

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departament de Genètica i Microbiologia

Servei de Microbiologia i Parasitologia

Hospitals Vall d'Hebron

**CARACTERITZACIÓ DE LES PROPIETATS QUE FAN
DE *LACTOBACILLUS* EL REGULADOR DE
L'ECOSISTEMA VAGINAL I EL PROTECTOR CONTRA
ELS PATÒGENS GENITO-URINARIS**

Tesi doctoral presentada per a obtenir el Grau de Doctor en Medicina i Cirurgia

Directora: Dra. Antònia Andreu i Domingo

Tutor: Dr. Teófilo González Fuente

Jordi Osset i Lladonosa

2003

A cada pam de terra hi ha el bosc immens

Subllum – Màrius Sampere

A la Carme, l'Anna i la Gemma

AGRAÏMENTS

Voldria agrair a diverses persones i institucions la seva col.laboració en aquest treball, per que d'una o altra manera han contribuït a que fos possible

A la Dra Antònia Andreu i Domingo, per mostrar-me la paciència i guia del mestre, l'entusiasme del col.laborador i la confiança de l'amic.

A les Dres Rosa M Bartolomé i Esther García, pels seus consells i suport, palesats d'una manera propera i desinteressada. També a les Dres Estrella Caballero, Gemma Codina i Teresa Tórtola i al Dr Óscar Del Valle-Ortiz per la seva col.laboració.

Al Dr David Andreu i Mari Luz Valero, del Dept de Ciències Experimentals i de la Salut de la UPF (abans a adscrits al Dept de Química Orgànica de la UB), i al Dr Jordi Vila, Josep Sierra i Joaquim Ruiz del Serv de Microbiologia de l'Hospital Clínic, per la seva ajuda tècnica i material en el desenvolupament de part d'aquest estudi.

A la Dra Margarida Garriga, Dr Manuel de la Rosa i Dr Benôit Kamerer, pels seus consells valuosos.

Als Drs José Roselló i Lluís Armadans, del Servei de Medicina Preventiva, dels Hospitals Vall d'Hebron, per la seva ajuda en l'anàlisi estadística.

Als Drs Francisco Fernández i Teófilo González per la seva orientació i tutoria, respectivament.

A Isabel Angolotti, Encarna Dueñas, Isabel López, Lina Ballano, Carme Crespo, Amelia Cano, Dolors Viu, Marisa Manzanares, José Saura, Josep Maria Manresa, Marisa López, Juana Moya, Núria Vergé per la seva ajuda en el dia a dia del desenvolupament d'aquest treball.

A Rosa Rubio, Montse Aldama, Encarna De La Torre i Maite Barbero, que amb la seva ajuda desinteressada es va poder fer una part d'aquest treball.

I en general, a totes les persones del laboratori de Microbiologia dels Hospitals Vall d'Hebron i d'altres institucions, que en algun moment m'han ajudat a portar a terme aquesta tasca de recerca.

A tota la meva família pel suport que sempre m'han donat.

Als meus pares, Jaume i Maria, pels seus anys d'esforços que m'han permès créixer en tots els sentits.

ÍNDEX

PRESENTACIÓ	i
ABREVIATURES	iii
I. INTRODUCCIÓ	1
1. Flora microbiana vaginal humana.....	3
1.1. Composició de la flora vaginal des de la menarquia a la menopausa.....	4
1.1.1. Bacteris anaerobis.....	5
1.1.2. Bacteris aerobis.....	5
1.1.3. Altres microorganismes.....	6
1.2. Flora vaginal humana prepuberal i postmenopàusica.....	6
2. Caracterització del gènere <i>Lactobacillus</i>	7
2.1. Caracterització i característiques metabòliques. Classificació.....	7
2.2. Infeccions per <i>Lactobacillus</i> i susceptibilitat als antimicrobians.....	12
3. Infeccions del tracte urinari.....	15
4. Vulvovaginitis per Càndida.....	19
5. <i>Lactobacillus</i> , un agent probiòtic.....	22
6. Estudis <i>in vivo</i> amb <i>Lactobacillus</i> com a probiòtic de l'aparell genitourinari.....	27
6.1. <i>Lactobacillus</i> com a probiòtic en ITU.....	28
6.2. <i>Lactobacillus</i> com a probiòtic en VVC.....	29

7. <i>Lactobacillus</i> : capacitat d'adherència a l'epiteli vaginal i bloqueig de l'adherència dels uropatògens.....	31
7.1. Assaigs d'adherència i de bloqueig de l'adherència.....	33
7.2. Tipus de bloqueig de l'adherència.....	34
7.3. Relacions: hemaglutinació, adherència i bloqueig de l'adherència.....	35
8. <i>Lactobacillus</i> com a inhibidor del creixement microbià.....	36
8.1. Metodologia dels assaigs d'inhibició del creixement.....	37
8.2. Revisió dels assaigs d'inhibició del creixement.....	39
8.3. Factors inhibidors del creixement.....	40
9. Bacteriocines excretades per <i>Lactobacillus</i>	41
9.1. Definició i classificació de les bacteriocines.....	41
9.1.1 Deficinió.....	42
9.1.2. Classificació.....	43
9.2. Mecanismes d'acció de les bacteriocines.....	44
9.3. Bacteriocines-like.....	45
10. Quantificació i caracterització de l'activitat inhibidora de les bacteriocines excretades per <i>Lactobacillus</i>	46
10.1. Quantificació.....	47
10.2. Tractament amb enzims lítics.....	48
10.3. Caracterització de les bacteriocines mitjançant SDS-PAGE.....	49

II. OBJECTIUS.....	51
III. RESULTATS.....	55
Articles publicats	
Article 1. Assessment of the capacity of <i>Lactobacillus</i> to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cells. J Infect Dis.....	57
Article 2. Papel de <i>Lactobacillus</i> como factor protector de la candidiasis vaginal. Med Clin (Barc).....	67
Comunicacions a Congressos	
Póster 1.....	73
Póster 2.....	83
Póster 3.....	91
Póster 4.....	99
IV. DISCUSSIÓ.....	121
V. CONCLUSIONS.....	143
VI. BIBLIOGRAFIA.....	149

PRESENTACIÓ

Amb l'objectiu d'obtenir la màxima difusió possible i mitjantçant la normativa vigent a la Universitat Autònoma de Barcelona, que permet presentar la Tesi Doctoral com a compendi de Publicacions, els següents articles publicats en revistes formen el cos central d'aquest treball de recerca:

Osset J, Bartolomé RM, García E, Andreu A. Assessment of the capacity of *Lactobacillus* to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cells. *J Infect Dis* **2001**; 183: 485-91.

Osset J, Bartolomé RM, García E, Andreu A. Papel de *Lactobacillus* como factor protector de la candidiasis vaginal. *Med Clin (Barc)* **2001**; 117: 285-8.

També cal destacar els treballs aportats a la comunitat científica en forma de Comunicacions a Congressos:

Osset J, Bartolomé RM, Andreu A. Inhibitory activity of *Lactobacillus* against uropathogens. En: Abstracts of the 97th American Society for Microbiology General Meeting. Miami Beach, 4-8 de maig, **1997**; p. 83 (resum B-315).

Osset J, Bartolomé RM, Andreu A. Inhibitory activity and adherence blockage of vaginal *Lactobacillus* against *C. albicans*. En: Program and Abstracts of International Congress of Sexually Transmitted Diseases and Research. Sevilla, 19-22 d'octubre, **1997**; p. 174 (resum P 671).

Osset J, Bartolomé RM, Andreu A. Estudio del bloqueo que *Lactobacillus* ejerce sobre la adhesión de los uropatógenos al epitelio vaginal. En: Programa y Resúmenes del VIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Palma de Mallorca, 24-27 de maig, **1998**; p. 214 (resum 22-9).

Osset J, García E, Bartolomé RM, Andreu D, Valero ML y Andreu A. Caracterización de las sustancias antibióticas excretadas por *Lactobacillus*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2000**; 18 (supl 1): 7 (resum 23).

Aquest treball, en part, ha estat possible gràcies a la financiació de diverses beques:

Ministerio de Educación y Ciencia.

Beca DGICYT PB94/1248

Fondo de Investigación Sanitaria.

Beca BAE 96/5126

Beca BAE 97/5449

La realització d'aquest estudi s'ha fet bàsicament al Servei de Microbiologia i Parasitologia dels Hospitals Vall d'Hebron (Barcelona). Part d'aquest treball s'ha desenvolupat també, al Servei de Microbiologia i Parasitologia de l'Hospital Clínic (Barcelona) i al Departament de Química Orgànica de la Facultat de Ciències de la Universitat de Barcelona.

ABREVIATURES

C:	Citosina
CEV:	Cèl.lules de l'Epiteli Vaginal
CMI:	Concentració Míxima Inhibitòria
Da:	Daltons
DNA:	Àcid Desoxirribonuclèic
E:	<i>Enterococcus</i> spp.
EC:	<i>Escherichia coli</i>
FDA:	Food and Drug Administration
G:	Guanina
GRAS:	Generally Recognized As Safe
IgA:	Immunoglobulina A
IgG:	Immunoglobulina G
IL:	Interleuquina
ITU:	Infecció del Tracte Urinari
KP:	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LB:	<i>Lactobacillus</i>
PA:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PM:	<i>Proteus mirabilis</i>
SA:	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS-PAGE:	Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SS:	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
TNF:	Factor de Necrosi Tumoral
UA:	Unitats d'Activitat
UFC:	Unitats Formadores de Colònies
VV:	Vulvovaginitis
VVC:	Vulvovaginitis Candidiàsica
Y:	<i>Candida</i> spp.

I. INTRODUCCIÓ

1. FLORA MICROBIANA VAGINAL HUMANA

El cos humà és portador d'un grandíssim nombre de microorganismes que colonitzen superfícies i cavitats exposades o connectades al medi extern. Cada àrea del cos està habitada per diferents tipus de microorganismes, que pertanyen a uns gèneres i espècies determinats. Només els microorganismes que presentin unes capacitats genètiques i metabòliques ventajoses, podran colonitzar, sobreviure i replicar-se en aquella zona. Aquests gèneres i espècies formaran part de la flora o microflora normal, i constituiran un veritable ecosistema.

El concepte de microecologia (113) proposa que el teixit colonitzat proporciona un hàbitat a la flora microbiana colonitzadora. Així, la composició de les espècies i la densitat de població microbiana és un reflexe de les propietats químiques i físiques del teixit colonitzat. Per tant, qualsevol canvi en les condicions del teixit comporten una alteració de la flora, en la qualitat i/o quantitat. Larsen *et al* (113) posen de manifest l'importància de mantenir un equilibri intern, entre l'hoste i microflora.

En la vagina, aquesta microflora ha d'estar en equilibri, per a protegir-la de la colonització per patògens i evitar les infeccions (7, 79, 141, 166, 167). Els canvis hormonals i en concret els estrogens, tenen una gran importància en la composició de la flora vaginal (82, 181). Hi ha altres situacions externes i internes que poden influir en aquesta composició, com són els tractaments amb

antimicrobians (82, 181), l'ús de l'espermicida nonoxinol-9 (87, 119, 125, 178) i les alteracions en el pH vaginal (157), etc.

La flora vaginal humana està formada per una complexa varietat de gèneres i d'espècies, on hi predominen els bacteris Gram positiu. Els microorganismes anaeròbics són els més nombrosos, alguns autors parlen de 10 vegades més anaerobis que aerobis (112)

Dins l'ecosistema vaginal el gènere *Lactobacillus* és el predominant (7, 11, 23, 46, 79, 106, 126, 151, 119, 167, 179, 182), i a més a més, té un paper important en la regulació i equilibri de la flora vaginal humana i en la protecció contra la colonització de patògens externs (7, 23, 30, 80, 105, 125, 141, 142, 167, 174).

La flora vaginal humana presenta variacions a llarg de la vida.

