial activity of some probiotics against pathogenic enterobacteria and its potential use for patient decolonization. Commercially available probiotics were incubated for colonies counting (CFU) and identification by mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Probiotics were submitted to E-test® for drug sensitivity. Co-culture, at 10⁶ CFU/mL, was used to evaluate probiotic antimicrobial activity against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC), *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* and *Shigella flexneri*. Samples were seeded at times T0, 24, 48 and 72 hours for remaining CFU counting. For *Lactobacillus reuteri* 1% glycerol was added. We found 40 probiotic products commercially available among medicines and food, and a total of 23 species of different microorganisms. Selection and identification covered 6 medicines, 5 fermented dairy products and a standard strain ATCC® for control. For co-culture tests the following probiotics were checked: *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 Colidis®, *Lactobacillus rhamnosus* SD5217 AtilusMulti®, *Lactobacillus acidophilus* LA14 Prolive®, *Lactobacillus casei* Shirota Yakult®, *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 11454, *Lactococcus lactis* Activia® Shot, *Bacillus Clausii* Enterogermina® e *Saccharomyces boulardii* 17 Floratil AT®. MALDI-TOF/MS allowed the identification of all genera and most probiotics species analyzed. All dairy products demonstrated CFU counting close to that declared in the label. MICs showed that all *Lactobacillus* were resistant to Vancomycin and with the exception of *L. reuteri*, resistant to Meropenem. The other results were variable, but always sensitive to two or more antibiotics. All *Lactobacillus* and *Lactococcus* showed inhibitory activity against tested enterobacteria, with >99% reduction in 48 hours against KPC, while *B. clausii* and *S. boulardii* showed no inhibitory activity. In conclusion, all *Lactobacillus* spp and *Lactococcus* spp analyzed showed potential use for inhibition of intestinal colonization by pathogenic enterobacteria, including KPC, for hospitalized patients at risk of bacterial translocation.

Keywords: Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae; *Klebsiella pneumoniae*; *Lactobacillus*; Mass Spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação de espécies probióticas encontradas em grandes redes de farmácias e supermercados de Campinas/São Paulo, e total de produtos contendo cada uma delas.....	29
Figura 2. Comparação de unidades formadoras de colônias encontradas na mesma diluição de: (a) Leite fermentado Vigor®; (b) Yakult®.....	31
Figura 3. Coloração de Gram identificando bacilos Gram positivos encontrados no AtillusMulti® e coloração de Gram identificando cocos Gram positivos encontrados no Activia® Shot.....	33
Figura 4. Variação da concentração de KPC ATCC BAA1705 em UFC/mL em co-cultura contra diferentes probióticos, no período de 72hs.....	37
Figura 5. Comparação do teste de co-cultura contra KPC de <i>L. reuteri</i> com adição de 1% de glicerol (linha superior), e <i>L. reuteri</i> sem adição de glicerol (linha inferior), onde o crescimento visível é da KPC, da esquerda para direita nos tempos zero, 24hs, 48hs e 72hs.....	37
Figura 6. Teste de co-cultura do <i>L. lactis</i> Activia® Shot e do <i>L. lactis</i> ATCC 11454 contra KPC, e seus controles: (1) <i>L. lactis</i> Activia®; (2) <i>L. lactis</i> Activia® x KPC; (3) <i>L. Lactis</i> ATCC 11454; (4) <i>L. Lactis</i> ATCC 11454 x KPC; (5) KPC. De cima para baixo nos Tempos zero, 24hs, 48hs e 72hs.	38
Figura 7. Variação da concentração de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 em UFC/mL em co-cultura contra diferentes probióticos, no período de 72hs.....	39
Figura 8. Variação da concentração de <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076 em UFC/mL em co-cultura contra diferentes probióticos, no período de 72hs.....	40
Figura 9. Variação da concentração de <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022 em UFC/mL em co-cultura contra diferentes probióticos, no período de 72hs.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos produtos contendo probióticos em sua composição disponíveis em grandes redes de farmácias e supermercados.....	25
Tabela 2. Relação dos produtos selecionados para o estudo.	30
Tabela 3. Comparação entre a contagem do número de microrganismos probióticos descrita nas bulas e rótulos com a contagem encontrada em UFC/mL.	31
Tabela 4. Identificação das colônias que apresentaram crescimento, realizada por método espectrometria de massas (MALDI-TOF MS).	32
Tabela 5. Concentração inibitória mínima de diferentes antibióticos testados pelo método E-test® (CIM em mg/L).	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

ISAPP – Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos

KPC – *Klebsiella pneumoniae* produtora de Carbapenemase

MALDI-TOF – Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight

MS – Mass spectrometry

OMS – Organização Mundial da Saúde

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Probióticos	15
1.2 Mecanismos de ação	16
1.3 Atividade antimicrobiana	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Local do trabalho.....	21
3.2 Levantamento e seleção de probióticos comercialmente disponíveis.....	21
3.3 Contagem de microrganismos	21
3.4 Identificação da composição dos produtos probióticos	22
3.5 Isolamento dos microrganismos probióticos	23
3.6 Teste de sensibilidade dos probióticos aos antimicrobianos.....	23
3.7 Atividade antimicrobiana dos probióticos contra enterobactérias.....	23
4. RESULTADOS	25
4.1 Produtos probióticos disponíveis no mercado farmacêutico e alimentício ...	25
4.2 Produtos probióticos selecionados para o estudo	30
4.3 Contagem de microrganismos	30
4.4 Identificação da composição dos produtos probióticos	31
4.5 Isolamento dos microrganismos probióticos	33
4.6 Teste de sensibilidade dos probióticos aos antimicrobianos.....	34
4.7 Atividade antimicrobiana dos probióticos contra <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase ATCC BAA1705	35
4.7.1 Tempo zero	35
4.7.2 24 horas de incubação	35

4.7.3	48 horas de incubação	35
4.7.4	72 horas de incubação	35
4.7.5	Concentração dos probióticos ao final do teste com 72 horas	36
4.7.6	Controles	36
4.8	Atividade antimicrobiana dos probióticos contra outras enterobactérias.....	38
4.8.1	Atividade antimicrobiana dos probióticos contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	39
4.8.2	Atividade antimicrobiana dos probióticos contra <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	40
4.8.3	Atividade antimicrobiana dos probióticos contra <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022.....	41
5.	DISCUSSÃO	42
6.	CONCLUSÕES	46
7.	REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

Os membros das enterobactérias são amplamente distribuídos na natureza, e muitas de suas espécies vivem no intestino de humanos, animais e aves. Embora as enterobactérias sejam parte da microbiota intestinal humana, por outro lado, algumas delas também são importantes enteropatógenos e também relacionados as mais diversas infecções em humanos. Em nossa era de ampla resistência aos antibióticos, as enterobactérias não são exceção, estando relacionadas aos mais importantes mecanismos de resistência (1, 2).

Microrganismos multirresistentes em serviços de saúde são uma séria ameaça, responsáveis por falhas no tratamento, hospitalizações prolongadas e altas taxas de mortalidade (3), restando poucos antimicrobianos com atividade contra esses patógenos, muitas vezes com efeitos colaterais importantes, havendo por isso a necessidade urgente de novas alternativas de tratamento. Dentro da Família Enterobacterales, destaca-se a *Klebsiella pneumoniae* produtora de Carbapenemase (KPC) que é na atualidade a bactéria mais resistente e virulenta em infecções hospitalares, causando com frequência sepse a partir da colonização e posterior translocação do trato gastrointestinal (4).

Recentemente a atividade antimicrobiana de alguns probióticos contra enterobactérias multirresistentes foi avaliada como potencial uso para descolonização de pacientes podendo ser uma alternativa aos antibióticos ou um complemento ao tratamento antibacteriano (2, 5, 6).

1.1 Probióticos

Mais de um século atrás Élie Metchnikoff observou que camponeses búlgaros viviam mais relacionando ao consumo diário de iogurte e sugeriu a presença de bactérias benéficas neste produto (7). Uma revisão da literatura de 1924 (8), cobrindo as investigações de membros do gênero *Lactobacillus* encontrados em amostras de leites fermentado e no intestino de homens e animais, revelou que, aparentemente espécies idênticas, isoladas por diferentes pesquisadores, receberam nomes distintos, ficando, portanto, difícil de determinar exatamente quando foram identificadas as primeiras espécies a aparecerem na literatura, como *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*. Na década de 1930, o médico Minoru Shirota

isolou e identificou uma bactéria ácido láctica pertencente à microbiota normal e sugeriu que uma composição adequada de bactérias no intestino poderia prevenir doenças (9). Mais tarde essa bactéria recebeu o nome de *Lactobacillus casei* Shirota. Mas o termo “probiótico”, muito provavelmente, foi criado em 1954 por Ferdinand Vergin em seu artigo intitulado “Anti-und Probiotika”, onde ele compara os efeitos nocivos de antibióticos e outros agentes antibacterianos na microbiota intestinal com os efeitos benéficos de algumas bactérias (10). Nas décadas seguintes, diferentes autores procuraram abordar o tema e melhor definir o termo “probiótico” (11, 12). Nos anos 90, com novas tecnologias e maior conhecimento da microbiota humana, os estudos com probióticos ganharam força e pesquisadores começaram a analisar mais a fundo esse tema.

Em 2002 a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) definiram probióticos como “Microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (13). A definição foi mantida pela Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP) em uma reunião com especialistas clínicos e científicos em probióticos, para reexaminar o conceito, realizada no ano de 2013 (14).

Os probióticos comercialmente disponíveis são geralmente considerados seguros, isso porque eles contêm gêneros e espécies com história documentada de uso seguro (15), e o consumo desses produtos fornece uma série de benefícios à saúde (16). A ingestão diária de 10^6 - 10^9 organismos viáveis é recomendada como a dosagem mais efetiva para o efeito benéfico dos probióticos (17-19).

1.2 Mecanismos de ação

São relatadas inúmeras funções vantajosas que os probióticos podem apresentar ao organismo humano. Seu principal efeito é sobre a composição da microbiota presente no trato digestório de forma a garantir equilíbrio adequado entre os patógenos e as bactérias que são necessárias para o funcionamento normal do organismo (10).

O estudo da composição genética e das moléculas produzidas por *Lactobacillus* dão suporte à ação probiótica destas bactérias (20). Os mecanismos de ação que estes microrganismos conferem benefício à saúde humana podem ser

divididos em três principais categorias. O primeiro mecanismo é a capacidade de certos probióticos protegerem a barreira epitelial intestinal, modulando várias vias de sinalização levando, por exemplo, ao aumento da função das junções de oclusão (21), a indução da produção de defensinas (22) e de muco (23). O segundo, é a modulação de respostas imunes no hospedeiro, resultando tanto em efeitos locais como sistêmicos (24). Em terceiro lugar, os probióticos podem inibir agentes patogênicos, seja por ação direta ou através da influência na microbiota local (25, 26).

As bactérias probióticas mais conhecidas e utilizadas atualmente em uma variedade de produtos comercialmente disponíveis são as dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (27) e a levedura *Saccharomyces* (28).

Tem sido crescente o uso de probióticos na prevenção e tratamento de infecções do trato gastrointestinal (29-34), do trato urogenital feminino (35-37), e do trato respiratório (38-40).

As espécies do gênero *Lactobacillus* são encontradas em uma variedade de ambientes, desde produtos lácteos até o trato gastrointestinal humano, urogenital e glândulas mamárias. Os mais notáveis incluem *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. acidophilus*, *L. casei* e *L. bulgaricus* (41). Diversos estudos têm demonstrado que essas bactérias produtoras de ácido láctico, são imunomoduladoras e capazes de reduzir a hipercolesterolemia (42). As bactérias desse gênero também podem ser capazes de produzir bacteriocinas e algumas substâncias com propriedades antibióticas (10).

O grupo *Lactobacillus casei* contém as espécies *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*. Esse grupo é amplamente pesquisado devido à sua aplicabilidade na indústria alimentícia, na biofarmacêutica e na área médica, mas sua diferenciação é frequentemente difícil por métodos convencionais fenotípicos e genotípicos (43).

O *Lactobacillus rhamnosus* foi originalmente isolado de amostras fecais de indivíduos saudáveis e foi identificado como potencial probiótico pela sua capacidade de crescer e se aderir à camada do epitélio intestinal e sua resistência ao ácido gástrico e a bile (44). Desde então, tem sido o probiótico mais estudado, e testes clínicos têm demonstrado seus efeitos benéficos (45).

Lactobacillus reuteri é uma bactéria pertencente à microbiota normal de humanos e animais (46). É um colonizador eficiente, parece ser a espécie heterofermentativa dominante nestes ecossistemas, e pode ser único entre os *Lactobacillus* com capacidade de converter glicerol em um agente antimicrobiano

potente de amplo espectro, a reuterina (47). A reuterina é solúvel em água, eficaz em uma ampla gama de pH, resistente a enzimas proteolíticas e por isso foi estudada como conservante de alimentos e como agente terapêutico auxiliar. Entretanto, seu modo de ação ainda não foi totalmente elucidado (30).

Em cepas de *Lactobacillus acidophilus* foi identificada a produção de acidocina (48, 49), uma bacteriocina produzida por essa espécie, que mostrou inibição de crescimento de *Bacillus cereus*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* e *Clostridium* sp., incluindo cepas patogênicas de *Clostridium difficile* (50).

O *Saccharomyces boulardii* tem sido amplamente estudado e bastante utilizado como probiótico (51), seus mecanismos de ação são os mais diversos, incluem a regulação da homeostase microbiana intestinal, estabilização da barreira gastrointestinal (52), interferência na capacidade dos patógenos de colonizarem e infectarem a mucosa (53), modulação das respostas imunes locais e sistêmicas (54, 55) e neutralização de fatores de virulência e toxinas bacterianas (56). O antagonismo de microrganismos por leveduras é atribuído principalmente à competição por nutrientes, mudanças de pH no meio, produção de altas concentrações de etanol e secreção de compostos antibacterianos (57). Já as aplicações antibacterianas do *S. boulardii* ainda estão em estágios iniciais de desenvolvimento.

Baseado em estudos que mostram o potencial efeito anti-inflamatório e antiviral de alguns probióticos, um recente estudo (58) sugere seu uso, em combinação com outros medicamentos, na prevenção e/ou alívio dos sintomas relacionados com o novo coronavírus SARS-CoV-2. Isso mostra o grande potencial do uso desses microrganismos em diversos cenários.

1.3 Atividade antimicrobiana

Atividade antimicrobiana pode ser definida como um termo coletivo para todos os princípios ativos (agentes) que inibem o crescimento de bactérias, previnem a formação de colônias microbianas e podem destruir microrganismos. No campo antimicrobiano, muitos termos comuns são usados, incluindo antibacteriano, bactericida, bacteriostático, fungicida, fungistático, biocida e bioestático (59).

Segundo revisão bibliográfica realizada no presente estudo, a primeira publicação a usar o termo “atividade antimicrobiana” para classificar a inibição de

crescimento de patógenos por espécies probióticas foi de um estudo de Lee e colaboradores (60), realizado em 2003 na Coreia do Sul. Na ocasião, a resistência a antibióticos já se mostrava uma preocupação e o objetivo do estudo foi investigar a atividade antimicrobiana de produtos produzidos por espécies de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* isoladas das fezes de 32 crianças saudáveis contra *Clostridium difficile*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. De 109 espécies isoladas, 12 mostraram atividade contra *C. difficile*, 19 contra *E. coli* e nenhuma espécie mostrou atividade contra *S. aureus*.

Em 2004 Ocaña et al. (61) classificou as substâncias produzidas por bactérias ácido lácticas como “substâncias antimicrobianas” com efeito contra microrganismos patogênicos e, no mesmo ano, uma revisão de estudos clínicos com probióticos de Trafalska e Grzybowska (62) sugeriu seu uso como uma alternativa ao uso de antibióticos.

Já em 2009, Ruiz et al. (63) testou a atividade antimicrobiana de espécies de *Lactobacillus* contra patógenos urogenitais, enquanto Jones e Versalovic analisaram fatores antimicrobianos e anti-inflamatórios do *Lactobacillus reuteri* (64).

Em 2013 Chen e colaboradores (65) avaliaram o potencial antimicrobiano de probióticos contra patógenos de origem alimentar, e Ahmadova et al. (66) observou atividade antifúngica do *Lactobacillus curvatus* que inibiu o crescimento de *Cladosporium* e *Fusarium* spp.

Apenas em 2014 que o termo “atividade antimicrobiana” ganhou força e começou a ser usado por mais estudos *in vitro* demonstrando propriedades antimicrobianas de *Lactobacillus* isolados de kefir (67), identificando cepas de *Lactobacillus* com atividade antimicrobiana contra cepas patogênicas (68), avaliando a atividade antimicrobiana de cepas probióticas comercialmente disponíveis (69) e analisando os efeitos antimicrobianos das substâncias produzidas pelos microrganismos probióticos (70, 71).

Estudos recentes demonstraram vários mecanismos antimicrobianos do *Lactobacillus*, como competição de nutrientes, produção de compostos inibidores, estimulação imunológica e competição por sítios de ligação. Essas bactérias também podem secretar certas moléculas antimicrobianas, como etanol, ácido graxo, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas para exercer a atividade antimicrobiana (2).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana de probióticos disponíveis no mercado contra *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* e *Shigella flexneri*.

2.2 Objetivos específicos

- Levantar no mercado farmacêutico e alimentício brasileiro os produtos probióticos disponíveis.
- Isolar os microrganismos presentes nos produtos e confirmar a identificação dos microrganismos presentes nos produtos através de espectrometria de massas.
- Comparar a contagem de microrganismos viáveis contidos nos produtos probióticos em relação ao descrito nos rótulos.
- Testar a sensibilidade dos microrganismos probióticos aos antimicrobianos mais frequentemente usados no tratamento de infecções causadas por bactérias patogênicas através da determinação da concentração inibitória mínima.
- Medir a variação do pH das monoculturas e co-culturas dos testes de atividade antimicrobiana dos probióticos contra as enterobactérias patogênicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do trabalho

O local de desenvolvimento deste estudo foi o Laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica, do Hospital de Clínicas, da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo.

3.2 Levantamento e seleção de probióticos comercialmente disponíveis

Foi feita uma busca em 3 grandes redes de farmácias de Campinas, São Paulo, de quais medicamentos continham probióticos em sua formulação, bem como nas principais redes de supermercados de Campinas, São Paulo, alimentos lácteos associados a probióticos. Produtos lácteos contendo microrganismos vivos com função de fermento lácteo não foram incluídos no levantamento.

Para a seleção dos produtos usados neste estudo foi considerado como critério de inclusão a potencial atividade antimicrobiana de probióticos já documentada na literatura priorizando os que continham apenas uma espécie de microrganismo probiótico.

3.3 Contagem de microrganismos

Os medicamentos e os produtos lácteos selecionados foram diluídos em série seguindo o método padrão de Waksman e Fred (72), com base na informação de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) das bulas e rótulos. Para observação das UFC, 1mL das amostras dos probióticos foram suspensas com pipeta de pasteur de 3mL em tubo de ensaio esterilizado contendo 9mL de salina estéril. Este tubo de ensaio foi bem agitado. Posteriormente, 1mL de suspensão do probiótico foi transferido para o segundo tubo de ensaio contendo 9mL de salina estéril e assim se seguiu com diluições subsequentes até obter uma contagem, para leitura, entre 30 e 300 colônias. As diluições foram semeadas com alça descartável de 10µL em placas de Ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Acumedia®, Lansing, Michigan, Estados Unidos), Ágar Chocolate (Plastlabor®, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) e Ágar Sabouraud Laborclin®, Pinhais, Paraná, Brasil), e foram incubadas em estufa de CO₂ a 35°C por até 72hs. Produtos com microrganismos anaeróbios na formulação também foram incubados em Jarra de Anaerobiose por 72hs com gerador de

anaerobiose Probac® do Brasil, São Paulo, Brasil. A contagem foi visual, multiplicada pelas diluições para obter a contagem original e documentada fotograficamente.

3.4 Identificação da composição dos produtos probióticos

Diferentes colônias foram submetidas a identificação através da tecnologia matrix assisted laser desorption/ionization - time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS), utilizando o equipamento Microflex LT/SH – Bruker Daltonics/Bio Typer™.

MALDI-TOF MS é uma técnica de espectrometria de massas baseada na ionização com subsequente detecção de moléculas, em que os íons formados apresentam baixa energia interna, permitindo a observação de moléculas ionizadas com pouca ou nenhuma fragmentação.

Para realizar a análise, o isolado é preparado em uma placa de metal com uma matriz polimérica e bombardeado com laser. A amostra é vaporizada e as moléculas ficam ionizadas, sendo aspiradas por um tubo de vácuo. Ao final desse tubo há um detector que registra o tempo que cada molécula ionizada demora para chegar ao fim do tubo e sua quantidade. O tempo de chegada (time-of-flight) de cada molécula é diferente, sendo proporcional à massa de sua carga. Essas informações são plotadas em gráficos, gerando variados picos e, conseqüentemente espectros, que serão diferentes para cada espécie. Os espectros são interpretados pela semelhança com espectros de um banco de dados. As variações na sequência das proteínas ribossomais são responsáveis pela variação do pico das massas e pelos padrões detectados, que fornecem uma assinatura única para a identificação ao nível de espécie.

Foi feita a identificação de duas a três colônias iguais e de todas as colônias com morfologia e cor diferentes detectadas no isolamento inicial. Como controle de qualidade de desempenho do equipamento, foi usada a cepa *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 11454.

Nos casos de identificação de gênero diferente dos descritos nas bulas e ou rótulos, foi usado coloração de Gram para confirmação e verificada sua existência no banco de dados do equipamento.

3.5 Isolamento dos microrganismos probióticos

Todas as colônias identificadas foram repicadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion broth CM1135 - Oxoid® Limited Wade, Road Basingstoke, Hants, Inglaterra), caldo MRS (Acumedia®, Lansing, Michigan, Estados Unidos), Ágar MRS (Acumedia®, Lansing, Michigan, Estados Unidos) e Ágar Chocolate (Plastlabor®, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) e Ágar Sabouraud (Laborclin®, Pinhais, Paraná, Brasil) e foram incubadas em estufa de CO₂ a 35°C por até 72hs.

Após crescimento, os microrganismos foram conservados em caldo BHI com glicerol a 10% e mantidos em freezer a -20°C.

3.6 Teste de sensibilidade dos probióticos aos antimicrobianos

Os microrganismos isolados foram submetidos ao teste de sensibilidade a drogas através de tiras com gradiente contínuo de concentração dos antibióticos baseado no Epsilometer test (E-test®). Os testes foram realizados em placas de Ágar Mueller Hinton com 5% de Sangue (MHS) (Laborclin®, Pinhais, Paraná, Brasil), conforme recomendado pelo Comitê Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana – EUCAST (73).

As placas foram incubadas em estufa de CO₂ a 35°C por 24hs.

Os seguintes antibióticos foram testados: Vancomicina e Ceftriaxona (Liofilchen®, Roseto degli Abruzzi TE, Itália). Penicilina, Levofloxacina, Linezolida, Teicoplanina, Daptomicina, Tigeciclina e Meropenem (Biomérieux®, Marcy-l'Étoile, França).

3.7 Atividade antimicrobiana dos probióticos contra enterobactérias

O teste de atividade antimicrobiana em co-cultura foi adaptado de Chen et al. e Etchebehere et al. (2, 74).