1.1. Composició de la flora vaginal des de la menarquia a la menopausa

Durant aquest període de la vida, la microflora de la vagina normal té una concentració de 10^8 a 10^9 UFC per gram de secreció. (179). *Lactobacillus* és el gènere dominant d'aquesta flora, encara que hi ha altres microorganismes pertanyents a unes 50 espècies que hi són presents (173). A més, en una

mateixa dona es troba més d'una espècie de *Lactobacillus* i també hi ha variacions d'espècies en el temps (11, 113, 157, 219)

1.1.1. Bacteris anaerobis

Durant aquest període, la flora bacteriana anaeròbia més freqüent està constituïda per *Lactobacillus anaerobis*. També s'hi troben cocs Gram positiu dels gèneres *Peptococcus* i *Peptostreptococcus*, així com bacils Gram negatiu dels gèneres *Bacteroides* i *Fusobacterium*.

1.1.2. Bacteris aerobis

Durant aquest període, la flora bacteriana aeròbia més freqüent està constituïda per *Lactobacillus aerobis*. També hi ha estafilococs, en especial *Staphylococcus epidermidis* (*S. aureus* és molt menys nombrós), estreptococs del grup viridans, estreptococs del grup D, enterococs, *Streptococcus agalactiae*, etc. Els bacils Gram negatiu hi són presents, però en molta menys concentració. S'hi poden trobar enterobacteris com *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., entre altres. També s'hi poden aïllar *Acinetobacter* spp. i *Pseudomonas* spp.

Altres bacteris aerobis com neissèries sapròfites, corinebacteris, *Gardnerella vaginalis*, es troben amb relativa freqüència i poden formar part de la flora vaginal normal.

1.1.3. Altres microorganismes

A la flora vaginal normal de la menàrquia a la menopausa, s'hi poden aïllar *Candida albicans* i altres llevats, quasi sempre del gènere *Candida* o afins (134, 201). Segons alguns autors, un 15-25% de les dones adultes tenen colonització assintomàtica per llevats (28, 207).

1.2. Flora vaginal humana prepuberal i postmenopàusica

La flora vaginal humana premenàrquica i postmenopàusica està bàsicament composta per la mateixa flora que colonitza l'epidermis de la zona genital i perineal, junt amb els microorganismes anaerobis, que segueixen essent els predominants en aquestes fases de la vida (82, 92, 206).

Durant les sis primeres setmanes de vida, els estrogens de la mare són presents a l'epiteli vaginal, aportant-li una fisiologia i microbiologia similar a la de l'epiteli vaginal de la dona adulta, on hi predomina *Lactobacillus*. Quan aquests estrògens són metabolitzats, es produeixen canvis en la flora vaginal, constituint la típica flora prepuberal (206).

La flora vaginal prepuberal és dominada pels microorganismes anaerobis, tant pels bacils Gram negatiu, en especial *Fusobacterium* spp., com pels cocs Gram positiu del gènere *Peptostreptococcus* (82). També s'hi troben estafilococs coagulasa negatius i altres bacteris d'origen fecal, especialment enterobacteris, com *E. coli*, i enterococs (206). *Lactobacillus* és menys freqüent, el seu percentatge d'aïllament oscil·la entre el 11 i el 20% comparat amb el 70 i el

92% de la flora vaginal de la dona en edat fèrtil (82, 112, 157). El pH vaginal és alt en aquesta fase de la vida (102).

En les dones postmenopàusiques, els microorganismes més freqüents són també els bacteries anaerobis, entre ells bacils Gram negatiu dels gèneres *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Bacteroides* i els cocs Gram positiu del gènere *Peptostreptococcus* (82). Respecte a la flora vaginal en edat fèrtil, durant la menopausa hi ha una reducció en el percentage d'aïllaments de *Lactobacillus* i *Staphylococcus*, un manteniment dels enterococs i un increment dels estreptococs del grup *viridans* (82). Els *Lactobacillus* es redueixen de manera notable, tot i així, encara superen el 49% dels aïllaments (82).

2. CARACTERITZACIÓ DEL GÈNERE *LACTOBACILLUS*

2.1. Caracterització i característiques metabòliques.

Classificació

Lactobacillus. Lac.to.ba.cil'lus. *Lacto*, *Lactis*: llet. *Bacillus*: barra, vareta petita.

Lactobacillus: barra petita de la llet

Albert Döderlein, al 1892, va publicar els seus estudis sobre la bacteriologia de la vagina durant l'embaràs. Va cultivar i estudiar microorganismes que ja havien estat descrits per altres investigadors deu anys abans. Va demostrar que

aquests microorganismes eren els predominants, i a la vegada els productors de l'àcid làctic vaginal i que podien inhibir el desenvolupament dels patògens, tant en medi de cultiu com en la vagina humana. S'els va anomenar bacils de Döderlein (197). No va ser fins dècades més tard, quan Stanley Thomas va postular que el bacil de Döderlein era *Lactobacillus*, concretament l'espècie *L. acidophilus* (197). A l'inici de la dècada dels seixanta, investigadors com Rogosa varen demostrar que el bacil de Döderlein, en realitat representava a diverses espècies de *Lactobacillus* (112).

Les primeres espècies de *Lactobacillus* que es varen identificar i classificar van ser *L. delbrueckii*, presentada per Leichman al 1896 i nomenada així en honor al bacteriòleg alemany Delbrück, *L. acidophilus* identificada per Moro al 1900, i *L. casei* identificada per Orla-Jansen al 1916 (101). Altres espècies s'han classificat més recentment, com *L. alimentarius* identificada per Reuter al 1983 (101) o la nova espècie *Lactobacillus* 1086V citada per Antonio *et al* en una publicació de 1999 (11).

La taxonomia del gènere *Lactobacillus* ha sofert modificacions al llarg del temps; ha estat i és una taxonomia difícil i canviant (11, 110, 219) on algunes espècies han passat a ser subespècies, i viceversa. Per exemple, en l'actualitat *L. bulgaricus* i *L. lactis* es consideren subespècies de *L. delbrueckii* (18), mentre que *L. casei* subesp. *ramnosus* ha estat elevat a espècie i anomenat *L. rhamnosus* sp. nov. (47).

Les característiques taxonòmiques del gènere *Lactobacillus*, segons diversos autors (2, 18, 31, 34, 79, 83, 101, 108, 110, 135, 148, 157, 214), podrien resumir-se en: el gènere *Lactobacillus*, pertany a la família *Lactobacillaceae* i compta amb una cinquantena d'espècies diferents. Són Eubacteris, que en general tenen forma bacilar, encara que alguns poden presentar forma de coc, o més allargats, o ser veritablement pleomòrfics. Són no esporulats. Poden ser anaerobis estrictes o anaerobis facultatius. Tenen necessitats complexes pel seu creixement, es poden aïllar en medis no selectius però es desenvolupen millor en medis selectius. Amb la cromatografia de gasos es detecta un gran pic corresponent a l'àcid làctic, el seu metabolit final més important. *Lactobacillus* en la tinció de Gram, és Gram positiu i en la tinció de Zhiel-Neelsen, no és àcid-alcohol resistent. La seva pared és la típica dels Gram positiu, contenint àcid teicòic i peptidoglicans (àcid N-acetilmuràmic, N-acetilglucosamina) enllaçats entre sí amb ponts de pentaglicina. Algunes espècies formen un biofilm al voltant de la pared. (57)

El seu contingut de guanina + citosina (G+C) és inferior al 50%. La majoria de *Lactobacillus* són in mòbils, i catalasa negatiu. També són esculina, nitrats, gelatina, indol i sulfhídric negatiu. Contenen els enzims peroxidassa i superòxid dismutassa, essent per tant, capaços de trencar les molècules de H_2O_2 i O_2 , respectivament.

Respecte als seus metabolits finals de la fermentació dels sucres, els *Lactobacillus* es divideixen en homofermentatius (quasi només produeixen un

producte metabòlic final) i en heterofermentatius (diversos productes metabòlics finals). Els homofermentatius aprofiten les hexoses, fermentant-les per la via Embden-Meyerhoff, i produeixen àcid làctic. En canvi els heterofermentatius, fermenten les hexoses per la via Embden-Meyerhoff, i produeixen àcid làctic, però a més poden fermentar les pentoses, gràcies a una fosforilasa induïble, i obtenir àcid làctic, àcid acètic i àcid fòrmic, entre altres. Aquests últims *Lactobacillus* també produeixen CO₂ i etanol.

Dins del gènere *Lactobacillus*, s'hi troben espècies homofermentatives obligatòries i heterofermentatives facultatives com: *L. plantarum*, *L. casei* subesp. *pseudopantarum*, *L. sake*, *L. curvatus*, *L. casei*, *L. salivarius*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*; *L. delbrueckii*, *L. jensenii*. També hi ha espècies heterofermentatives obligatòries com: *L. bifementans*, *L. sanfranciscensis*, *L. fermentum*, *L. reuteri*; *L. brevis*, *L. kefir*; *L. hilgardii*.

S'ha postulat que *L. acidophilus* més que una única espècie, és un complexe o grup d'espècies, format per: *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri* i *L. johnsonii* entre d'altres (110). Felten *et al* (47) divideixen aquest grup en dos subgrups: el subgrup *L. acidophilus* i el subgrup *L. gasseri*.

La producció d'àcid làctic és una característica de *Lactobacillus* i la seva excreció juga un paper fonamental dins l'equilibri de la flora vaginal humana.

Un altre metabolit que pot excretar *Lactobacillus*, i que també té la seva importància en la regulació de la flora vaginal, és el peròxid d'hidrogen, H₂O₂. (50, 84, 71, 105, 173, 219)

Hi ha controvèrsia a l'hora de senyalar l'espècie de *Lactobacillus* més freqüentment aïllada en la vagina humana en l'edat fèrtil. Diversos autors (22, 114, 116) postulen que és *L. acidophilus*. En canvi, en treballs més actuals i utilitzant una tècnica d'homologia del DNA, Antonio *et al* (11) demostren que en 215 dones on es va aïllar *Lactobacillus*, l'espècie més freqüent va ser *L. crispatus* i després *L. jensenii*. Aquests mateixos autors, en un treball posterior (219), d'una població de 101 dones no embarassades i utilitzant la mateixa tècnica, troben que l'espècie més freqüent és *L. jensenii* seguida molt d'aprop de *L. crispatus*. De tota manera, l'ecosistema vaginal és complexe (58, 157, 173, 219), la freqüència de les espècies que el componen, incluint *Lactobacillus*, varia amplament, i a més a més, fins dues tercers parts de les dones d'un estudi adquireixen o perden la colonització per *Lactobacillus* (219). Aquest canvi o variació en les espècies colonitzadores de la flora vaginal pot ser degut a factors com: els canvis hormonals al llarg d'un cicle menstrual, la dieta i factors geogràfics, la conducta sexual, els tractaments amb antibiòtics i espermicides, l'excreció de certes substàncies (H₂O₂, bacteriocines) que garanteixen la supervivència als bacteris que les produeixen, la diversitat en la metodologia dels treballs i les dificultats en les identificacions microbianes, en especial de *Lactobacillus*.

2.2. Infeccions per *Lactobacillus* i susceptibilitat als antimicrobians

Les espècies de *Lactobacillus* sempre han estat considerades com a no patògenes per a l'èsser humà. Rarament s'associen a infeccions, excepte quan hi ha factors predisponents en l'hoste, com una intervenció dental per càries, antibioticoteràpia d'ampli espectre, i en general, malalties on hi hagi una devallada del sistema immunitari. Llavors *Lactobacillus* pot arribar a causar una infecció. Per tant, es pot considerar a *Lactobacillus* com un microorganisme oportunista (2, 32, 54, 79, 107, 177, 189).