Os microrganismos *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, *Lactobacillus rhamnosus* SD 5217, *Lactobacillus acidophilus* LA 14, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 11454, *Bacillus clausii* e *Saccharomyces boulardii* 17 foram diluídos em salina estéril para obter a concentração de 10⁶ UFC/mL e inoculados com 10⁶ UFC/mL de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase ATCC BAA1705 em 3 mL de caldo BHI OXOID®, incubados em estufa de CO₂ a 35°C por até 72hs.

Nos tempos zero, 24hs, 48hs e 72hs foi coletado 10 µL de cada amostra e plaqueado em Ágar Chocolate (Plastlabor®, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) e para contagem das Unidades Formadoras de Colônia remanescentes. Em testes prévios foi observado que a contagem de UFC pode ser melhor observada e analisada no meio Ágar Chocolate devido às colônias de enterobactérias crescerem com um aspecto diferente das espécies probióticas. No meio MRS, comumente utilizado em estudos similares, é mais difícil diferenciar as colônias de enterobactérias das espécies probióticas, dificultando assim a contagem visual. Para *Sccharomyces boulardii* foi usado no plaqueamento o Ágar Sabouraud (Laborclin®, Pinhais, Paraná, Brasil).

Também foi realizada medição do pH nos tempos zero, 24hs, 48hs e 72hs com fita de escala de pH (Macherey-Nagel®, Düren, Alemanha).

O mesmo teste de atividade antimicrobiana foi realizado para o *L. reuteri*, *L. rhamnosus* SD 5217, *L. acidophilus* LA 14 e *L. casei* Shirota com as enterobactérias *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 e *Shigella flexneri* ATCC 12022.

Foram realizados controles de todos os probióticos e das enterobactérias durante as 72 horas do estudo. As temperaturas de todas as incubações foram ajustadas a 35°C. Esse estudo foi conduzido em Cabine de Biossegurança nível 2.

Para *L. reuteri* foi adicionado 1% de glicerol (74).

4. RESULTADOS

4.1 Produtos probióticos disponíveis no mercado farmacêutico e alimentício

Tabela 1. Relação dos produtos contendo probióticos em sua composição disponíveis em grandes redes de farmácias e supermercados.

MEDICAMENTOS PROBIÓTICOS	CEPA PROBIÓTICA	INDICAÇÃO	FABRICANTE
20 bi [®]	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM <i>Lactobacillus paracasei</i> Lpc-37	Equilíbrio da microbiota intestinal	Momenta [®]
Atilus Caps [®]	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium lactis</i>	Equilíbrio da microbiota intestinal	Myralis [®]
Atilus Multi [®]	<i>Lactobacillus acidophilus</i> SD 5221 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> SD 5217 <i>Bifidobacterium bifidum</i> SD 6576	Equilíbrio da microbiota intestinal	Myralis [®]
Bidrilac [®]	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 <i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12	Equilíbrio da microbiota intestinal	Daudt [®]
Bifilac [®]	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM <i>Bifidobacterium lactis</i> HN019	Equilíbrio da microbiota intestinal	Hypera [®]
Biovicerin [®]	<i>Bacillus cereus</i>	Tratamento de diarreia	Geyer [®]
Colidis [®]	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938	Desconforto intestinal de bebês	ACHÉ [®]
Culturelle Probiótico [®]	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG DSM 33156	Equilíbrio da microbiota intestinal	Cellera Farma [®]
Culturelle Probiótico [®] Junior	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG DSM 33156	Equilíbrio da microbiota intestinal para crianças a partir de 3 anos	Cellera Farma [®]

Enterogermina®	<i>Bacillus clausii</i>	Equilíbrio da microbiota intestinal	Sanofi Aventis®
Exímia Probiac®	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM SD 5221 <i>Bifidobacterium lactis</i> HN019 SD 5674 Vitaminas e Minerais	Tratamento de acne	Farmoquímica®
FiberMais® Flora	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Equilíbrio da microbiota intestinal	Nestlé®
Flobac Pro®	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Equilíbrio da microbiota intestinal	Teuto®
Flomicin®	<i>Saccharomyces boulardii</i> -17	Tratamento de diarreia produzida por <i>Clostridium difficile</i>	Neo Química®
Flora Bio®	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Equilíbrio da microbiota intestinal	Cimed®
Floratil®	<i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I-745	Tratamento de diarreias de diferentes causas	Natulab®
Florax SM®	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Restauração da microbiota intestinal	Hebron®
Florax SM® Junior	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Restauração da microbiota intestinal uso pediátrico	Hebron®
Florent®	<i>Saccharomyces boulardii</i> -17	Tratamento de diarreia produzida por <i>Clostridium difficile</i>	Cifarma®
Lactofos®	<i>Lactobacillus acidophilus</i> SD 5221 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> SD 5675 <i>Lactobacillus paracasei</i> SD 5275 <i>Bifidobacterium lactis</i> SD 5674	Reconstituição e equilíbrio da microbiota intestinal	Farmoquímica®

Leiba®	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Tratamento de enterocolites e suas manifestações.	União Química®
Probiatop®	<i>Lactobacillus acidophilus</i> SD 5221 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> SD 5675 <i>Lactobacillus paracasei</i> SD 5275 <i>Bifidobacterium lactis</i> SD 5674	Equilíbrio da microbiota intestinal e absorção de nutrientes	Farmoquímica®
Prolive®	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA 14	Funcionamento e equilíbrio da microbiota intestinal	ACHÉ®
ProVance®	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938	Funcionamento e equilíbrio da microbiota intestinal	ACHÉ®
Repoflor®	<i>Saccharomyces boulardii</i> -17	Restauração da microbiota intestinal e tratamento de diarreia produzida por <i>Clostridium difficile</i>	Legrand®
Repoflor® Pediátrico	<i>Saccharomyces boulardii</i> -17	Restauração da microbiota intestinal e tratamento de diarreia produzida por <i>Clostridium difficile</i> uso pediátrico	Legrand®
Simbiofem®	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM <i>Bifidobacterium animalis</i> subespécie <i>lactis</i> HN019	Equilíbrio da microbiota intestinal e fortalecimento do sistema imunológico	FQM®
Simbioflora®	<i>Lactobacillus acidophilus</i> SD 5221	Recuperação e equilíbrio da	Farmoquímica®

	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> SD 5675 <i>Lactobacillus paracasei</i> SD 5275 <i>Bifidobacterium lactis</i> SD 5674	microbiota intestinal	
Simbiotil®	<i>Lactobacillus paracasei</i> Lpc-37 <i>Bifidobacterium animalis subspécie lactis</i> HN019	Tratamento de diarreia em crianças menores de 2 anos	Farmoquímica®
Simfort®	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Bifidobacterium lactis</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i>	Equilíbrio da microbiota intestinal	Vitafor®
Tamarine Probiom®	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium lactis</i>	Constipação intestinal aguda	Hypermarcas®
ZincoPro®	<i>Lactobacillus acidophilus</i> Zinco	Diarreia Aguda	Marjan®
ALIMENTOS LÁCTEOS	CEPA PROBIÓTICA	INDICAÇÃO	FABRICANTE
Actimel®	<i>Lactobacillus casei</i> CNCM I-1631	Equilíbrio da microbiota intestinal	Danone®
ACTIVIA® Shot diário probióticos	<i>Bifidobacterium animalis</i> CNCM I-2494	Equilíbrio da microbiota intestinal	Danone®
Chamyto®	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Equilíbrio da microbiota intestinal	Nestlé®
Kefir A Leitaria®	<i>Lactobacillus johnsonii</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Bifidobacterium lactis</i>	Equilíbrio da microbiota intestinal	A Leitaria®
Kefir Keiff®	<i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium lactis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus lactis</i> <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	Equilíbrio da microbiota intestinal	Keiff®

	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>biovar diacetylactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Leuconostoc</i> <i>pseudomesenteroides</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Debaryomyces hansenii</i>		
Leite Fermentado VIGOR®	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Equilíbrio da microbiota intestinal	VIGOR®
Yakult®	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Equilíbrio da microbiota intestinal	Yakult Honsha®
Yorgus®	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Bifidus</i>	Equilíbrio da microbiota intestinal	Vitalatte Yorgus®

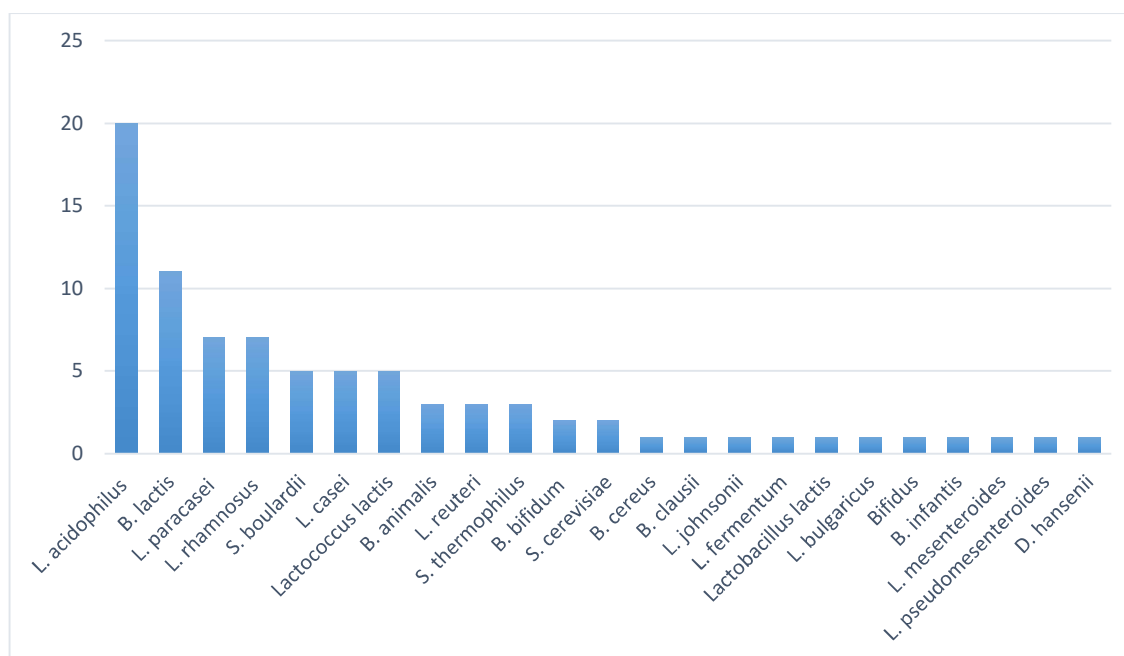


Figura 1. Relação de espécies probióticas encontradas em grandes redes de farmácias e supermercados de Campinas/São Paulo, e total de produtos contendo cada uma delas.

4.2 Produtos probióticos selecionados para o estudo

Tabela 2. Relação dos produtos selecionados para o estudo.

Produto	Cepa Probiótica	Fabricante
Colidis®	<i>Lactobacillus reuteri</i>	ACHÉ®
ProVance®	<i>Lactobacillus reuteri</i>	ACHÉ®
Floratil AT®	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Natulab®
Prolive®	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ACHÉ®
Atilus Multi®	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i>	Myralis®
Enterogermina®	<i>Bacillus clausii</i>	Sanofi Aventis®
Yakult®	<i>Lactobacillus casei Shirota</i>	Yakult Honsha®
Leite Fermentado	<i>Lactobacillus casei</i>	VIGOR®
VIGOR®	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
Activia®	<i>Bifidobacterium animalis</i>	Danone®
Shot diário probióticos		
Yorgus®	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Bifidus</i>	Vitalatte Yorgus®
Kefir A Leitaria®	<i>Lactobacillus johnsonii</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Bifidobacterium lactis</i>	A Leitaria® LTDA

4.3 Contagem de microrganismos

A contagem de UFC encontradas e descritas na **Tabela 3**, mostrou que dos 11 produtos testados, 8 apresentaram valores compatíveis com os descritos nos rótulos e bulas, 1 apresentou valor abaixo do descrito e em 2 produtos não constava a informação de UFC/mL ou grama do produto no rótulo para comparação.

Tabela 3. Comparação entre a contagem do número de microrganismos probióticos descrita nas bulas e rótulos com a contagem encontrada em UFC/mL.

PRODUTO	CONTAGEM DESCRITA	CONTAGEM ENCONTRADA
Colidis®	10^8 UFC	1.10^8 UFC
ProVance®	1.10^8 UFC	3.10^8 UFC
Floratil AT®	$1,25.10^9$ UFC	1.10^9 UFC
Prolive®	1.10^9 UFC	1.10^8 UFC
Atillus Multi®	3.10^9 UFC	5.10^8 UFC
Enterogermina®	2.10^9 UFC	$1,8.10^9$ UFC
Yakult®	10^{10} a 10^{11} UFC	3.10^8 UFC
Leite Fermentado VIGOR®	Não Consta	5.10^4 UFC
Activia® Shot	$8,9.10^7$ UFC	9.10^7 UFC
Yorgus®	10^9 UFC	3.10^8 UFC
Kefir®	Não Consta	6.10^8 UFC

UFC: Unidades Formadoras de Colônias.

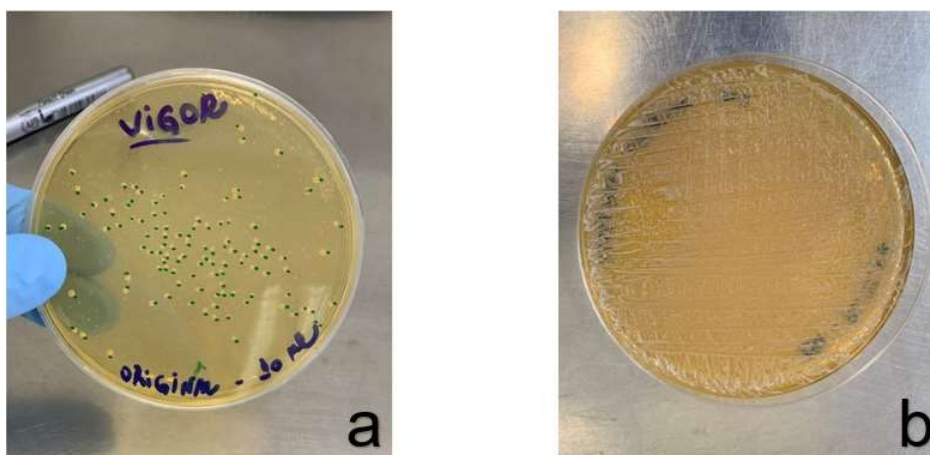


Figura 2. Comparação de unidades formadoras de colônias encontradas na mesma diluição de: (a) Leite fermentado Vigor®; (b) Yakult®.

4.4 Identificação da composição dos produtos probióticos

Foram selecionadas e submetidas à identificação 12 amostras, sendo 6 medicamentos, 5 produtos alimentícios lácteos e uma cepa padrão ATCC® para controle.

Dos microrganismos probióticos identificados predominaram os do gênero *Lactobacillus*, seguido por *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* e *Saccharomyces*.

Tabela 4. Identificação das colônias que apresentaram crescimento, realizada por método espectrometria de massas (MALDI-TOF MS).

MEDICAMENTOS PROBIÓTICOS	BULA	MALDI-TOF MS
Colidis®	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
ProVance®	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
Floratil AT®	<i>Saccharomyces boulardii</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
Prolive®	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Atilus Multi®	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i>
Enterogermina®	<i>Bacillus clausii</i>	<i>Bacillus clausii</i>
ALIMENTOS LÁCTEOS	RÓTULO	MALDI-TOF MS
Yakult®	<i>Lactobacillus casei Shirota</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
Leite Fermentado VIGOR®	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
Activia® Shot diário probióticos	<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
Yorgus®	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Streptococcus lutetiensis</i>
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
	<i>Lactobacillus casei</i>	
	<i>Bifidus*</i>	
Kefir A Leitaria®	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
	<i>Bifidobacterium lactis*</i>	
CEPA PADRÃO ATCC®	MALDI-TOF MS	
<i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp. Lactis</i> (ATCC® 11454™)	<i>Lactococcus lactis</i>	

*não foi realizada incubação em anaerobiose para identificação de microrganismo anaeróbio

No produto Activia® Shot diário probióticos houve uma importante discordância entre a descrição do rótulo e o microrganismo identificado pelo MALDI-TOF MS. O rótulo indicava o probiótico do gênero *Bifidobacterium*, mas a identificação do aparelho apontou o gênero *Lactococcus*. Nesse caso foi usado coloração de Gram para confirmação do gênero *Lactococcus*. A coloração de Gram foi feita a partir da cultura em aerobiose e anaerobiose do produto, tendo sido encontrados cocos Gram positivos, em acordo com a identificação pelo MALDI-TOF MS, e não bacilos Gram positivos.

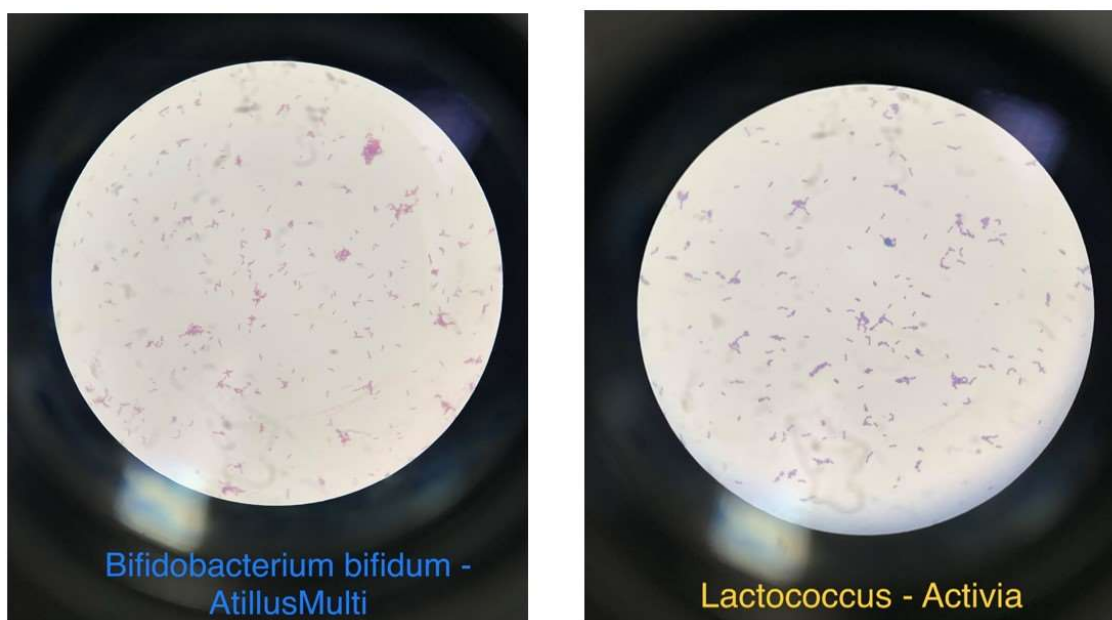


Figura 3. Coloração de Gram identificando bacilos Gram positivos encontrados no AtilusMulti® e coloração de Gram identificando cocos Gram positivos encontrados no Activia® Shot.

4.5 Isolamento dos microrganismos probióticos

Das espécies identificadas, as que mostraram crescimento mais favorável, após isolamento nos meios de cultura utilizados, foram *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 Colidis®, *Lactobacillus rhamnosus* SD 5217 Atilus Multi®, *Lactobacillus acidophilus* LA 14 Prolive®, *Bacillus clausii* Enterogermina®, *Saccharomyces boulardii* 17 Floratil AT®, *Lactobacillus casei* Shirota Yakult®, *Lactococcus lactis* Activia® Shot diário de probióticos e *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 11454.

Por esse motivo essas foram as espécies escolhidas para os testes de sensibilidade e de atividade antimicrobiana.

4.6 Teste de sensibilidade dos probióticos aos antimicrobianos

Os microrganismos selecionados para o teste de sensibilidade foram: *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, *Lactobacillus rhamnosus* SD 5217, *Lactobacillus acidophilus* LA 14, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactococcus lactis*, *Bacillus clausii* e *Saccharomyces boulardii* 17.

Todas as espécies de *Lactobacillus* se mostraram resistentes à Vancomicina, sendo sensíveis apenas o *Bacillus clausii* e *Lactococcus lactis*. Apenas o *L. casei*, dentre as espécies de *Lactobacillus*, foi sensível à Teicoplanina, sendo sensíveis também o *B. clausii* e o *L. lactis* que tiveram o padrão de suscetibilidade a praticamente todos os antibióticos testados.

As drogas mais ativas contra o *L. reuteri* foram o Meropenem e a Daptomicina. Para o *L. rhamnosus* a Penicilina e a Tigeciclina, já para o *L. acidophilus* as drogas mais ativas foram a Ceftriaxona, a Tigeciclina e a Daptomicina.

Tabela 5. Concentração inibitória mínima de diferentes antibióticos testados pelo método E-test® (CIM em mg/L).

	VA	PG	LE	LZ	TP	DPC	TGC	CRO	MP
Escala (mg/L)	0.016 256	0.002 32	0.002 32	0.016 256	0.016 256	0.016 256	0.016 256	0.016 256	0.002 32
Cepas									
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ¹	>256	0.38	2	4	>256	1.5	0.25	>256	>32
<i>Lactobacillus reuteri</i> ²	>256	>32	6	2	>256	0.25	2	1	0.064
<i>Lactobacillus casei</i> ³	>256	0.016	0.38	2	0.016	0.75	0.125	>256	>32
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ⁴	>256	>32	>32	3	>256	0.75	0.5	0.25	>32
<i>Lactococcus lactis</i> ⁵	0.25	0.25	-	4	0.19	0.094	0.75	0.38	0.064
<i>Bacillus clausii</i> ⁶	0.25	0.25	-	1	0.094	1	0.25	3	0.38

Abreviaturas fornecidas pelo fabricante do E-test®. VA: vancomicina; PG: penicilina; LE: levofloxacina; LZ: linezolida; TP: teicoplanina; DPC: daptomicina; TGC: tigeciclina; CRO: ceftriaxona; MP: meropenem. 1: *Lactobacillus rhamnosus* SD 5217; 2: *Lactobacillus reuteri* DSM 17938; 3: *Lactobacillus casei* Shirota; 4: *Lactobacillus acidophilus* LA 14; 5: *Lactococcus lactis* Activia®; 6: *Bacillus clausii* Enterogermina®. -: não testado.

4.7 Atividade antimicrobiana dos probióticos contra *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase ATCC BAA1705

A atividade antimicrobiana dos probióticos contra KPC e outras enterobactérias patogênicas foi realizado pelo método de co-cultura, sendo que para o *L. reuteri* foi adicionado 1% de glicerol (74).

Todos os testes foram realizados em duplicata e os valores apresentados expressam a média dos resultados encontrados.

4.7.1 Tempo zero

No tempo zero da incubação, as contagens verificadas de todos os microrganismos probióticos e da KPC eram $\geq 10^6$ UFC/mL. O pH inicial de todas as amostras estava em 6,5, pH padrão do meio BHI utilizado.

4.7.2 24 horas de incubação

Após 24 horas de incubação, a contagem de KPC subiu para $\geq 10^8$ UFC, para todos probióticos, com exceção da amostra de *Lactococcus lactis* ATCC 11454 e com *Lactococcus lactis* Activia® onde a KPC teve um aumento menor, de 10^7 UFC/mL. Após 24 horas o pH de todas as amostras caiu para 4, inclusive dos controles.