S'han descrit infeccions per *Lactobacillus* en la majoria de teixits. Una de les més freqüents és la infecció dental, amb o sense intervenció prèvia, també s'han descrit endocarditis, bacterièmies, meningitis, peritonitis, abscessos intraabdominals (intestinals, genitals,...), i pneumònies, entre d'altres (2, 15, 19, 32, 54, 68, 79, 107, 177, 189). Així mateix, s'han detectat infeccions nosocomials per *Lactobacillus* (150).

L'espècie més freqüentment implicada en la infecció humana és *L. acidophilus*. Però com ja s'ha assenyalat la taxonomia del gènere és canviant i pot induir a errors. També s'ha de remarcar que *L. acidophilus* és el més conegut, i se li poden atribuir infeccions, quan és realment una altra espècie la que provoca la infecció (107). En un treball recent, Felten *et al* (47), van aïllar *Lactobacillus* de

20 malalts immunodeprimits i van trobar que el 90% dels aïllaments pertanyien a l'espècie *L. rhamnosus*.

Bayer *et al* (19) descriuen que les endocarditis per *Lactobacillus* són difícils de tractar, i que hi ha discordàncies entre els resultats *in vitro* i *in vivo*, en el sentit que són microorganismes bastants susceptibles als antibiòtics *in vitro*, però molt costosos d'erradicar *in vivo*.

La susceptibilitat del gènere *Lactobacillus* als antibiòtics no depen de l'espècie (74), és a dir no hi ha un patró clar de resistències, que es pugui assignar com a característic i específic d'una o una altra espècie. A l'hora d'instaurar un tractament en una infecció per *Lactobacillus*, en general, s'ha de tenir en compte que són resistents a la vancomicina, i que les espècies anaeròbies obligades són sensibles a la gentamicina i resistents al metronidazol (19, 229).

A la literatura científica es troben diverses publicacions on es documenta la manca de susceptibilitat de *Lactobacillus* a vancomicina, en especial de soques aïllades en infeccions humanes (15, 68, 107, 118). S'ha assenyalat una relació entre espècie, producció de H₂O₂ i susceptibilitat a la vancomicina, així les soques de *L. rhamnosus*, no produeixen H₂O₂ i són resistents a vancomicina (CMI ≥ 256 µg/mL), en canvi les soques de *L. crispatus* i la majoria de les del grup *L. acidophilus*, produeixen H₂O₂ i són susceptibles a vancomicina (CMI < 4 µg/mL) (47).

La susceptibilitat a la vancomicina pot ser utilitzada com una eina més d'identificació. Així Hamilton-Miller *et al* (74), en una col·lecció de 40 soques de *Lactobacillus* de suplementos alimentaris, van observar que les 16 soques de *L. acidophilus* i les dues de *L. delbrueckii* eren susceptibles a la vancomicina, mentre que les 15 soques de *L. rhamnosus* hi eren resistents

Herra *et al* (79) van estudiar la susceptibilitat de 59 soques de *Lactobacillus*, aïllades de la vagina de dones sanes, a cefaclor, amoxicil.lina-àcid clavulànic, ciprofloxacina i claritromicina, pels mètodes de dil.lució en agar i E-test. Van constatar que el 100% de les soques eren susceptibles a claritromicina i amoxicil.lina-àcid clavulànic, i que en canvi, només un 20% eren sensibles a cefaclor i un 4% a ciprofloxacina.

La terapèutica antimicrobiana d'elecció en les infeccions produïdes per *Lactobacillus* està constituïda per la penicil.lina G o ampicil.lina amb o sense un aminoglicòsid. Com a alternativa s'utilitzen els macròlids. En les infeccions greus o quan el pacient té una malaltia de base, s'aconsella donar una pauta amb dos antibiòtics. (62, 68).

Pel tractament de les infeccions del tracte urinari, especialment les produïdes per enterobacteris, s'aconsella triar entre els diversos antibiòtics d'elecció els que afectin menys a *Lactobacillus*, per tal de preservar al màxim la flora vaginal (73, 79). Ciprofloxacina, nitrofurantoïna i cefaclor són els que alteren menys a *Lactobacillus*, i per tant, constitueixen els antimicrobians de primera elecció pel

tractament de la infecció del tracte urinari, ja que com a conseqüència de la no alteració de la flora vaginal, s'evitaran recurrències.

3. INFECCIONS DEL TRACTE URINARI

La infecció del tracte urinari (ITU) es defineix com la presència i multiplicació de microorganismes en el tracte urinari, amb el subseqüent dany dels teixits adjacents (37). Els símptomes i signes d'ITU, en especial de la infecció del tracte inferior, en dones adultes són la clàssica disúria, urgència, freqüència, tenesme vesical, amb dolor suprapúbic i generalment l'orina és tèrbola. Si és una ITU del tracte superior acostuma a anar acompanyada de febre, calfreds, malestar general, nàusees, vòmits i dolor lumbar. (37, 200). La ITU recurrent es defineix com la successió de tres o més episodis d'ITU en un any (210).

Les ITU són un problema sanitari de primera magnitud. En la part mitja de la vida, l'ITU afecta molt més a les dones que als homes. Es calcula que el 50% de les dones hauran tingut un episodi d'ITU durant els seus primers 30 anys, i d'aquestes un 20%-30% patiran recurrències (183, 196, 211). Cada any, entre sis i set milions de dones nordamericanes entre 20 i 30 anys, visitaran el seu metge per una ITU (53, 86). Foxman *et al* van calcular que les ITU provocaven de mitjana uns 6,1 dies de símptomes, 1,2 dies de restricció d'activitat i 0,4 dies d'enllitament. Les ITU constitueixen la primera causa de bacterièmia per bacils

Gram negatiu en malalts hospitalitzats i el 40% de totes les infeccions nosocomials (37).

En les dones immunocompetents i sense anormalitats del tracte urinari, s'han descrit diversos factors de risc per patir una ITU, com són les relacions sexuals recents, la menopausa, la vaginosis bacteriana, els antibiòtics d'ampli espectre, el diafragma amb espermicida (nonoxinol-9), el fenotip no secretor dels grups sanguinis ABH (86, 212), la micció post coital retardada i altres descrits recentment, com patir la primera ITU abans dels 15 anys i tenir una mare amb història d'ITU recurrent (21).

Els bacteris que provoquen la majoria d'ITU tenen el seu origen en la flora fecal (7, 10, 109, 159, 183, 190). Els uropatògens, en especial els enterobacteris, tenen avantatges de creixement respecte als *Lactobacillus*, com són un temps de generació més curt i menys exigències nutricionals (172), que constitueixen capacitats que els uropatògens compten a favor seu.

La teoria més acceptada per explicar la seqüència fisiopatològica de l'ITU és: primer l'arribada de l'uropatogen, quasi sempre d'origen fecal, a la vagina; seguida de l'adhesió del microorganisme al seu epitel·li i per tant, de la colonització de la mateixa, fet que trenca l'equilibri de la microflora vaginal i fa desaparèixer el seu paper protector. En tercer lloc, es produirà la colonització de la periuretra, l'ascensió per l'uretra, l'arribada a la bufeta i la multiplicació del microorganisme, fet que comporta la bacteriúria i pot avocar o no a la ITU.

Com en moltes infeccions, l'establiment de signes i símptomes i el grau de severitat dependrà de la virulència del microorganisme i de l'estat de l'hoste. Així, durant totes aquestes etapes hi ha factors de l'hoste que impedeixen la colonització de l'uropatogen, com són l'osmolaritat i el mateix fluxe de l'orina, la secreció d'anàlegs dels receptors (glicoproteïnes, oligosacàrids) que atrauen als bacteris posseïdors de fimbries tipus 1 i S i l'exercici de mol·lècules bactericides.

En resposta a l'interacció de l'uroepiteli amb les adhesines, el lipopolisacàrid i l'hemolisina, entre altres, la mucosa del tracte urinari secreta substàncies quimotàctiques, com la interleuquina 8 (IL-8) que atrauen i provoquen la migració dels leucòcits neutròfils des dels vasos sanguinis fins a l'epiteli urinari, també secreta substàncies activadores de la resposta de fase aguda i de la febre, com la interleuquina 6 (IL-6). A més, els neutròfils arribats secreten més IL-8 i IL-6, augmentant l'efecte d'aquestes interleuquines, i altres interleuquines inflamatòries, com la interleuquina 1 (IL-1) i el factor de necrosi tumoral (TNF). Aquestes últimes interactuen sobre l'epiteli urinari induint-li la secreció de més IL-8 i IL-6.

També es desencadena una resposta immunitària cel·lular (linfòcits T, cèl·lules Natural Killer) i una resposta específica (anticòsos IgA i IgG, d'excreció local o sistèmica). Aquesta resposta immunitària serà més intensa com més greu sigui la ITU (1, 190).

Quan la infecció afecta a la part alta del tracte urinari, la inflamació es desencadena a ronyó i pelvis renal, i és seguida d'una resposta sistèmica amb febre, increment de la proteïna C reactiva, leucositosi i símptomes més generalitzats. A la cistitis la reacció inflamatoria és restringeix al tracte urinari inferior, amb símptomes més locals. A la bacteriuria asimptomàtica hi ha signes inflamatoris locals però de poca magnitud i no arriben a fer simptomatologia (1, 190).

Un factor clau en la patogènesi de la ITU és l'habilitat dels microorganismes uropatògens d'adherir-se a les cèl.lules de l'epiteli vaginal i així iniciar la colonització d'un nou espai. (159, 166, 171). Diversos estudis, en dones amb ITU recurrents, han demostrat que la majoria d'episodis són precedits per una colonització de la vagina per part de l'uropatogen (115, 209, 227), i a més, aquesta colonització és produïda per un nombre elevat de microorganismes i és persistent en el temps (209).

Fowler *et al* (52) constaten que les dones amb ITU recurrents posseeixen un grau de colonització vaginal per enterobacteris i enterococs significativament més alt que les dones control. En canvi, no constaten diferències significatives en el grau de colonització vaginal per d'altres microorganismes.

S'ha comprovat que en ITU recurrents, hi ha una prolongada colonització del periné amb enterobacteris que són les mateixes soques que després

provoquen la infecció (115, 166, 183, 210). Comparant soques d'*E. coli* causants d'ITU recurrents amb soques causants d'un únic episodi, Russo *et al* (183) van demostrar, amb tècniques cromossòmiques, que les soques causants del primer episodi d'ITU eren diferents entre sí, però que quasi el 70% de les que provocaven recurrències, eren les mateixes que havien ocasionat l'episodi anterior. A més, en la majoria de malaltes varen trobar aquestes soques en la flora fecal. És a dir, varen demostrar que aquestes recurrències eren produïdes per reinfeccions endògenes, ja que entre episodis l'urocultiu era negatiu.

El microorganisme més freqüentment aïllat en les ITU, en especial en les IU sense factors predisponents, és *E. coli* (37, 53, 98, 151, 160). Amb molta menys freqüència, s'hi aïllen bacils dels gèneres *Klebsiella* i *Proteus*. Un percentatge més petit dels aïllaments però no despreciable, correspon a cocs Gram positiu com *S. saprophyticus*, *S. aureus* i *S. epidermidis*. (37, 200). *Proteus* s'aïlla en les IU de portadors de sondes permanents o en malalts amb litiasi renal. Certs microorganismes són més sovint aïllats en ITU complicades, com *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterococcus* i *Candida* (37).

4. VULVOVAGINITIS PER CÀNDIDA

La vulvovaginitis (VV) es caracteritza per prurit, irritació, eritema, edema fins a pústules i fisures a la vulva i la vagina, juntament amb disuria, dispareunia,

canvis en les secrecions vaginals i alteració del pH vaginal. La VV pot tenir diverses etiologies, sent la infecciosa la més important. De les VV infeccioses la més freqüent és la vaginosi bacteriana (40-50% de tots els casos de VV), seguida de la VV per cànrida (fins un 20-25% del total), i de la VV per *Trichomonas* (15-20%). Hi ha altres causes de VV, com les no infeccioses: química, al·lèrgica, atròfica, traumàtica, etc... (175, 180, 202, 203).