4.7.3 48 horas de incubação

Após 48 horas, houve inibição total da KPC por *Lactococcus lactis* ATCC 11454 assim como pelo *Lactococcus lactis* Activia®. Já para o *L. reuteri* + glicerol a redução foi para 10^1 UFC/mL (redução de 99,999%). Ainda com 48h de incubação, a KPC incubada com os *Lactobacillus acidophilus*, com *Lactobacillus rhamnosus* e com *Lactobacillus casei*, foi reduzida para 10^2 UFC (redução de 99,99%) enquanto que para *Bacillus clausii* e *Saccharomyces boulardii* a KPC manteve $\geq 10^8$ UFC/mL. Após 48 horas o pH de todas as amostras se manteve em 4.

4.7.4 72 horas de incubação

Após 72 horas de incubação, houve inibição total da KPC por *L. reuteri* e *L. rhamnosus*, enquanto que para *L. acidophilus*, *L. casei*, a KPC foi reduzida para 10^1 UFC/mL. Para *B. clausii* e *S. boulardii* não houve nenhuma inibição. A concentração de KPC contra os diferentes probióticos encontra-se descrita na **Figura 5**. Após 72

horas o pH era 4 de todas as amostras, inclusive dos controles. Todas as bactérias permaneceram viáveis nesse pH, inclusive a KPC.

4.7.5 Concentração dos probióticos ao final do teste com 72 horas

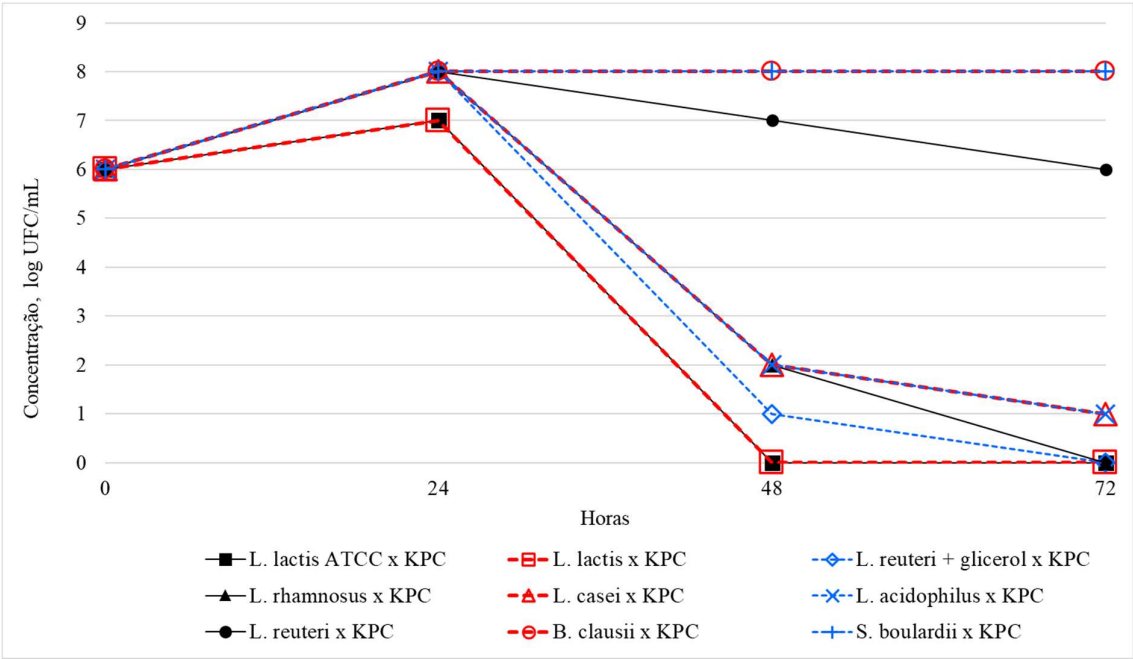
Todos os probióticos permaneceram viáveis em concentrações de 10^6 UFC/mL durante as 72hs do teste contra KPC, com exceção do *Lactococcus lactis* ATCC 11454 e *Lactococcus lactis* Activia® que apresentaram uma redução de crescimento com 48 horas de incubação para 10^4 UFC/mL, e com 72 horas de incubação não apresentaram mais crescimento.

4.7.6 Controles

Não houve diferenças significativas, em termos de concentração de *Lactobacillus* em UFC/mL, entre as amostras de monocultura controle e em co-cultura. Todos os controles de *Lactobacillus* mantiveram a concentração de 10^8 UFC/mL durante as 72hs de teste. Já o *Lactococcus lactis* ATCC 11454 e *Lactococcus lactis* Activia® apresentaram queda após 72hs de incubação caindo para uma concentração de 10^6 UFC/mL e 10^2 UFC/mL, respectivamente. Para *B. clausii* e *S. boulardii* a concentração se manteve a 10^8 UFC/mL.

Todos os controles de KPC mantiveram a concentração de 10^8 UFC/mL após 72h de incubação.

O pH de todos os controles estava em 6.5 no tempo zero, apresentaram queda após 24hs de incubação e se mantiveram em 4.0 até o final das 72hs de teste.



	Tempo zero	24 horas	48 horas	72 horas
<i>L. lactis</i> ATCC x KPC	10 ⁶	10 ⁷	0	0
<i>L. lactis</i> x KPC	10 ⁶	10 ⁷	0	0
<i>L. reuteri</i> + glicerol x KPC	10 ⁶	10 ⁸	10 ¹	0
<i>L. rhamnosus</i> x KPC	10 ⁶	10 ⁸	10 ²	0
<i>L. casei</i> x KPC	10 ⁶	10 ⁸	10 ²	10 ¹
<i>L. acidophilus</i> x KPC	10 ⁶	10 ⁸	10 ²	10 ¹
<i>L. reuteri</i> x KPC	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶
<i>B. clausii</i> x KPC	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸
<i>S. boulardii</i> x KPC	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸

Figura 4. Variação da concentração de KPC ATCC BAA1705 em UFC/mL em co-cultura contra diferentes probióticos, no período de 72hs.

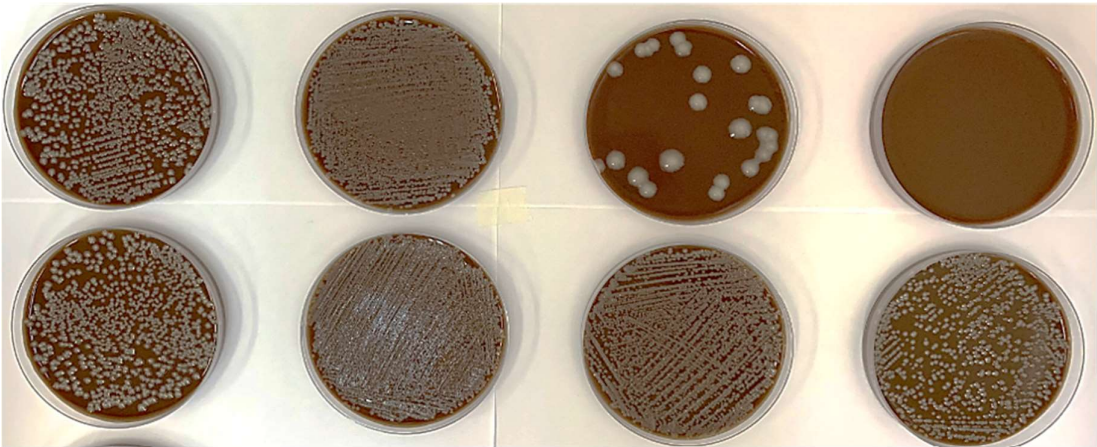


Figura 5. Comparação do teste de co-cultura contra KPC de *L. reuteri* com adição de 1% de glicerol (linha superior), e *L. reuteri* sem adição de glicerol (linha inferior),

onde o crescimento visível é da KPC, da esquerda para direita nos tempos zero, 24hs, 48hs e 72hs.



Figura 6. Teste de co-cultura do *L. lactis* Activia® Shot e do *L. lactis* ATCC 11454 contra KPC, e seus controles: (1) *L. lactis* Activia®; (2) *L. lactis* Activia® x KPC; (3) *L. Lactis* ATCC 11454; (4) *L. Lactis* ATCC 11454 x KPC; (5) KPC. De cima para baixo nos Tempos zero, 24hs, 48hs e 72hs.

4.8 Atividade antimicrobiana dos probióticos contra outras enterobactérias

O mesmo teste de atividade antimicrobiana em co-cultura foi realizado para o *L. reuteri* com e sem 1% de glicerol, *L. rhamnosus* SD 5217, *L. acidophilus* LA 14 e *L. casei* Shirota com as enterobactérias *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 e *Shigella flexneri* ATCC 12022.

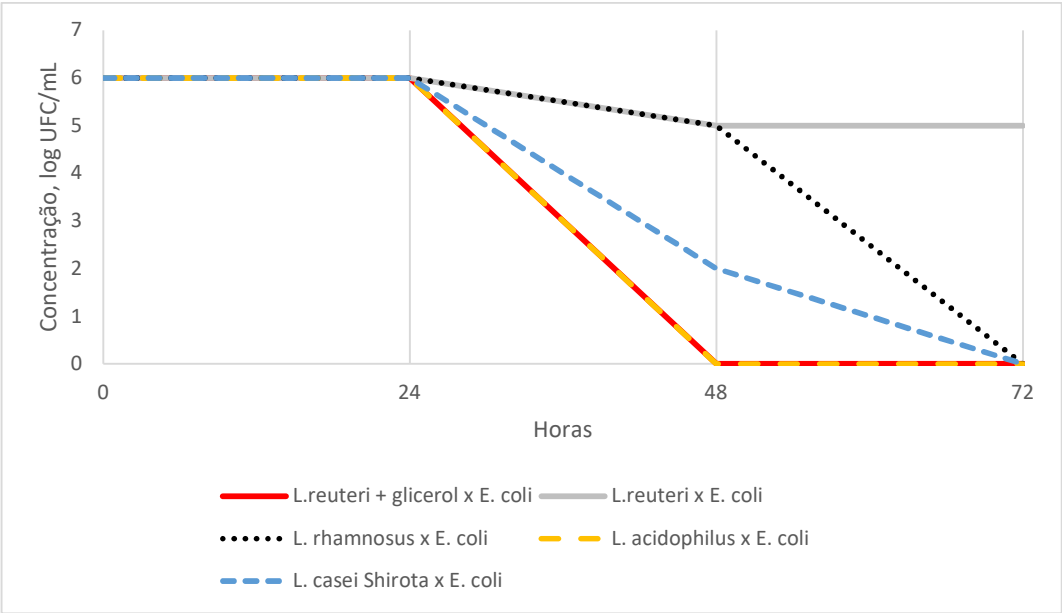
Todos os testes foram realizados em duplicata e os valores apresentados expressam a média dos resultados encontrados.

4.8.1 Atividade antimicrobiana dos probióticos contra *Escherichia coli* ATCC 25922

Para o teste da atividade antimicrobiana dos probióticos contra a *Escherichia coli* ATCC 25922, nas primeiras 24 horas de incubação a contagem de *E. coli* se manteve 10^6 UFC/mL em todas as amostras. Após 48 horas, o *L. reuteri* + glicerol e o *L. acidophilus* inibiram totalmente a *E. coli*. O *L. rhamnosus* e o *L. reuteri* reduziram a concentração de *E. coli* para 10^5 UFC/mL e o *L. casei* reduziu-a para 10^2 UFC/mL. Após 72 horas, o *L. rhamnosus* e o *L. casei* inibiram totalmente a *E. coli*, enquanto que com o *L. reuteri* sem glicerol a contagem se manteve em 10^5 UFC/mL.

Todos os probióticos permaneceram viáveis em concentrações de 10^8 UFC/mL durante as 72hs do teste.

Os controles da *Escherichia coli* e dos probióticos mantiveram a mesma concentração de 10^8 UFC/mL nas 72 horas.