La VV per cànrides (VVC) es diagnostica pels seus símptomes i signes característics, un pH vaginal normal, un examen microscòpic i cultius positius a llevats (202, 203).

Alguns autors postulen que per passar de l'estatus de soca colonitzadora al de soca virulenta, es a dir, capaç de provocar una VVC, el llevat ha d'estar en la forma de pseudohifa que és la forma més invasiva i virulenta, i s'ha de trobar en una concentració $>10^6$ UFC per mililitre de fluxe vaginal. La forma pseudohifa segrega més enzims proteolítics, els quals trenquen enllaços cel·lulars i afavoreixen la invasió de l'epiteli. (28, 134, 213).

Encara que en la majoria de vegades la causa de la VVC és desconeguda; la VVC, i en especial la recurrent, pot està associada a tractaments amb antibiòtics d'ampli espectre, a l'embaràs, a l'ús de contraceptius amb alt contingut d'estrògens, a la teràpia estrogènica, a la diabetis mal controlada, a tractaments esteroidals, a la immunodepressió i a factors genètics (28, 49, 76, 89, 152, 201, 202, 203, 207). Otero *et al* (144) no van trobar relació entre el

contraceptius orals i la VVC. Altres grups (64) troben que el consum d'antibiòtics durant l'embaràs no s'associa amb un risc significatiu de desenvolupar VVC.

El 75% de les dones pateixen un episodi, com a mínim, de vulvovaginitis per càndida durant la seva vida, un 45% tindran un segon episodi, i fins un cinc per cent passaran a ser VVC recurrents (28, 61, 175, 176, 180). La recurrència és defineix com quatre o més episodis de VVC en un any (202).

A principis dels anys 70, l'equip de Peeters *et al* (147) va estudiar les poblacions microbianes en dones amb VVC i en dones sense vaginitis. Van trobar que les dones del grup de VVC tenien menys colonització per *Lactobacillus* i més per *C. albicans* que les dones control. No van apreciar cap diferència entre els grups respecte a altres espècies de llevats, estreptococs, estafilococs i enterobacteris.

En canvi, altres equips investigadors (76, 81, 115, 134, 142, 198, 201) han observat que les VVC es poden associar a patrons de flora vaginal normal o intermitjos i sense que s'hi demostrï una devallada del número de *Lactobacillus*. Es a dir, que en la VVC s'aïllen *Lactobacillus*, del que es pot deduir que *Lactobacillus* no protegeix suficientment, donat que els llevats han colonitzat, els *Lactobacillus* no han competit i els llevats han experimentat un sobrecreixement i han provocat la infecció. Per tant, la conclusió d'aquests autors és que *Lactobacillus* no protegeix contra l'adquisició de la VVC.

Hi ha controvèrsia en demostrar la connexió entre el reservori intestinal de *Candida* i la colonització, la infecció o la reinfecció vaginal per aquest microorganisme (84). Grups de recerca, com el de Shalev *et al* (198) troben una forta correlació entre el cultiu rectal positiu a *Candida* i la colonització vaginal per aquest llevat. Altres com el de Ross *et al* (180) postulen que la colonització vaginal juga un paper menys important en la patogènesi de la infecció, i que el que sembla més determinant és la susceptibilitat de l'individu al microorganisme.

L'espècie més freqüentment aïllada en la VVC és *Candida albicans* (28, 42, 84, 144, 175, 176, 202). *C. glabrata* i *C. tropicalis* s'aïllen cada vegada amb més freqüència, són més resistents als antifúngics i tenen més tendència a recidivar (176).

5. LACTOBACILLUS, UN AGENT PROBIÒTIC

Al segle XIX, Metchnikoff va observar la longevitat de molts dels habitants de la regió dels Balcans, i ho va atribuir a la seva dieta rica en iogurt, posant-li l'etiqueta de aliment saludable (197). El iogurt és el resultat d'una interacció entre els bacteris de l'àcid làctic i els productes de la llet. El iogurt pot contenir bacteris vius o estar pasteuritzat. Només els iogurts que tenen microorganismes vius, poden ser utilitzats com a "probiòtic" (42, 48).

En referència a l'aparell genito-urinari, un probiòtic es defineix com una preparació de microorganismes vius usats intravaginalment per restituir l'equilibri ecològic de la flora i previndre infeccions. (127). Hi ha altres definicions més genèriques i pensades per l'aparell gastro-intestinal, que consideren un probiòtic com un suplement alimentici fet de microorganismes vius que afecten beneficiosament l'hoste, millorant-li el balanç microbià (56, 70). Les dues són definicions que fan èmfasi en la vessant profilàctica.

També es ressenya la definició d'agent bioterapèutic com microorganismes vius utilitzats tant per tractar com per previndre malalties, interaccionant amb la microecologia natural de l'hoste (40, 124). Aquesta definició incorpora el concepte terapèutic.

En l'actualitat sembla que alguns autors donen suport a aquesta definició més terapèutica i postulen que per definir les característiques referents al tractament, és més adient el terme bioterapèutic que no pas el terme probiòtic (45).

S'enten per interferència bacteriana les interaccions entre dos o més bacteris que porten a establir una relació no infectant amb l'hoste. Aquest terme només cobreix les reaccions positives, que faciliten la prevenció d'infeccions. La interferència bacteriana en l'aparell genito-urinari i amb *Lactobacillus* com a protagonista ha estat defensada per Reid *et al* (163).

Lactobacillus és una espècie bacteriana que a la literatura biomèdica es considera GRAS (de l'anglès "Generally Recognized As Safe") (2, 3, 33, 184) pel seu escàs poder patològic.

Lactobacillus té una llarga història d'utilització com a profilàctic o guaridor en malalties gastrointestinals i urinàries. Metchnikoff es considerat com el primer que va proposar utilitzar soques de *Lactobacillus* per restaurar la flora gastrointestinal alterada, a l'any 1890 (127). Cinc anys abans Cantani havia instil·lat *Bacterium termo* als pulmons de malalts, per tractar la tuberculosi (124). L'any 1915, Newman va publicar els seus treballs basats en l'utilització de cultius de *Lactobacillus* per tractar infeccions de la bufeta (127). Al 1928, Thomas va demostrar que els *Lactobacillus* vaginals provenen del tracte gastrointestinal i que aquesta colonització era induïble administrant el microorganisme per via oral. A més va observar la desaparició de *Lactobacillus* de la vagina de dones amb gonorrea, i va eliminar el gonococ instilant a la vagina cultius de *Lactobacillus* en dues malalties (197).

Malgrat aquesta antiga i llarga fama de *Lactobacillus* com agent bioterapèutic, a la literatura hi ha escassos treballs contrastats que avalin aquest fet en l'aparell genito-urinari (162, 165). Això podria ser degut a que no tots els *Lactobacillus* expresen les mateixes propietats (166) i per tant, és important la correcta caracterització de les soques i la posterior selecció d'aquelles que compleixen les capacitats i propietats que faran d'elles un agent probiòtic eficaç. No totes les soques dels productes comercials que s'oferixen com a probiòtic, han estat

correctament caracteritzades i seleccionades, i en molts casos hi manquen les concentracions i les espècies bacterianes anunciades pel laboratori fabricant (72, 90, 162)

El que queda palés en la literatura biomèdica és que per que un producte bioterapèutic sigui realment efectiu, s'han de caracteritzar correctament les soques bacterianes (3, 31, 65, 162, 173, 184) i s'ha d'estudiar la seva farmacocinètica i les propietats i característiques que donen avantatge a unes soques enfront d'altres de la mateixa espècie o d'espècies diferents. En definitiva, s'han d'establir uns criteris de selecció (3, 56, 65, 124, 127, 141, 142) per garantir que el probiòtic sigui la millor soca possible per un sistema microecològic determinat; és a dir, la que posseeixi el màxim de característiques favorables per desenvolupar-se en una flora i en un contexte fisiològic concret.

Un resum de les característiques (3, 56, 65, 124, 162, 173, 184) que ha de tenir un bacteri probiòtic, i concretament *Lactobacillus*, es detalla seguidament:

Facilitat de creixement in vitro.

Facilitat de conservació i estabilitat en la formulació química.

Tolerància a les substàncies que trobarà en el lloc de colonització.

Capacitat d'adhesió i competició pels receptors d'adherència dels patògens (secreció de biosurfactants).

Capacitat de supervivència, colonització i simbiosi en el biofilm de la flora local.

Capacitat d'estabilitzar i equilibrar la flora local.

Producció de substàncies antimicrobianes i de substàncies tòxiques per a altres organismes (H₂O₂, bacteriocines).

Temps de generació relativament curt.

Competició pels nutrients.

Estimulació de la immunitat.

Seguretat per l'hoste. Escassa o nul·la patogenicitat.

S'ha d'afegir un altre criteri, que és el de compatibilitat i d'especificitat entre probiòtic i hoste. Per actuar com a probiòtic de la flora vaginal humana, s'hauran de caracteritzar i seleccionar soques de *Lactobacillus* d'origen vaginal i humà, i rebutjar les soques d'altres orígens, com l'animal o el làctic industrial. (23, 142, 163, 166).

Un dels principals camps de la medicina on *Lactobacillus* s'ha assajat amb relatiu èxit com agent probiòtic és el tracte gastrointestinal, tant en la vessant profilàctica com en la terapèutica. En especial, en les gastroenteritis de diversos orígens (69, 93, 222) com la gastroenteritis del viatger (155), i després d'infeccions per *Clostridium difficile* (66, 136). També s'ha documentat el benefici experimental i clínic de l'utilització de *Lactobacillus* en la intolerància a la lactosa (63, 185), o en el tracte gastrointestinal superior (32, 40). En prematurs s'ha assajat amb èxit moderat (130). Reid *et al* han establert la dosi mínima i la via d'administració del probiòtic: 10⁸ UFC de *Lactobacillus* per dia i per via oral (158).

Un altre camp prometedor és el de la utilització de *Lactobacillus* com a potenciador de la immunitat o com immunomodulador sistèmic o i/o local (88, 106, 120, 121, 149, 192), estimulant entre altres, la secreció d'anticossos, γ -interferon, TNF- α i IL-1, i inclús com a vector d'antígens per a immunitzar (33, 154), i en concret com a vector d'immunitzacions en la mucosa vaginal (182).

També s'ha estudiat la possibilitat de fer servir altres microorganismes diferents a *Lactobacillus*, i altres bacteris d'acid làctic, com a probiòtics. Així, McFarland *et al* (123) i Buts *et al* (26) varen treballar amb *Saccharomyces*, Henriksson *et al* (77) amb bifidobacteris i Sprunt *et al* (208) amb estreptococs.

6. ESTUDIS *IN VIVO* AMB *LACTOBACILLUS* COM A PROBIÒTIC DE L'APARELL GENITOURINARI

Així com hi ha molta experiència en l'utilització de *Lactobacillus* com a probiòtic del tracte gastro-intestinal, tant d'adults com d'infants, on diferents estudis clínics han evidenciat els avantatges, l'eficàcia i la seguretat d'aquest genere bacterià com a probiòtic (32, 40, 63, 66, 69, 93, 136, 155, 222); l'experiència és menor en l'aparell genito-urinari, concretament en ITU i VVC.

6.1. *Lactobacillus* com a probiòtic en ITU

La majoria d'estudis publicats en l'actualitat utilitzant *Lactobacillus* com a probiòtic en les ITU, han estat realitzats per un equip canadenc (25), amb la soca de *Lactobacillus casei* var *rhamnosus* GR-1, posteriorment reclassificada i anomenada *Lactobacillus rhamnosus* GR-1. En el primer estudi, realitzat amb poques malaltes, es va utilitzar *L. rhamnosus* GR-1 en càpsules, col·locant-ne dues per setmana intravaginalment. Aquesta pauta no va evitar la colonització per enterococs, però el més encoratjador és que va evitar la colonització per enterobactèries i no hi van haver reaccions indesitjables. En estudis posteriors (164, 170) van trobar que *L. rhamnosus* GR-1 havia reduït les recurrències de les pacients amb ITU, i més recentment (173) han demostrat que amb supositoris vaginals de *L. rhamnosus* GR-1 o bé amb supositoris amb estimuladors del creixement de *Lactobacillus*, s'aconsegueix reduir la taxa d'ITU durant un any.