	Tempo zero	24 horas	48 horas	72 horas
<i>L. reuteri</i> + glicerol x <i>E. coli</i>	10^6	10^6	0	0
<i>L. reuteri</i> x <i>E. coli</i>	10^6	10^6	10^5	10^5
<i>L. rhamnosus</i> x <i>E. coli</i>	10^6	10^6	10^5	0
<i>L. acidophilus</i> x <i>E. coli</i>	10^6	10^6	0	0
<i>L. casei</i> x <i>E. coli</i>	10^6	10^6	10^2	0

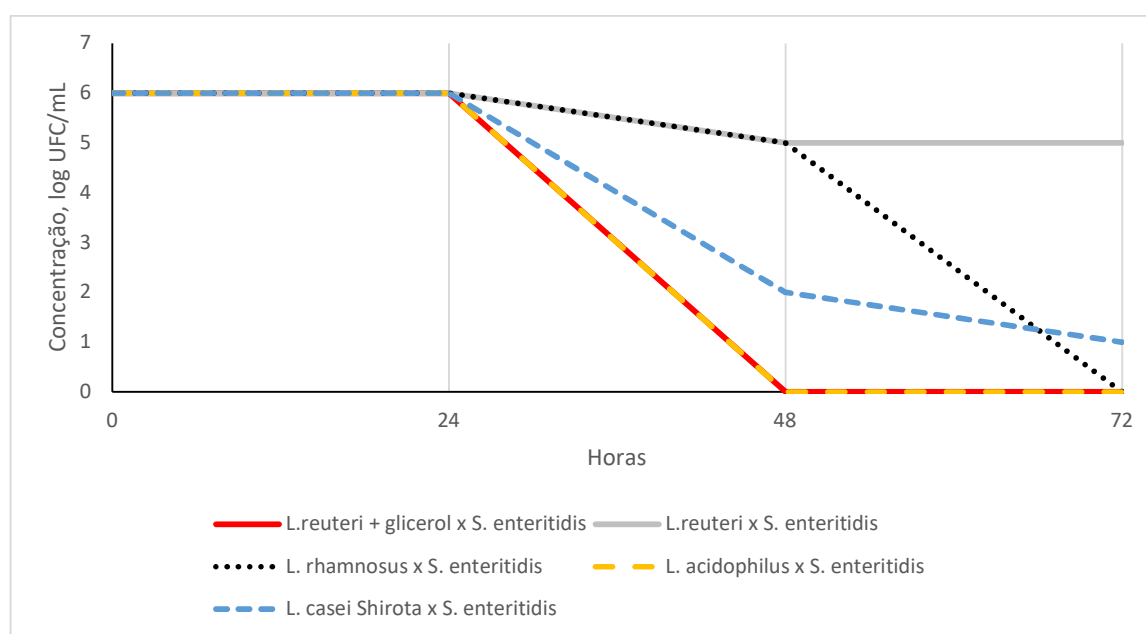
Figura 7. Variação da concentração de *Escherichia coli* ATCC 25922 em UFC/mL em co-cultura contra diferentes probióticos, no período de 72hs.

4.8.2 Atividade antimicrobiana dos probióticos contra *Salmonella enteritidis* ATCC 13076

Nos testes de avaliação da atividade antimicrobiana dos probióticos contra a *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, com 24 horas de incubação a contagem se manteve 10^6 UFC/mL em todas as amostras. Após 48 horas, o *L. reuteri* + glicerol e *L. acidophilus* inibiram totalmente a *S. enteritidis*. O *L. reuteri* e *L. rhamnosus* reduziram para 10^5 UFC/mL e o *L. casei* Shirota reduziu-a para 10^2 UFC/mL. Após 72 horas, o *L. rhamnosus* inibiu totalmente a *S. enteritidis*, já o *L. casei* reduziu a *S. enteritidis* para 10^1 UFC/mL, enquanto com o *L. reuteri* sem glicerol a contagem se manteve em 10^5 UFC/mL.

Todos os probióticos permaneceram viáveis em concentrações de 10^8 UFC/mL durante as 72hs do teste.

Os controles da *Salmonella enteritidis* e dos probióticos mantiveram a mesma concentração de 10^8 UFC/mL nas 72 horas.



	Tempo zero	24 horas	48 horas	72 horas
<i>L. reuteri</i> + glicerol x <i>S. enteritidis</i>	10^6	10^6	0	0
<i>L. reuteri</i> x <i>S. enteritidis</i>	10^6	10^6	10^5	10^5
<i>L. rhamnosus</i> x <i>S. enteritidis</i>	10^6	10^6	10^5	0
<i>L. acidophilus</i> x <i>S. enteritidis</i>	10^6	10^6	0	0
<i>L. casei</i> x <i>S. enteritidis</i>	10^6	10^6	10^2	10^1

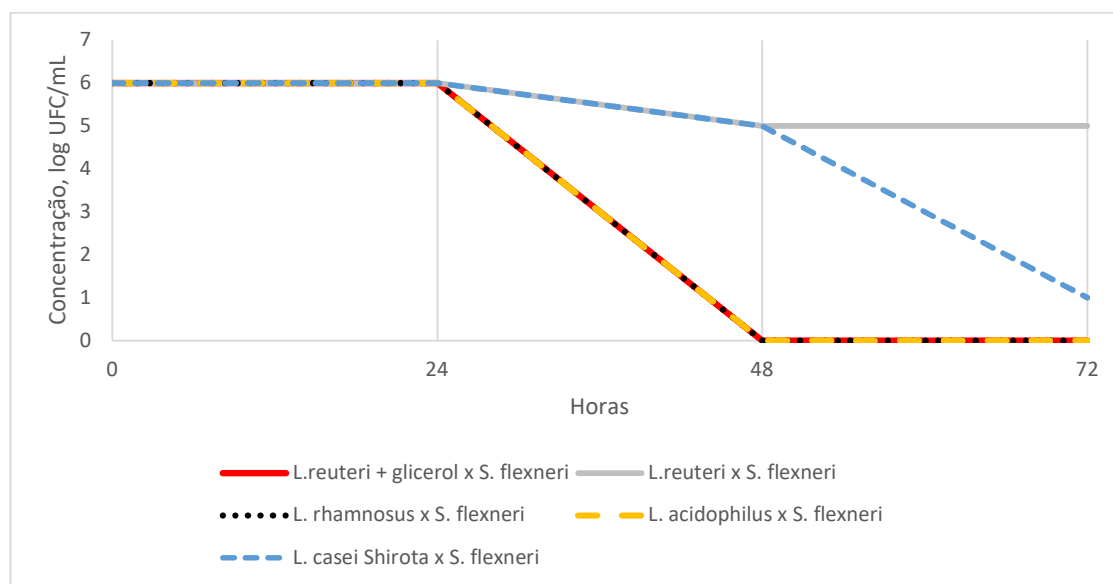
Figura 8. Variação da concentração de *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 em UFC/mL em co-cultura contra diferentes probióticos, no período de 72hs.

4.8.3 Atividade antimicrobiana dos probióticos contra *Shigella flexneri* ATCC 12022

Para o teste de avaliação da atividade antimicrobiana dos probióticos contra *Shigella flexneri* ATCC 12022, nas primeiras 24 horas a contagem de *S. flexneri* se manteve 10^6 UFC/mL em todas as amostras. Após 48 horas, houve inibição total da *S. flexneri* pelo *L. reuteri* + glicerol e *L. rhamnosus* e pelo *L. acidophilus*, já para o *L. reuteri* sem glicerol e *L. casei* a concentração da enterobactéria caiu para 10^5 UFC/mL (redução de 90%). Após 72 horas, o *L. casei* reduziu a contagem de *S. flexneri* para 10^1 UFC/mL enquanto com o *L. reuteri* sem glicerol a contagem se manteve em 10^5 UFC/mL.

Todos os probióticos permaneceram viáveis em concentrações de 10^8 UFC/mL durante as 72hs do teste.

Os controles da *Shigella flexneri* e dos probióticos mantiveram a mesma concentração de 10^8 UFC/mL nas 72 horas.



	Tempo zero	24 horas	48 horas	72 horas
<i>L. reuteri</i> + glicerol x <i>S. flexneri</i>	10^6	10^6	0	0
<i>L. reuteri</i> x <i>S. flexneri</i>	10^6	10^6	10^5	10^5
<i>L. rhamnosus</i> x <i>S. flexneri</i>	10^6	10^6	0	0
<i>L. acidophilus</i> x <i>S. flexneri</i>	10^6	10^6	0	0
<i>L. casei</i> x <i>S. flexneri</i>	10^6	10^6	10^5	10^1

Figura 9. Variação da concentração de *Shigella flexneri* ATCC 12022 em UFC/mL em co-cultura contra diferentes probióticos, no período de 72hs.

5. DISCUSSÃO

Dada a alta prevalência de infecções hospitalares no Brasil e no mundo, principalmente causadas por *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase e multirresistente, iniciamos um estudo em busca de probióticos para possível uso associado aos antibióticos no tratamento dessas infecções.

Foi feita uma busca em grandes redes de farmácias e supermercados de Campinas, São Paulo para identificar os produtos probióticos comercialmente disponíveis no mercado brasileiro. Encontramos 40 produtos probióticos disponíveis e um total de 23 espécies de diferentes microrganismos considerados probióticos.

Um estudo de 2014 reuniu as diferentes espécies probióticas comercialmente disponíveis no mercado mundial, totalizando o número de 21 espécies (16). Apesar do estudo não ser recente, verificamos que a disponibilidade de espécies probióticas encontradas no mercado brasileiro é compatível com o encontrado no restante do mundo. Outro estudo mais recente identificou 7 diferentes espécies probióticas em alimentos lácteos disponíveis no mercado brasileiro (75), enquanto nosso estudo encontrou um total de 16 espécies diferentes, o que mostra um constante aumento no mercado brasileiro.

O uso do método de identificação por espectrometria de massas com o aparelho MALDI-TOF MS se mostrou útil na identificação dos microrganismos isolados dos probióticos, identificando todos os gêneros e a maioria das espécies. A única discordância em relação ao indicado nos rótulos e bulas foi do produto Activia® Shot diário probióticos, no qual indicava conter o gênero *Bifidobacterium* em sua formulação, porém o identificado foi o gênero *Lactococcus*, resultado que foi confirmado através de coloração de Gram. Outro estudo utilizou o mesmo método para identificação da cepa probiótica do produto Enterogermina® (76) e o resultado está de acordo com os nossos achados. Huang et al (77) avaliou o desempenho do MALDI-TOF/MS como método rápido e preciso na identificação de cepas do grupo *L. casei* e sugere este método como uma alternativa para o controle de qualidade de probióticos.

No presente estudo, dos produtos que indicavam a contagem em UFC, todos mostraram contagens iguais ou muito próximas às contagens das bulas e rótulos e dois não indicavam essa informação para comparação. Recomenda-se que cada

produto indique a quantidade mínima diária necessária para conferir benefícios à saúde com base em estudos *in vitro* e *in vivo* (78). Na nossa análise apenas o produto leite fermentado Vigor® apresentou contagem inferior ao considerado adequado.

Embora as bactérias presentes nos medicamentos e alimentos probióticos não tenham interpretação do teste de sensibilidade aos antimicrobianos pelo CLSI e EUCAST (79, 80), pelas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) é possível avaliar a potencial atividade antimicrobiana dos antibióticos testados. As CIMs dos probióticos testados mostraram que todos os *Lactobacillus* foram resistentes à vancomicina, e, exceto o *L. reuteri*, resistentes ao Meropenem com demais resultados bastante variáveis. O padrão de resistência foi mais frequente que de suscetibilidade, exceto para o *B. clausii* e *L. lactis* que apresentaram o padrão de maior suscetibilidade. O *L. rhamnosus* apresenta um perfil interessante para uso concomitante com antimicrobianos por ser resistente às cefalosporinas de terceira geração e carbapenems, bem como à vancomicina e teicoplanina, mas sendo sensível a penicilina, assim também o *L. casei* (diferindo por ser sensível a Teicoplanina).

Nossos resultados do teste de sensibilidade dos probióticos aos antimicrobianos estão alinhados com os dados da literatura (16, 81) e com um recente estudo em diferentes cepas de *L. reuteri* (82).

Neut e colaboradores (81) também avaliaram o perfil de sensibilidade de produtos probióticos disponíveis comercialmente e, complementando nossos resultados, verificaram que as cepas de *B. clausii* e *L. lactis* também se mostraram sensíveis à levofloxacina.

Já Greppi et al. (82) comparou o perfil de sensibilidade de cepas de *L. reuteri* isoladas do trato gastrointestinal de frangos com duas cepas de *L. reuteri* disponíveis comercialmente e observou que as cepas disponíveis comercialmente mostraram resistência à penicilina enquanto as cepas isoladas de frangos apresentaram um padrão de susceptibilidade à penicilina, sugerindo que produtos comercialmente disponíveis apresentam um maior padrão de resistência aos antimicrobianos. O que vai de acordo com o proposto neste estudo na escolha de produtos comercialmente disponíveis para o uso concomitante com antibióticos.

A resistência aos antimicrobianos dos probióticos é uma vantagem quando se considera o seu uso em pacientes submetidos ao uso de antimicrobianos de largo

espectro e pode ser uma desvantagem nas raríssimas situações onde ele pode se tornar agente de infecção em imunossuprimidos (83).

Neste estudo, 4 espécies de *Lactobacillus* e 2 espécies de *Lactococcus* apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* contra a KPC. A inibição ocorreu após 48 horas e seu efeito é bactericida visto que no repique em meio sólido não houve crescimento. Recentemente outros dois estudos também documentaram evidências da atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* contra enterobactérias produtoras de carbapenemase (2, 6).

Assim como no presente estudo, o *Lactococcus lactis* também exibiu atividade antimicrobiana em estudo realizado *in vitro* por Shin et al. (84), onde o *L. lactis* foi testado contra 4 periodontopatógenos (*Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*) e se mostrou um possível probiótico para prevenir e tratar periodontite e halitose. Em outro estudo, 9 cepas de *L. lactis* mostraram importante efeito inibitório sobre *Escherichia coli* ATCC K88, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076 e *Aeromonas hydrophila* Ah 01(85). Estudos *in vivo* mostram o uso de *L. lactis* como uma estratégia promissora na redução de taxas de enterocolite necrotizante em prematuros (86) e no tratamento contra infecções do trato urinário causadas por *Escherichia coli* uropatogênica (87). Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a documentar evidências da atividade antimicrobiana do gênero *Lactococcus* contra a KPC.

A levedura *Saccharomyces boulardii* não apresentou nenhuma atividade inibitória contra a KPC. A avaliação da ação antibacteriana da *S. boulardii* ainda está em estágio inicial de desenvolvimento, mas estudos já comprovaram que essa levedura interfere na aderência de patógenos na mucosa e neutraliza fatores de virulência (53, 56).

Em nosso estudo *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. acidophilus* e *L. casei* também exibiram atividade antibacteriana contra *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri* e *Escherichia coli*. Estudos anteriores com cepas de *Lactobacillus* mostraram uma ampla gama de resultados de inibição. Quatro linhagens de *Lactobacillus* isoladas de leite humano fresco (*L. salivarius* CECT 5713, *L. gasseri* CECT 5714, *L. gasseri* CECT 5715 e *L. fermentum* CECT 5716) inibiram o crescimento de *Salmonella choleraesuis* (88). Cepas de *Shigella sonnei* tiveram sua viabilidade fortemente reduzidas na

presença de *Lactobacillus paracasei subsp paracasei* M5-L, *Lactobacillus rhamnosus* J10-L, *Lactobacillus casei* Q8-L e *L. rhamnosus* GG (89). Cepas isoladas de fezes de crianças saudáveis (*L. acidophilus* RY2, *L. salivarius* MM1 e *L. paracasei* En4), mostraram atividade inibitória contra *E. coli* enterotoxinogênica (90).

O efeito do pH ácido se mostra uma preocupação em estudos que realizaram os mesmos tipos de teste (2, 88, 91), nos quais os autores sugerem que esse possa ser o principal responsável pela inibição do crescimento dos patógenos, no entanto, em nossos experimentos, pudemos verificar que a KPC controle permanecia viável nesse mesmo pH por mais de 72hs.

Apesar da forma como ocorre a atividade antimicrobiana das cepas de *Lactobacillus* não ter sido completamente esclarecida, suas ações antiaderentes e imunomoduladoras sugerem ser de grande importância (21, 22, 25, 26, 42, 92).

Um estudo recente de Oliva et al. (6) foi o primeiro a comparar a atividade antibacteriana entre formulação de probióticos contendo as bactérias probióticas e sobrenadante filtrado dessa mesma formulação probiótica, livre de bactérias. O resultado mostrou uma atividade antibacteriana maior na formulação contendo as bactérias. Esse resultado sugere que a interação entre microrganismos vivos, e não apenas a produção de substâncias antibacterianas presentes principalmente no sobrenadante (utilizado pela maioria dos estudos deste tipo), é responsável pelas atividades antimicrobianas encontradas. O mesmo estudo (6) comparou ainda a atividade antibacteriana de amostras de água fecal de voluntários saudáveis antes e após 7 dias de administração de uma formulação de probióticos contra cepas clínicas de bactérias resistentes a carbapenem. As amostras antes da administração de probióticos não mostraram efeito antibacteriano, enquanto as amostras após 7 dias de suplementação de probióticos mostraram inibição de crescimento principalmente contra *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, demonstrando que a administração de probióticos aumenta a atividade fecal contra bactérias multirresistentes a drogas.

Embora os testes *in vitro* não possam ser diretamente traduzidos para efeito *in vivo*, o resultado desse estudo é promissor e, em conjunto com o encontrado na literatura, indica o potencial uso de probióticos em conjunto com a administração de antibióticos como estratégia para combater infecções por KPC, *E. coli*, *Salmonella* e *Shigella* em pacientes hospitalizados.

6. CONCLUSÕES

Dos produtos probióticos disponíveis do comércio houve predomínio dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, com uma grande diversidade de espécies e únicos ou em associação de probióticos, presentes tanto nos medicamentos, como nos alimentos.

A tecnologia MALDI-TOF MS permitiu a identificação de todos os gêneros e a maioria das espécies dos probióticos analisados.

A contagem de UFC dos produtos analisados se mostrou igual ou muito próxima as contagens que constam nas bulas e rótulos.

As CIMs dos probióticos mostraram que todos os *Lactobacillus* foram resistentes à vancomicina e com exceção do *L. reuteri*, resistentes ao Meropenem, sendo os demais resultados variáveis, mas sempre sendo sensíveis a dois ou mais antibióticos.

O padrão de resistência foi mais frequente que de suscetibilidade, exceto para o *B. clausii* e *L. lactis* que apresentaram o padrão mais frequente de suscetibilidade. Este perfil permite utilizá-los, em sua maioria, na vigência de antibióticos de largo espectro para Gram positivos e Gram negativos, existindo sempre uma alternativa, caso seja necessário erradicá-los.

L. reuteri, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. casei* Shirota, *Lactococcus lactis* e *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC exibiram atividade antibacteriana contra o KPC. A inibição ocorre após 48h e tem efeito bactericida. *S. boulardii* e *B. clausii* não mostram atividade contra KPC no teste de co-cultura.

A medição do pH mostrou que o pH ácido não é responsável pela inibição do crescimento da KPC na co-cultura. A amostra de KPC controle permaneceu viável nesse mesmo pH por mais de 72hs.

L. rhamnosus, *L. reuteri*, *L. acidophilus* e *L. casei* apresentaram atividade antibacteriana contra *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri* e *Escherichia coli*.

Todos os *Lactobacillus* spp e *Lactococcus* spp utilizados mostraram potencial uso para inibição da colonização intestinal por enteropatógenos em pacientes hospitalizados com risco de translocação.

7. REFERÊNCIAS

1. Morales-López S, Yepes JA, Prada-Herrera JC, Torres-Jiménez A. Enterobacteria in the 21st century: a review focused on taxonomic changes. *J Infect Dev Ctries*. 2019;13(4):265-73.
2. Chen CC, Lai CC, Huang HL, Huang WY, Toh HS, Weng TC, et al. Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Front Microbiol*. 2019;10:789.
3. Martens E, Demain AL. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. *J Antibiot (Tokyo)*. 2017;70(5):520-6.
4. García J, Nastro M, Cejas D, Santana G, Mancino MB, Hidalgo M, et al. Emergence of ceftazidime/avibactam resistance in KPC-8-producing *Klebsiella pneumoniae* in South America. *Clin Microbiol Infect*. 2020.
5. Gasparetto I, Dovadoni B, Piveta C, Levy C. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* probiotics against carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*. 29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID); Amsterdam, Netherlands 2019.
6. Oliva A, Miele MC, De Angelis M, Costantini S, Mascellino MT, Mastroianni CM, et al. Antibacterial Effectiveness of Fecal Water and in Vitro Activity of a Multi-Strain Probiotic Formulation against Multi-Drug Resistant Microorganisms. *Microorganisms*. 2020;8(3).
7. Mackowiak PA. Recycling metchnikoff: probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. *Frontiers in public health*. 2013;1:52-.
8. Kulp WL, Rettger LF. Comparative Study of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of bacteriology*. 1924;9(4):357-95.
9. Brown AC, Valiere A. Probiotics and medical nutrition therapy. *Nutrition in clinical care : an official publication of Tufts University*. 2004;7(2):56-68.
10. Markowiak P, Śliżewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*. 2017;9(9).
11. Lilly DM, Stillwell RH. PROBIOTICS: GROWTH-PROMOTING FACTORS PRODUCED BY MICROORGANISMS. *Science*. 1965;147(3659):747-8.
12. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*. 1989;66(5):365-78.
13. Food and Agriculture Organization (FAO) and World Health Organization (WHO). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food; Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food; FAO: London, ON, Canada, 30 April–1 May 2002.

14. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(8):506-14.
15. Binda S, Hill C, Johansen E, Obis D, Pot B, Sanders ME, et al. Criteria to Qualify Microorganisms as "Probiotic" in Foods and Dietary Supplements. *Frontiers in microbiology*. 2020;11:1662-.
16. Sharma P, Tomar SK, Goswami P, Sangwan V, Singh R. Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Research International*. 2014;57:176-95.
17. Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(4):658-72.
18. Sanders ME, Tompkins T, Heimbach JT, Kolida S. Weight of evidence needed to substantiate a health effect for probiotics and prebiotics: regulatory considerations in Canada, E.U., and U.S. *Eur J Nutr*. 2005;44(5):303-10.
19. L  hteinen T, Malinen E, Koort JM, Mertaniemi-Hannus U, Hankimo T, Karikoski N, et al. Probiotic properties of *Lactobacillus* isolates originating from porcine intestine and feces. *Anaerobe*. 2010;16(3):293-300.
20. Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2008;72(4):728-64, Table of Contents.
21. Rao RK, Samak G. Protection and Restitution of Gut Barrier by Probiotics: Nutritional and Clinical Implications. *Curr Nutr Food Sci*. 2013;9(2):99-107.
22. Schlee M, Harder J, K  ten B, Stange EF, Wehkamp J, Fellermann K. Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte beta-defensin 2. *Clin Exp Immunol*. 2008;151(3):528-35.
23. Mack DR, Ahrne S, Hyde L, Wei S, Hollingsworth MA. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut*. 2003;52(6):827-33.
24. Wells JM. Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microb Cell Fact*. 2011;10 Suppl 1(Suppl 1):S17.
25. Corr SC, Hill C, Gahan CG. Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. *Adv Food Nutr Res*. 2009;56:1-15.
26. Servin AL. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev*. 2004;28(4):405-40.
27. Marco ML, Pavan S, Kleerebezem M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Curr Opin Biotechnol*. 2006;17(2):204-10.