Així doncs, aquest equip investigador dedueix que *Lactobacillus* provoca una millora en la clínica de les ITU i no presenta reaccions indesitjables. Pensen que tant *L. rhamnosus* GR-1 com *L. fermentum* RC-14 o la combinació d'ambdós pot tenir un paper molt important en la protecció contra les ITU (173).

En canvi, Baerheim *et al* (14) van publicar un estudi doble ceg i randomitzat, de malaltes amb ITU recurrent, a les quals es va implantar un supositori vaginal comercial amb la soca de *L. casei* var *rhamnosus*, dos cops a la setmana. Van

concloure que no hi havia diferència significativa en la taxa d'ITU o en l'incidència d'ITU mensual, entre el grup tractat amb *Lactobacillus* respecte el grup tractat amb placebo. En conclusió, no es va poder provar que *Lactobacillus* es comportés com a probiòtic.

En un estudi recent, Kontiokari *et al* (109) van demostrar que la soca de *Lactobacillus* GG no va ser efectiva per prevenir recurrències en dones amb ITU, ja que aquestes van presentar percentatges de recurrència similars al grup control. En aquest estudi, els probiòtics van administrar-se via oral, podent ser la raó per la qual no es va induir la colonització de les àrees vaginal i periuretral.

Aquestes diferències entre els estudis poden ser degudes a que tant les soques de *Lactobacillus* emprades com la metodologia eren diferents.

6.2. *Lactobacillus* com a probiòtic en VVC

Pel que fa a l'utilització de *Lactobacillus* com a probiòtic en les VVC, els estudis clínics han estat més nombrosos, amb més malaltes i més equips. Malgrat això, en la majoria no s'ha pogut demostrar que *Lactobacillus* provoqués una millora en la clínica de la VVC. S'han utilitzat diverses vies d'administració del *Lactobacillus*, des de supositoris vaginals, fins a iogurt administrat via oral o inoculat directament a la vagina.

Hilton *et al* en el seu primer treball (84), un estudi creuat on les malaltes ingerien iogurt durant sis mesos, van observar una reducció en la taxa d'infeccions per *Candida* en el grup que va consumir iogurt i un augment en la colonització per *Candida* en el grup que no va consumir-lo. La soca de *Lactobacillus* del iogurt no estava caracteritzada i el número de pacients va ser baix. En el següent estudi (85m), van aplicar supositoris vaginals de *Lactobacillus rhamnosus* GG (dos al dia durant una setmana) i van trobar que gràcies al probiòtic es va restaurar la flora vaginal normal, i va millorar la clínica de les pacients.

L'equip de Shalev (198) va publicar un estudi, de disseny creuat, amb iogurts ingerits per via oral, on no es van demostrar diferències significatives entre el grup tractat i el placebo, respecte a la VVC o la colonització per *C. albicans*, però sí un increment de la taxa d'aïllament de *Lactobacillus* a vagina i recte, i una reducció del número d'episodis de vaginosis bacteriana. Van trobar una forta correlació entre cultiu rectal positiu a *C. albicans* i la colonització vaginal per aquest llevat.

L'equip canadenc de Reid (27), recentment ha publicat un estudi realitzat amb 29 dones sanes, de les quals a 15 es van inocular càpsules intravaginals amb la combinació de *L. rhamnosus* GR-1 i *L. fermentum* RC-14, i a 14 es van inocular càpsules intravaginals amb la soca comercial *L. rhamnosus* GG. Van comprovar la major persistència a la vagina de les soques *L. rhamnosus* GR-1 i *L. fermentum* RC-14. No es van descriure efectes indesitjables.

L'equip de Hillier està treballant amb la soca de *L. crispatus* CTV-005, la qual està essent estudiada en un ampli nombre d'adolescents per prevenir les recurrències de la vaginosi bacteriana. Els resultats d'aquets estudis es preveuen per l'any 2003. El mateix equip havia demostrat prèviament que *L. crispatus* CTV-005 es capaç d'establir una colonització permanent de la vagina (12).

7. LACTOBACILLUS: CAPACITAT D'ADHERÈNCIA A L'EPITELI VAGINAL I BLOQUEIG DE L'ADHÈRENCIA DELS UROPATÒGENS

Encara que algun investigador (178) argumentava que no s'havia demostrat la relació causa-efecte entre l'adhesió bacteriana i l'inici d'una infecció, la majoria del pensament científic va a favor de que tant per als patògens com per *Lactobacillus*, el primer pas per la colonització de l'ecosistema vaginal és l'adherència del microorganisme al seu epíteli (7, 30, 51, 78, 117, 141, 159, 163, 166, 205, 216, 228).

S'ha observat que no tots els *Lactobacillus* s'adhereixen amb la mateixa intensitat (59, 166), i com ja s'ha dit, l'adherència a les cèl.lules de l'epíteli

vaginal és una de les propietats bàsiques que ha de presentar *Lactobacillus*, per a ser considerat un agent bioterapèutic.

També s'ha demostrat que la capacitat d'adherència de *Lactobacillus* als epitelis, té molta relació amb l'espècie de l'hoste, així un *Lactobacillus* d'origen porcí, s'adhereix millor, i amb més quantitat, als epitelis porcins que als epitelis d'altres espècies animals (23, 141, 163, 166). A més, hi ha especificitat d'epitelis dins d'una mateixa espècie, així els *Lactobacillus* d'origen vaginal s'adhereixen més a l'epiteli vaginal humà que els *Lactobacillus* d'altres orígens (23, 86, 141, 163, 228).

Ja a l'any 1976 Svanborg Edén *et al* (216) varen demostrar que les soques d'*E. coli* aïllades de l'orina de malalts amb pielonefritis simptomàtica s'adhereixen amb més intensitat a les cèl.lules de l'epiteli vaginal que les soques d'*E. coli* aïllades de persones amb bacteriuria asimptomàtica. Des d'aleshores, es considera a l'adherència com un factor de virulència.

Reid *et al* (166), opinen que per la realització d'estudis d'adherència amb *Lactobacillus*, és millor utilitzar cèl.lules de l'epiteli vaginal que cèl.lules de l'epiteli uretral, ja que és a la mucosa vaginal on colonitzarà l'uropatogen, i és allà on s'haurà de bloquejar la seva adherència.

7.1. Assaigs d'adherència i de bloqueig de l'adherència

La capacitat de *Lactobacillus* per adherir-se i bloquejar l'adherència de soques de patògens urinaris, genitals i enterals, s'ha demostrat efectiva en diversos epitelis, des del vaginal humà (23, 29, 141) fins a l'uretral (166), passant per epitelis de rosegadors (153), de micos (80, 227), d'aus (55, 97), de porcs (21, 78, 145, 205) i en algunes línies cel.lulars (51, 67, 188, 218), i inclús en diverses superfícies i dispositius, en especial els materials plàstics (131, 167, 168, 224, 225)

En l'àmbit urogenital, les espècies d'uropatògens amb les quals s'ha probat la capacitat de bloqueig de l'adherència exercida per *Lactobacillus*, són en general els enterobacteris, en especial *E. coli*, però també *Proteus mirabilis* i *Klebsiella pneumoniae*. També s'ha assajat amb *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *Enterococcus* spp. i menys vegades amb *Candida* spp., *Gardnerella vaginalis* i *Mobiluncus curtisii* (23, 29, 80, 141, 142, 227).

Els resultats han estat diferents, segons els mètodes emprats en els assaigs i segons l'origen dels *Lactobacillus* i de les cèl.lules utilitzades. S'ha demostrat que hi ha soques de *Lactobacillus* capaces de bloquejar l'adherència a les cèl.lules vaginals d'alguns, o molts, uropatògens; en canvi, altres soques són incapaces d'exercir aquest bloqueig. Aquest fet confirma la necessitat de caracteritzar correctament les capacitats de les soques de *Lactobacillus* candidates a probiòtic.

7.2. Tipus de bloqueig de l'adherència

Segons la majoria d'autors (23, 30, 97, 141, 142, 166, 205), hi ha tres maneres mitjançant les quals *Lactobacillus* pot bloquejar l'adherència dels microorganismes a l'epiteli vaginal, i són:

Bloqueig per Exclusió; Primer s'inocula la soca de *Lactobacillus*, la qual s'adhereix a una superfície, i després s'inocula la soca d'uropatogen. El que ja està establert prova d'excloure al segon en arribar. Ha estat el mètode més utilitzat en aquest treball, ja que simula la situació normal de la vagina quan arriba un uropatogen disposat a establir una IU. *Lactobacillus* bloqueja l'adherència del microorganisme nouvingut, *Lactobacillus* exclou a l'uropatogen.

Bloqueig per Desplaçament; primer s'inocula la soca d'uropatogen dins l'assaig, es permet la seva adhesió, i després s'inocula la soca de *Lactobacillus*. El que arriba en segon lloc prova de desplaçar al que ha arribat primer.

Bloqueig per Competència; el *Lactobacillus* i l'uropatogen són inoculats al mateix temps dins l'assaig. Hi ha una competència entre els dos microorganismes per poder bloquejar l'adherència de l'altre, les dues soques han arribat a l'hora.

7.3. Relacions: hemaglutinació, adherència i bloqueig de l'adherència

En un treball anterior Andreu *et al* (7) van dividir en tres grups, una colecció de 56 *Lactobacillus* aïllats de vagina humana, segons la seva capacitat d'hemaglutinació. Els *Lactobacillus* del Grup I van aglutinar els hematies d'ovella, conill i humans a pH 6,2 i perdien aquesta capacitat després de diversos rentats. S'adherien poc a les CEV. Els *Lactobacillus* del Grup II ho van fer amb els hematies d'ovella i humans, però no amb els de conill a pH 5,9, 6,2 i 7 i conservaven aquesta capacitat després de diversos rentats. S'adherien en gran nombre a les CEV i varen ser identificats, utilitzant una tècnica d'hibridació de DNA-DNA, com *L. jensenii*. Els *Lactobacillus* del Grup III van aglutinar els hematies d'ovella, conill i humans a pH 6,2 i 5,9 i conservaven aquesta capacitat després de diversos rentats. S'adherien en gran nombre a les CEV i varen ser identificats com *L. crispatus*.

L'hemaglutinació és una propietat expresada per algunes soques de *Lactobacillus* que es relaciona amb la capacitat d'adhesió (7). Així els *Lactobacillus* amb més capacitat d'hemaglutinació acostumen a adherir-se amb més intensitat a les cèl.lules de l'epiteli vaginal.

S'ha demostrat que hi ha relació entre la capacitat d'adherència i la capacitat de bloqueig de l'adherència de patògens (141, 142, 166). Així, els *Lactobacillus*

amb més capacitat d'adherència acostumen a tenir uns resultats millors en els assaigs de bloqueig de l'adhesió en front de la majoria de patògens.

Són múltiples els components de la superfície bacteriana que participen en l'adherència dels bacteris a les superfícies de contacte. Alguns d'aquests components han estat molt ben caracteritzats i altres molt poc. Respecte a *Lactobacillus*, els coneixements que es tenen sobre el mecanisme d'adherència són escassos. Alguns autors han postulat que la mol·lècula principal responsable de l'adhesió és l'acid lipoteicòic (30), altres han demostrat que és un glúcid (23, 56) i molts més han trobat que és una proteïna (78, 226). Inclús en un mateix bacteri, *L. jensenii* s'ha trobat que un carbohidrat és la principal mol·lècula de l'adherència, però que una lipoproteïna explicaria la seva capacitat d'auto-agregació (23).