28. Naidu AS, Bidlack WR, Clemens RA. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1999;39(1):13-126.
29. Casas IA, Dobrogosz WJ. Validation of the Probiotic Concept: *Lactobacillus reuteri* Confers Broad-spectrum Protection against Disease in Humans and Animals. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2000;12(4):247-85.
30. Cleusix V, Lacroix C, Vollenweider S, Duboux M, Le Blay G. Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiol*. 2007;7:101.
31. Cleusix V, Lacroix C, Vollenweider S, Le Blay G. Glycerol induces reuterin production and decreases *Escherichia coli* population in an in vitro model of colonic fermentation with immobilized human feces. *FEMS Microbiol Ecol*. 2008;63(1):56-64.
32. Preidis GA, Hill C, Guerrant RL, Ramakrishna BS, Tannock GW, Versalovic J. Probiotics, enteric and diarrheal diseases, and global health. *Gastroenterology*. 2011;140(1):8-14.
33. Hojsak I, Szajewska H, Canani RB, Guarino A, Indrio F, Kolacek S, et al. Probiotics for the Prevention of Nosocomial Diarrhea in Children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2018;66(1):3-9.
34. Kołodziej M, Szajewska H. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(6):699-704.
35. Xie HY, Feng D, Wei DM, Mei L, Chen H, Wang X, et al. Probiotics for vulvovaginal candidiasis in non-pregnant women. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;11(11):Cd010496.
36. Shenoy A, Gottlieb A. Probiotics for oral and vulvovaginal candidiasis: A review. *Dermatol Ther*. 2019;32(4):e12970.
37. Ribeiro FC, Rossoni RD, de Barros PP, Santos JD, Fugisaki LRO, Leão MPV, et al. Action mechanisms of probiotics on *Candida* spp. and candidiasis prevention: an update. *J Appl Microbiol*. 2020;129(2):175-85.
38. Alexandre Y, Le Blay G, Boisramé-Gastrin S, Le Gall F, Héry-Arnaud G, Gouriou S, et al. Probiotics: a new way to fight bacterial pulmonary infections? *Med Mal Infect*. 2014;44(1):9-17.
39. Anderson JL, Miles C, Tierney AC. Effect of probiotics on respiratory, gastrointestinal and nutritional outcomes in patients with cystic fibrosis: A systematic review. *J Cyst Fibros*. 2017;16(2):186-97.
40. Nikniaz Z, Nikniaz L, Bilan N, Somi MH, Faramarzi E. Does probiotic supplementation affect pulmonary exacerbation and intestinal inflammation in cystic fibrosis: a systematic review of randomized clinical trials. *World J Pediatr*. 2017;13(4):307-13.

41. Islam SU. Clinical Uses of Probiotics. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(5):e2658.
42. Öner Ö, Aslim B, Aydaş SB. Mechanisms of cholesterol-lowering effects of lactobacilli and bifidobacteria strains as potential probiotics with their bsh gene analysis. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2014;24(1):12-8.
43. Hill D, Sugrue I, Tobin C, Hill C, Stanton C, Ross RP. The *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related Applications. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:2107-.
44. Doron S, Snyderman DR, Gorbach SL. *Lactobacillus GG: bacteriology and clinical applications*. *Gastroenterol Clin North Am*. 2005;34(3):483-98, ix.
45. Segers ME, Lebeer S. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus GG*--host interactions. *Microb Cell Fact*. 2014;13 Suppl 1(Suppl 1):S7.
46. Talarico TL, Casas IA, Chung TC, Dobrogosz WJ. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988;32(12):1854-8.
47. Talarico TL, Dobrogosz WJ. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989;33(5):674-9.
48. Tahara T, Kanatani K, Yoshida K, Miura H, Sakamoto M, Oshimura M. Purification and some properties of acidocin 8912, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* TK8912. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1992;56(8):1212-5.
49. Kanatani K, Oshimura M, Sano K. Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(3):1061-7.
50. Bogovic-Matijasić B, Rogelj I, Nes IF, Holo H. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1998;49(5):606-12.
51. Buts JP. Twenty-five years of research on *Saccharomyces boulardii* trophic effects: updates and perspectives. *Dig Dis Sci*. 2009;54(1):15-8.
52. Czerucka D, Piche T, Rampal P. Review article: yeast as probiotics -- *Saccharomyces boulardii*. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26(6):767-78.
53. Czerucka D, Dahan S, Mograbi B, Rossi B, Rampal P. *Saccharomyces boulardii* preserves the barrier function and modulates the signal transduction pathway induced in enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. *Infect Immun*. 2000;68(10):5998-6004.
54. Dalmasso G, Cottrez F, Imbert V, Lagadec P, Peyron JF, Rampal P, et al. *Saccharomyces boulardii* inhibits inflammatory bowel disease by trapping T cells in mesenteric lymph nodes. *Gastroenterology*. 2006;131(6):1812-25.

55. Caetano JA, Paramés MT, Babo MJ, Santos A, Ferreira AB, Freitas AA, et al. Immunopharmacological effects of *Saccharomyces boulardii* in healthy human volunteers. *Int J Immunopharmacol*. 1986;8(3):245-59.
56. Buts JP, Dekeyser N, Stilmant C, Delem E, Smets F, Sokal E. *Saccharomyces boulardii* produces in rat small intestine a novel protein phosphatase that inhibits *Escherichia coli* endotoxin by dephosphorylation. *Pediatr Res*. 2006;60(1):24-9.
57. Hatoum R, Labrie S, Fliss I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Front Microbiol*. 2012;3:421.
58. Akour A. Probiotics and COVID-19: is there any link? *Lett Appl Microbiol*. 2020.
59. Elmogahzy YE. 11 - Finished fibrous assemblies. In: Elmogahzy YE, editor. *Engineering Textiles (Second Edition)*: Woodhead Publishing; 2020. p. 275-98.
60. Lee YJ, Yu WK, Heo TR. Identification and screening for antimicrobial activity against *Clostridium difficile* of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species isolated from healthy infant faeces. *Int J Antimicrob Agents*. 2003;21(4):340-6.
61. Ocaña VS, Elena Nader-Macías M. Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria II: screening bacteriocin-producing strains with probiotic purposes and characterization of a *Lactobacillus* bacteriocin. *Methods Mol Biol*. 2004;268:347-53.
62. Trafalska E, Grzybowska K. [Probiotics--an alternative for antibiotics?]. *Wiad Lek*. 2004;57(9-10):491-8.
63. Ruiz FO, Gerbaldo G, Asurmendi P, Pascual LM, Giordano W, Barberis IL. Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens, and synergistic interactions between *Lactobacillus* strains. *Curr Microbiol*. 2009;59(5):497-501.
64. Jones SE, Versalovic J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiol*. 2009;9:35.
65. Chen PW, Jheng TT, Shyu CL, Mao FC. Antimicrobial potential for the combination of bovine lactoferrin or its hydrolysate with lactoferrin-resistant probiotics against foodborne pathogens. *J Dairy Sci*. 2013;96(3):1438-46.
66. Ahmadvova A, Todorov SD, Hadji-Sfaki I, Choiset Y, Rabesona H, Messaoudi S, et al. Antimicrobial and antifungal activities of *Lactobacillus curvatus* strain isolated from homemade Azerbaijani cheese. *Anaerobe*. 2013;20:42-9.
67. Carasi P, Díaz M, Racedo SM, De Antoni G, Urdaci MC, Serradell Mde L. Safety characterization and antimicrobial properties of kefir-isolated *Lactobacillus kefir*. *Biomed Res Int*. 2014;2014:208974.
68. Shokryazdan P, Sieo CC, Kalavathy R, Liang JB, Alitheen NB, Faseleh Jahromi M, et al. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. *Biomed Res Int*. 2014;2014:927268.

69. Coman MM, Verdenelli MC, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi C, Boyko N, et al. In vitro evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501(®) , *Lactobacillus paracasei* IMC 502(®) and SYN BIO(®) against pathogens. *J Appl Microbiol.* 2014;117(2):518-27.
70. Chikindas ML. Probiotics and antimicrobial peptides: the creatures' and substances' future in the twenty-first century: an opinion letter. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2014;6(2):69-72.
71. Kheradmand E, Rafii F, Yazdi MH, Sepahi AA, Shahverdi AR, Oveisi MR. The antimicrobial effects of selenium nanoparticle-enriched probiotics and their fermented broth against *Candida albicans*. *Daru.* 2014;22(1):48.
72. Waksman SA, Fred EB. A TENTATIVE OUTLINE OF THE PLATE METHOD FOR DETERMINING THE NUMBER OF MICRO-ORGANISMS IN THE SOIL. *Soil Science.* 1922;14(1).
73. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial susceptibility testing. 2018.
74. Etchebehere M, Piveta C, Levy C. The influence of glycerol upon *L. reuteri* activity against enteropathogens. *Medical Express.* 2017;4.
75. Colombo M, Todorov SD, Eller M, Nero LA. The potential use of probiotic and beneficial bacteria in the Brazilian dairy industry. *J Dairy Res.* 2018;85(4):487-96.
76. Yadav P, Sharma P, Arora R. Content Analysis of Commercially Available Probiotics. *Indian Pediatr.* 2018;55(4):344-5.
77. Huang CH, Huang L. Rapid species- and subspecies-specific level classification and identification of *Lactobacillus casei* group members using MALDI Biotyper combined with ClinProTools. *J Dairy Sci.* 2018;101(2):979-91.
78. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Health Organization (WHO). Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and Nutritional Paper. 2006.
79. CLSI. Clinical Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30th Edition. 2020.
80. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Testing. Clinical breakpoints and dosing of antibiotics. 2020.
81. Neut C, Mahieux S, Dubreuil LJ. Antibiotic susceptibility of probiotic strains: Is it reasonable to combine probiotics with antibiotics? *Med Mal Infect.* 2017;47(7):477-83.
82. Greppi A, Asare PT, Schwab C, Zemp N, Stephan R, Lacroix C. Isolation and Comparative Genomic Analysis of Reuterin-Producing. *Front Microbiol.* 2020;11:1166.

83. Snyderman DR. The safety of probiotics. Clin Infect Dis. 2008;46 Suppl 2:S104-11; discussion S44-51.
84. Shin HS, Baek DH, Lee SH. Inhibitory effect of *Lactococcus lactis* on the bioactivity of periodontopathogens. J Gen Appl Microbiol. 2018;64(2):55-61.
85. Feng J, Chang X, Zhang Y, Yan X, Zhang J, Nie G. Effects of *Lactococcus lactis* from *Cyprinus carpio* L. as probiotics on growth performance, innate immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila*. Fish Shellfish Immunol. 2019;93:73-81.
86. Gurien LA, Stallings-Archer K, Smith SD. Probiotic *Lactococcus lactis* decreases incidence and severity of necrotizing enterocolitis in a preterm animal model. J Neonatal Perinatal Med. 2018;11(1):65-9.
87. Derakhshandeh S, Shahrokhi N, Khalaj V, Habibi M, Moazzezy N, Asadi Karam MR, et al. Surface display of uropathogenic *Escherichia coli* FimH in *Lactococcus lactis*: In vitro characterization of recombinant bacteria and its protectivity in animal model. Microb Pathog. 2020;141:103974.
88. Olivares M, Díaz-Ropero MP, Martín R, Rodríguez JM, Xaus J. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. J Appl Microbiol. 2006;101(1):72-9.
89. Zhang Y, Zhang L, Du M, Yi H, Guo C, Tuo Y, et al. Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food. Microbiol Res. 2011;167(1):27-31.
90. Tsai CC, Lin PP, Hsieh YM. Three *Lactobacillus* strains from healthy infant stool inhibit enterotoxigenic *Escherichia coli* grown in vitro. Anaerobe. 2008;14(2):61-7.
91. Tejero-Sariñena S, Barlow J, Costabile A, Gibson GR, Rowland I. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: evidence for the effects of organic acids. Anaerobe. 2012;18(5):530-8.
92. Alakomi HL, Skyttä E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. Appl Environ Microbiol. 2000;66(5):2001-5.