8. LACTOBACILLUS COM A INHIBIDOR DEL CREIXEMENT MICROBIÀ

És abastament conegut que hi ha microorganismes que poden inhibir el creixement d'altres microorganismes, tant del mateix gènere o espècie, com d'altres més allunyats filogenèticament (16, 59, 95, 103, 204, 221). S'ha demostrat que *Lactobacillus* és capaç d'inhibir el creixement de diverses soques d'uropatògens i altres microorganismes (16, 59, 100, 128, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 166, 169, 195, 199, 204).

Com en els assaigs de bloqueig de l'adhesió, en els assaigs d'inhibició del creixement, els *Lactobacillus* mostren diferents intensitats d'inhibició d'un uropatogen (59, 128, 166, 204). Així, un *Lactobacillus* pot inhibir el creixement d'una soca d'*E. coli* i no afectar el creixement d'un *P. mirabilis*; o bé, un mateix microorganisme patògen pot ser inhibit per una soca de *Lactobacillus* i no ser-ho per una altra. Aquesta variació pot ser deguda a la heterogenicitat de les substàncies que intervenen en l'inhibició del creixement (59, 204).

Entre els treballs realitzats per diversos autors hi ha diferències importants, encara que això podria ser explicat pels diferents mètodes utilitzats i per les variants en les soques estudiades (128). Per això, a l'hora de comparar treballs d'inhibició de creixement bacterià s'han d'estudiar els materials i mètodes amb profunditat.

8.1. Metodologia dels assaigs d'inhibició del creixement

La capacitat d'inhibició del creixement de *Lactobacillus* en front diversos patògens s'ha assajat segons diferents mètodes, tant en medi sòlid com en medi líquid. Es tracta d'enfrontar els *Lactobacillus* contra els patògens, incubar-ho i comparar els resultats amb els controls. Aquesta activitat inhibidora es pot mesurar qualitativament (inhibeix molt, inhibeix poc o no inhibeix) i quantitativament. Per quantificar s'han de fer dil·lucions seriades del

Lactobacillus i comprobar fins a quina dil.lució hi ha inhibició del creixement. Aquest mètode és anomenat de la “dil.lució crítica”.

En medi sòlid existeixen diverses varietats metodològiques, que s'agrupen en mètodes directes i diferits (16). En el directe s'enfronten al mateix temps els *Lactobacillus* (cèl.lules viables o filtrats, la majoria de vegades) contra els uropatògens, s'incuben i s'observen els resultats. En el mètode diferit s'enfronten el *Lactobacillus* (cèl.lules viables) contra els uropatògens, però separats per una incubació; per exemple, en l'assaig en bicapa d'agar (17, 100, 141, 142, 195) els *Lactobacillus* s'inoculen en l'agar, es deixa solidificar, es deposita una segona capa d'agar, s'incuba, i es sembla el patogen sobre la superfície de la segona capa. També en medi sòlid, s'han descrit variants dels mètodes abans explicats, com són: la difusió en agar des d'un disc impregnat amb el sobrenadant de *Lactobacillus* (128); la difusió des de pous carregats amb el sobrenadant de *Lactobacillus* (35, 59, 96, 100, 146, 195, 199, 217, 223), la difusió en agar des d'una taca carregada de *Lactobacillus* (35, 38. 195) i l'assaig amb més de dues capes d'agar (43, 60).

En medi líquid existeixen menys varietats metodològiques. Bàsicament consisteixen en enfrontar dins un brou de cultiu els *Lactobacillus* contra els uropatògens. Els *Lactobacillus* s'utilitzen en forma de cèl.lules bacterianes viables o la majoria de vegades, s'utilitzen filtrats d'un sobrenadant on han crescut i multiplicat *Lactobacillus* i on han excretat certes substàncies. Es compara la terbolesa dels assaigs amb la dels controls i els resultats es

mesuren qualitativament (gens, poc o molt tèrbol) o quantitativament (espectofotòmetres o colorímetres) (36, 141, 142, 146, 194, 195, 199). La majoria de vegades el medi líquid utilitzat és un brou de cultiu, però també s'ha utilitzat orina (128).

8.2. Revisió dels assaigs d'inhibició del creixement

En la literatura científica hi ha molts treballs que demostren la capacitat de *Lactobacillus* d'inhibir el creixement d'altres microorganismes.

Estudiant *Lactobacillus* d'origen intestinal humà, l'equip de Silva (199) va observar que *Lactobacillus* era capaç d'inhibir el creixement tant de cocs Gram positiu com de bacils Gram negatiu, entre ells *E. coli*, *Salmonella* spp i *Pseudomonas* spp., tant en medi sòlid com en líquid. Van demostrar que aquesta inhibició del creixement no era deguda a l'acció de l'àcid làctic o acètic. Van postular que la substància activa era una microcina, substància similar a les bacteriocines, però d'un pes molecular molt inferior (menys de 1.000 Daltons), termoestable i resistent a les proteases. L'equip de Drago (41), utilitzant *Lactobacillus* d'origen intestinal humà i assaigs de difusió en agar des de pous, van comprovar que els *Lactobacillus* inhibien el creixement d'alguns enteropatògens com *E. Coli*, *Salmonella* spp i *Vibrio cholerae*.

Amb *Lactobacillus* d'origen genital humà, l'equip de Reid (172) va demostrar amb assaigs de difusió en agar des de disc i de difusió en bicapa, que

Lactobacillus era capaç d'inhibir el creixement d'*E. coli* i que aquesta inhibició no era deguda al pH. També l'equip de McGroarty (128) va observar la inhibició del creixement d'*E. coli* per part de *Lactobacillus* en assaigs en medi sòlid (difusió en agar des de disc i bicapa) i en líquid, i van detectar que la substància activa era termolàbil. L'equip de McLean (129), mitjantçant assaig en bicapa d'agar i de difusió en agar des de pous van demostrar que *Lactobacillus* era capaç d'inhibir el creixement de *G. vaginalis*. En els assaigs en bicapa, la majoria de soques de *Lactobacillus* van poder inhibir el creixement de totes les soques de *Gardnerella*, en canvi en els assaigs de difusió en agar des de pous, menys soques de *Lactobacillus* van mostrar activitat inhibidora del creixement. Al caracteritzar la substància activa, van catalogar-la de termoestable.

Altres equips han demostrat que soques de *Lactobacillus* d'origen alimentari no làctic, poden inhibir el creixement de diferents patògens. *Lactobacillus* càrnics mitjantçant el mètode de la difusió en agar des de disc van inhibir soques de *S. aureus* i *Listeria monocytogenes*. (204), o mitjantçant la difusió en agar des de pous van inhibir soques de *S. aureus*, *Enterococcus faecium* i *L. monocytogenes* (59).

8.3. Factors inhibidors del creixement

Des dels primers assaigs es va comprovar que els filtrats dels sobrenadants on havien crescut els *Lactobacillus*, per tant sense cèl.lules viables d'aquest

bacteri, mantenien la seva activitat inhibidora del creixement (16). D'on es conclou, que les substàncies responsables de la inhibició del creixement són excretades per *Lactobacillus*.

Diversos autors han observat que, el/s factor/s determinant/s de la inhibició del creixement tenen poca relació amb l'àcid làctic, àcid acètic i baix pH (41, 59, 128, 141, 142, 172, 195, 199, 204), encara que aquests tenen la seva importància *in vivo* i colaboren, junt amb els factors inhibidors, a que una soca de *Lactobacillus* pugui inhibir el creixement d'altres microorganismes.

9. BACTERIOCINES EXCRETADES PER *LACTOBACILLUS*

Les bacteriocines son pèptids o proteïnes amb activitat antimicrobiana excretades per determinats microorganismes. L'espectre d'acció antimicrobià és ample i depen de cada bacteriocina (95). Les bacteriocines excretades per *Lactobacillus* juguen un paper fonamental en el mecanisme d'inhibició del creixement exercit per aquest microorganisme.

9.1. Definició i classificació de les bacteriocines

9.1.1 Deficinió

Encara que l'home, des de fa segles, d'una manera casual o inconscient hagi utilitzat substàncies antimicrobianes excretades per microorganismes per conservar els aliments, no va ser fins al 1988 que la FDA va donar la categoria de GRAS a la nisina, una bacteriocina excretada per *Streptococcus lactis*. (60). Hi ha moltes bacteriocines detectades, caracteritzades, "registrades i patentades", en especial les produïdes pels bacteris de l'àcid làctic (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, etc..). Les bacteriocines són d'utilitat comercial com a biopreservatius dels aliments (60). Segons Klaenhammer et al. aquestes substàncies són una expressió de l'adaptació i supervivència d'alguns bacteris a ecosistemes molt competitius (103).

Les definicions de bacteriocina han anat variant al llarg dels anys. A l'inici eren més estrictes, tancades respecte a les espècies de microorganismes inhibits, però a mesura que s'anava estudiant i aprofundint, es van obrir les definicions al mateix temps que s'ampliava el ventall d'espècies bacterianes que podien ser inhibides.

Així Barefoot *et al* (17), van definir les bacteriocines excretades per un microorganisme, com proteïnes o pèptids que mostren una activitat bactericida contra espècies microbianes properes. Onze anys més tard, es proposa la definició de bacteriocina, com proteïnes bacterianes que inhibeixen microorganismes pertanyents a espècies relacionades i també a altres

espècies no relacionades (146), o bé com a compostos bactericides proteïnacs actius contra altres microorganismes, però en especial contra els propers (94).

La classificació també ha anat canviant, i ampliant-se, després de que cada equip investigador proposés la seva visió per fer una ordenació més racional i adaptada als resultats dels seus experiments

9.1.2. Classificació

Es presenta una classificació, basada fonamentalment en dos treballs de Klaenhammer i Jack, respectivament (95, 104), encara que s'hi afegixen conceptes exposats per altres autors que matisen als dos primers (6, 13, 35, , 44, 96, 100, 193). Segons aquesta classificació les bacteriocines es divideixen en quatre classes:

Classe I: Formada per compostos protèics de baix pes mol.lecular (< 5 kDa), que contenen aminoàcids inusuals, modificables postranslacionalment, en especial lantionina, metil-lantionina, dehidroalanina, D-alanina etc., per això també són anomenades lantibiòtics. La nisina és la bacteriocina més coneguda de la Classe I, altres són lacticina 481, subtilina, Pep5, epidermina, gallidermina, etc.,.

Classe II: Agrupa a les bacteriocines més comuns, com la pediocina, lactacina, sakacina, lactococcina, etc... No són modificables postranslacionalment. Són de baix pes mol.lecular (<10 kDa). Contenen d'uns 30-60 aminoàcids, i són els

aminoàcids habituals (no lantionina). Aquests pèptids tenen diversos graus d'hidrofobicitat i són termoestables. Les bacteriocines de Classe II es divideixen en tres subclasses, IIa, IIb i IIc. En la subclasse IIa, les bacteriocines tenen una seqüència N-terminal distintiva i s'assemblen a la pediocina (sakacina A, leucocina A). En la subclasse IIb, les bacteriocines tenen dos components peptídics, la interacció dels quals forma el complex actiu antimicrobià (lactococcina G, lactacina F). En la subclasse IIc, les bacteriocines tenen un grup sulfhidril funcional (lactococcina B).

Classe III: Són proteïnes grans, de pes molecular > a 30 kDa. Són termoestables. Inclouen molts enzims extracel·lulars bacteriolítics, com les hemolisines i les muramidases.

Classe IV: Són bacteriocines complexes, en les quals a la part protèica s'hi afegeixen residus lipídics essencials o hidrats de carbó. Aquesta unió és indispensable per desenvolupar la seva activitat

9.2. Mecanismes d'acció de les bacteriocines

Classe I: El mecanisme d'acció principal és la formació de canals o poros a través de la membrana citoplasmàtica. Per aquests canals hi ha influxe i efluxe de mol·lècules. La teoria de que el mecanisme d'acció és provocar grans ruptures de la paret, similar a l'acció dels detergents, està poc avalada. Altres

mecanismes d'acció són la inhibició de la biosíntesi de la paret cel·lular i de mol·lècules com el DNA, RNA, proteïnes i polissacàrids (95)

Classe II: Els mecanismes són menys coneguts. El mecanisme d'acció principal és la desestabilització de la membrana citoplasmàtica, per increment de la permeabilitat, provocant influxe i efluxe de mol·lècules, en diferents modalitats segons cada bacteriocina. Per a la Subclasse IIa, s'ha contemplat adicionalment la formació de canals a través de la membrana (13, 44, 95).

S'ha suggerit que el possible mecanisme de resistència a les bacteriocines per part de bacils Gram negatiu i cocs Gram positiu, pot estar associat a les propietats de barrera de la membrana externa i de la paret cel·lular.

9.3. Bacteriocines-like

Les bacteriocines-like, són substàncies produïdes i excretades per determinats bacteris de l'àcid làctic. Aquestes substàncies tenen caràcter peptídic, d'uns 30 a 60 residus amino àcids, són catióniques, bàsiques i específiques per a cada espècie de bacteri. Les bacteriocines-like mostren dues activitats: de feromona i antimicrobiana. Actuen com a feromona respecte a les bacteriocines, es a dir, que indueixen la producció de la bacteriocina en una soca determinada, i sense la participació d'aquest pèptid senyalitzador no es produeix la bacteriocina. De vegades, a més a més, mostren una activitat antimicrobiana, com una bacteriocina, inhibint el creixement d'espècies bacterianes properes i també

d'espècies allunyades filogenèticament. Per aquesta raó també s'anomenen bacteriocina-like (6, 24, 75).

La colicina és la bacteriocina-like més coneguda. Els mecanismes d'acció per aconseguir l'inhibició del creixement bacterià són similars als de les bacteriocines. Els principals mecanismes d'acció són: d'una banda obrir canals iònics a la membrana citoplasmàtica, provocant influxes i efluxes de molècules i d'altra banda expressar una activitat de nucleasa, un cop ha entrat dins la cèl·lula diana, trencant enllaços entre nucleòtids (95).

S'ha publicat que el pèptid plantaricina A, classificat actualment com a bacteriocina-like, actua com a feromona induint la síntesi de bacteriocines en una soca de *L. plantarum* (39, 75), encara que plantaricina A per sí mateixa, ja té activitat inhibidora (6).

10. QUANTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE L'ACTIVITAT INHIBIDORA DE LES BACTERIOCINES EXCRETADES PER *LACTOBACILLUS*

10.1. Quantificació

La quantificació de l'activitat inhibidora del creixement, s'estudia bàsicament mitjançant els assaigs de difusió en agar des de pous, en els quals a la primera capa d'agar s'inocula una soca indicadora, es sella o no amb una segona capa més prima d'agar estèril i en els pous s'inoculen diferents concentracions de substàncies inhibidores (35, 59, 96, 100, 146, 195, 199, 217, 223). S'ha demostrat que la variació en la densitat de la soca indicadora pot afectar l'activitat de les substàncies inhibidores (20). També pot estudiar-se mitjançant assaigs en bicapa d'agar (17, 100, 141, 142, 195) i en medi líquid (36, 141, 142, 146, 194, 195, 199), utilitzant plaques de microtitulació (microtiter) (43, 44, 75, 96) o tubs (199).

Per facilitar i millorar la quantificació d'aquesta substància inhibidora, els assaigs es realitzen amb un concentrat de la mateixa. Per obtenir-lo, el sobrenadant on ha crescut una determinada soca de *Lactobacillus*, és filtrat per eliminar els *Lactobacillus* viables. Aquest filtrat, que contindrà el/s factor/s inhibidor/s (143), es concentra i/o purifica per diferents mètodes:

- ultrafiltració: per purificar la substància i estimar el seu pes mol.lecular, segons el tall de kDa de la membrana del dispositiu d'ultrafiltració (17, 53, 143)
- i/o liofilització (132, 143, 220)
- i/o precipitació amb productes químics (per exemple: sulfat d'amoni) i dialisi (16, 96, 122, 132, 195, 223, 230)

•i/o cromatografia, també per separar i purificar segons el seu pes molecular (filtració sobre gel) i segons el caràcter hidrofílic (fase inversa) (96, 100, 132, 217)

La finalitat d'aquesta concentració és la de treballar amb menys quantitats i carregar amb facilitat els pous de l'assaig de difusió. Amb aquests concentrats es fan dil·lucions seriades. Es deixa difondre uns minuts a +4°C i després s'incuba durant 24 hores, a 37°C, en una atmòsfera aeròbica amb un 5% de CO₂. Passat aquest període, es mesura l'halo d'inhibició al voltant dels pous.

L'activitat inhibidora es quantifica definint el títol com el corresponent a la dil·lució més alta que mostra una inhibició completa del creixement de la soca indicadora. En general, aquesta capacitat inhibidora s'expressa en unitats d'activitat per mililitre (UA / mL) (16, 35, 38, 59, 91, 94, 100, 223).

10.2. Tractament amb enzims lítics

Una variant dels assaigs de detecció de l'activitat inhibidora, és el tractament previ del concentrat amb enzims lítics, per comprobar si es manté aquesta activitat o es perd després dels tractaments. Aquests enzims són quasi sempre proteases, lipases i glicossilases o amilases. Si amb el tractament previ amb enzims es manté l'activitat inhibidora, es que el factor inhibidor no es una substància susceptible de ser trencada per l'enzim en qüestió. Així, es pot descartar el caràcter de la mol·lècula segons l'enzim emprat. Els enzims

utilitzats, amb més freqüència són: tripsina, proteïnasa K, pepsina, pronasa, lipasa, catalasa, glicosilasa, amilasa i lisozima (16, 36, 43, 59, 96, 132, 143, 195, 199, 220, 223, 230).

A més a més, es poden tractar amb els diversos enzims les diferents fraccions d'ultrafiltració, amb la finalitat de conèixer quina és la fracció activa i quina perd la seva activitat després del tractament enzimàtic.

10.3. Caracterització de les bacteriocines mitjançant SDS-PAGE

L'electroforesi en gel de poliacrilamida, amb diferents gradients de sodi-dodecil-sulfat ha estat utilitzada, amb tres objectius principals:

- Comprovar el caracter protèic de les substàncies presents en el sobrenadant esteril d'un cultiu de *Lactobacillus*
- Comprovar el resultat del tractament amb enzims lítics, és a dir, si conserva o no el patró de bandes electroforètiques després del tractament enzimàtic.
- Observar si hi ha diferències entre els resultats dels diferents tractaments enzimàtics, és a dir, si hi ha pèrdua de bandes electroforètiques en les mostres de *Lactobacillus* després del tractament enzimàtic.

Els mètodes utilitzats per realitzar el SDS-PAGE, han estat desenvolupats en base a diversos articles publicats (99, 111). S'han provat diverses variants tècniques, com augmentar o disminuir el % d'acrilamida/bisacrilamida dels gels preparador i separador, i realitzar PAGE sense SDS (ni tan sols el 10% habitual).

Per validar la tècnica de SDS-PAGE com a mètode de tractament amb enzims lítics s'utilitza l'albumina com a control intern. Si les condicions són les correctes, en els carrils amb albumina apareix una banda, la qual desapareix en els carrils amb albumina tractada.

II. OBJECTIUS

L'objectiu, en sentit ampli, d'aquest treball és el de seleccionar les soques de *Lactobacillus* més ben dotades per ser utilitzades com agents bioterapèutics. Els objectius immediats seran els d'estudiar, en una col·lecció de soques de *Lactobacillus*, aquelles característiques que es requereixen per ser agents bioterapèutics, és a dir:

1. Averiguar de la col·lecció estudiada, quines soques de *Lactobacillus* són les més capaces d'adherir-se a les cèl·lules de l'epiteli vaginal.
2. Determinar de la col·lecció estudiada, quines soques de *Lactobacillus* són les més capaces de bloquejar l'adherència d'altres microorganismes a les cèl·lules de l'epiteli vaginal.
3. Comprovar si la capacitat de bloqueig de l'adherència, es correlaciona amb altres capacitats.
4. Averiguar de la col·lecció estudiada, quines soques de *Lactobacillus* són les més capaces d'inhibir el creixement d'altres microorganismes.
5. Comprovar si els factors responsables de la inhibició del creixement són excretats per *Lactobacillus*.
6. Comprovar si és factible la concentració del/s factor/s inhibidor/s del creixement

7. Estudiar les característiques del/s factor/s inhibidor/s del creixement.

8. Comprovar si la capacitat d'inhibir el creixement, es correlaciona amb altres capacitats.

L'objectiu últim i definitiu serà fabricar òvuls vaginals amb una combinació de les soques de *Lactobacillus* seleccionades que mostrin característiques complementàries. Estudiar la seva persistència *in vivo* a la vagina humana i posteriorment, realitzar estudis clínics enfocats a la prevenció de les infeccions del tracte urinari i de determinades infeccions del tracte genital com és la vulvovaginitis candidiàsica.

III. RESULTATS

ARTICLE 1

Osset J, Bartolomé RM, García E, Andreu A. Assessment of the capacity of *Lactobacillus* to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cells. J Infect Dis **2001**; 183: 485-91.

ARTICLE 2

Osset J, Bartolomé RM, García E, Andreu A. Papel de *Lactobacillus* como factor protector de la candidiasis vaginal. Med Clin (Barc) **2001**; 117: 285-8.

PÓSTER 1

Osset J, Bartolomé RM, Andreu A. Inhibitory activity of *Lactobacillus* against uropathogens. En: Abstracts of the 97th American Society for Microbiology General Meeting. Miami Beach, 4-8 de maig, **1997**; p. 83 (resum B-315).

INHIBITORY ACTIVITY OF VAGINAL *LACTOBACILLUS* AGAINST UROPATHOGENS.

J. Osset, R.M. Bartolomé, A. Andreu.*

Hospitals Vall d'Hebron. Barcelona. Spain.

Our goal is to determine whether lactobacilli (LB) possesses the ability to inhibit the growth of uropathogens (UP), in order to study how they could prevent UTI. We performed an assay measuring the inhibition of the growth, using 15 different human vaginal LB strains (4 strains from our former hemagglutination Group I, 4 from Group II and 7 from III) against 4 *E coli* strains, 3 *P. aeruginosa*, 3 *P. mirabilis*, 3 *K. pneumoniae*, 3 *S. aureus*, 3 *S. saprophyticus*, 3 *Enterococcus* spp. and 3 *Candida* spp.. All UP came from women with UTI and under 45 years old.

In the solid assay, only one LB strain (AA 35 from Group III) shown an inhibitory activity able to inhibit the growth of all UP except 2 *E. coli* and 3 *Candida*. The other Group III strains showed different degrees of activities, but not as good as AA 35. Some Group I LB showed moderately inhibition in front of some UP. LB from Group II has not shown any inhibitory power. In the liquid assay, a very strong inhibitory activity was shown in all Group III LB in front of every UP, except *Enterococcus* which was inhibited moderately, and *Candida* which was not inhibited at all. Also with this assay the majority of LB Group II and I showed a good inhibitory power.

We concluded that: (1) LB from Group III and I have more inhibitory activity in front of UP than LB from Group II. (2) The inhibitory activity is expressed better in liquid assays than in solid assays. (3) For the moment, the best candidates to be used as a probiotic are Group III LB, since previously they have showed good adherence to vaginal cells, and now show high inhibitory activity.

Quasi tots els apartats que hi ha en aquest póster, s'han publicat posteriorment més ampliats en l'article que s'inclou, corresponent al *Journal of Infectious Diseases* de l'any 2001. Per aquesta raó i per no duplicar la informació, només es tractarà l'apartat del SDS-PAGE que únicament es va presentar a la comunitat científica en forma de póster i no es va incloure a la publicació.

OBJECTIUS

Comprobar si les substàncies inhibidores excretades per *Lactobacillus* són de caràcter protèic.

MATERIAL I MÈTODES

Soques: S'han utilitzat sobrenadants filtrats de 15 soques de *Lactobacillus*, quatre del Grup d'Hemaglutinació I (LB5, LB21, LB30 i LB55), quatre del Grup II (LB25, LB56, LB59 i LB68) i set del Grup III (LB11, LB28, LB35, LB38, LB39, LB41 i LB65).

SDS-PAGE: S'ha realitzat amb el sistema d'electroforesi Protean II (BioRad). Com a controls de mostra s'ha utilitzat el brou MRS sense inocular. Com a controls de pes mol.lecular, s'ha utilitzat un estandard comercial (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range; BioRad), amb un rang de 6,5 a 200 kDa. Les concentracions d'acrilamida/bis-acrilamida en el gel separador i el preparador han estat del 12% i 4%, respectivament. Les tincions s'han realitzat amb blau de Coomasie.

RESULTATS

En els carrils amb mostra de filtrat de *Lactobacillus* s'han observat bandes entre la franja de 30 i 60 kDa, que han estat més especialment intenses en les

mostres corresponents als *Lactobacillus*: LB11, LB35, LB38, LB41 i LB65 del Grup III, i a la corresponent al *Lactobacillus* LB5 del Grup I. A més, les mostres dels *Lactobacillus* LB11, LB35, LB38 i LB41 presenten una banda intensa, d'uns 45 kDa, que no s'observa en les altres soques. Les bandes dels *Lactobacillus* del Grup II han estat més tènues. LB55, del Grup I, ha presentat una banda entre els 116 i 200 kDa. Els *Lactobacillus* LB30 i LB68 no han presentat cap banda. En els carrils de control no s'ha detectat cap banda.

DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

Els *Lactobacillus* LB5, LB11, LB35, LB38, LB41 i LB65, que havien demostrat un potent poder inhibidor en els assaigs d'inhibició del creixement dels uropatògens, tant en medi sòlid com en líquid, han mostrat bandes entre 30 i 60kDa. Aquestes bandes han estat menys intenses en els *Lactobacillus* del Grup II, en general poc inhibidors del creixement, així com en la resta de *Lactobacillus* dels Grups I i III. Les soques amb menys poder inhibidor LB30 i LB68, no han mostrat cap banda. Aquests fets suggereixen que la/les substància/es inhibidora/es són de caràcter protèic.

PÓSTER 2

Osset J, Bartolomé RM, Andreu A. Inhibitory activity and adherence blockage of vaginal *Lactobacillus* against *C. albicans*. En: Program and Abstracts of International Congress of Sexually Transmitted Diseases and Research. Sevilla, 19-22 d'octubre, **1997**; p. 174 (resum P 671).

INHIBITORY ACTIVITY AND ADHERENCE BLOCKAGE OF VAGINAL *LACTOBACILLUS* AGAINST *C. ALBICANS*

J. Osset, RM Bartolome, A. Andreu

Microbiology Dept. Hospitals Vall d'Hebron. Barcelona. Spain.

Objective: Our goal is to determine whether lactobacilli (LB) possesses the ability to inhibit the growth of *C.albicans*, as well as to block its adhesion to vaginal epithelial cells (VEC), in order to prove that could prevent vaginal candidiasis.

Methods: We devised 2 assays. The first one measure the inhibition growth of *C.albicans*, using 15 different human vaginal LB strains (4 from our former haemagglutination Group I, 4 from Group II and 7 from III) against 3 *C. albicans* strains. A solid and liquid assay was performed. The second consisted of an adherence blocking assay, using VEC collected from 2 volunteers, 15 LB strains and 1 *C.albicans*. The blocking effect was determined by comparing the mean of *C.albicans* attached to 50 VEC with and without the addition of LB.

Results: *Growth inhibition assay:* In liquid assay LB from Group III showed a low inhibition activity, mean 0.42 (range 0-2); whereas LB from Group II and I showed a better degree of activity, mean 0.75. In the solid assay none of LBs from Group III, II and I inhibited the growth of *C.albicans*, mean 0.

Adhesion blocking assay: 5 LB strains from Group III showed a significant blockage of the adherence of *C.albicans* to VEC, whereas this interference was only produced by 2 LB strains from Group I and 1 strain from Group II.

Conclusions: (1) LB have a very low inhibitory activity in front of *C.albicans*. (2) The majority of strains from Group III are able to block in some degree the adherence of *C.albicans* to VEC. On the contrary, this blockage was only observed in few strains from Groups I and II. (3) Our results suggest that vaginal LB do not seems to play a significant role in the prevention of vaginal candidiasis.

Tots els apartats que hi ha en aquest póster, s'han publicat posteriorment i molt més ampliats en l'article corresponent a Medicina Clínica, de l'any 2001. Per aquesta raó i per no duplicar la informació, s'ha pensat adient no exposar àmpliament aquest póster.

PÓSTER 3

Osset J, Bartolomé RM, Andreu A. Estudio del bloqueo que *Lactobacillus* ejerce sobre la adhesión de los uropatógenos al epitelio vaginal. En: Programa y Resúmenes del VIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Palma de Mallorca, 24-27 de maig, **1998**; p. 214 (resum 22-9).

ESTUDIO DEL BLOQUEO QUE *LACTOBACILLUS* EJERCE SOBRE LA ADHESIÓN DE LOS UROPATÓGENOS AL EPITELIO VAGINAL.

J. Osset*, RM Bartolomé, A. Andreu.

Servei de Microbiologia. Hospitals Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona.

Objetivos: Estudiar la capacidad que poseen diferentes cepas de *Lactobacillus* (LB) para bloquear la adhesión de distintos uropatógenos (UP) a las células del epitelio vaginal (CEV).

Métodos: CEV, lavadas y congeladas, de 2 voluntarias. 15 cepas de LB aisladas de vagina humana, agrupadas en anteriores ensayos según su poder hemaglutinante y adhesivo: 4 LB del Grupo I, 4 del Grupo II y 7 del Grupo III. 7 UP aislados en mujeres con infección urinaria: 1 *E. coli*, 1 *P. mirabilis*, 1 *K. pneumoniae* y 1 *P. aeruginosa*, 1 *S. aureus*, 1 *S. saprophyticus* y 1 Enterococo. El efecto bloqueante se determinó por comparación de las medias de los UP adheridos a 50 CEV preincubadas o no con LB. A la comparación de medias, en cada ensayo, se le asignó un valor: 1 si la diferencia resultó estadísticamente significativa ($p < 0,05$) y 0 si resultó no significativa. Se calculó una media de los valores para cada cepa y Grupo de LB.

Resultados: La capacidad de bloquear la adhesión de los BGN a las CEV fue: para LB Grupo III 0,82 y para LB Grupo II y I 0,81. *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* fueron bloqueados por las 15 cepas de LB, mientras que *E. coli* fue bloqueado por 13 y *P. mirabilis* por 6. Si se analizan los LB del Grupo III, su actividad no fue uniforme ya que todos bloquearon a *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, mientras que únicamente 2 bloquearon a *P. mirabilis*. La capacidad de bloquear la adhesión de los CGP a las CEV fue: para LB Grupo III 1 y para LB Grupo II y I 0,83. *S. saprophyticus* fue bloqueada por los 15 LB mientras que *S. aureus* y Enterococo fueron bloqueados por 13. Los LB del Grupo III bloquearon la adhesión de todos los CGP. Las medias obtenidas al analizar conjuntamente BGN y CGP fueron: Grupo III 0,91 y Grupos II y I 0,82.

Conclusiones: (1) LB Grupo III presentaron la mayor capacidad bloqueadora, seguidos del Grupo I y Grupo II. (2) El poder bloqueante de LB fue mayor frente a CGP que a BGN (3) Al ser la actividad bloqueadora de la adhesión vaginal, uno de los requisitos exigidos a un LB para ser utilizado como probiótico, ciertos LB del Grupo III parecen los candidatos más idóneos para ello.

Tots els apartats que hi ha en aquest póster, s'han publicat posteriorment i molt més ampliats en l'article corresponent al *Journal of Infectious Diseases*, de l'any 2001. Per aquesta raó i per no duplicar la informació, s'ha pensat adient no exposar àmpliament aquest póster.

PÓSTER 4

Osset J, García E, Bartolomé RM, Andreu D, Valero ML, Andreu A.
Caracterización de las sustancias antibióticas excretadas por *Lactobacillus*.
Enferm Infecc Microbiol Clin **2000**; 18 (supl 1): 7 (resum 23).

CARACTERIZACIÓN DE SUSTANCIAS ANTIBIÓTICAS EXCRETADAS POR *LACTOBACILLUS*.

Osset J., E. García, R.M. Bartolomé, ¹D. Andreu, ¹ML Valero, *A. Andreu.

Servei de Microbiologia. Hospitals Vall d'Hebron. Barcelona. ¹Departament de Química Orgánica. Universitat de Barcelona.

Objetivos: Determinar el perfil de ciertas sustancias con poder antimicrobiano, excretadas por *Lactobacillus* (LB), mediante la caracterización de su peso molecular, estabilidad frente a distintas temperaturas, períodos de tiempo y diferentes enzimas líticas.

Métodos: Las cepas de LB (LB11 y LB35) se cultivaron en caldo MRS, este se esterilizó por filtración (0,22 μ m) y se fraccionó por ultrafiltración (membrana de 5 kDa). 1 mL de cada fracción (total, inferior y superior a 5 kDa) se liofilizó y se resuspendió con 100 μ L de PBS o de tampones para lisis enzimática. La actividad de las diferentes fracciones fue determinada mediante la medición del halo de inhibición del crecimiento de *E. coli* EC16, en un ensayo de difusión en placa de agar columbia a partir de pocillos inoculados. Se realizaron ensayos tras el tratamiento de las muestras a 100° C, 1 año de conservación y enzimas como pronasa, pepsina, tripsina, proteinasa K, glicosilasa y lipasa. Se practicó SDS-PAGE con albúmina, con y sin tratar mediante distintas enzimas proteolíticas, para comprobar las condiciones de lisis.

Resultados: Las sustancias excretadas por estos LB resultaron ser de un peso molecular < 5 kDa. No hubo pérdida de actividad después de tratarlas a elevadas temperaturas, durante largos períodos de tiempo, ni con enzimas proteo, gluco y lipolíticas. Las condiciones de reacción fueron correctas, puesto que la banda de 70 kDa, correspondiente a albúmina, desaparecía de las muestras tratadas con enzimas líticas.

Conclusiones: Estas dos cepas de LB han sido previamente caracterizadas por nosotros y presentan propiedades requeridas para ser utilizadas como probióticos. La(s) sustancia(s) que secretan presenta(n) un perfil que podría corresponder a péptidos o sustancias relacionadas.

Tots els apartats que conté aquest póster, no han estat publicats en forma d'article a cap revista científica. Per aquesta raó, s'exposen detalladament a continuació.

OBJECTIUS

L'objectiu és el de determinar el perfil d'algunes substàncies amb poder antimicrobià, excretades per *Lactobacillus*, mitjançant la caracterització del seu pes molecular, la naturalesa química i l'estabilitat enfront diverses temperatures i diferents períodes de temps.

MATERIAL I MÈTODES

Soques:

Per aquest estudi es varen seleccionar les soques de *Lactobacillus* LB11 i LB35 que pertanyen al Grup d'Hemaglutinació III, caracteritzat pel nostre equip (7) i que posseeixen una gran activitat inhibidora del creixement microbià (138, 139, 140). Els assaigs d'inhibició del creixement microbià s'havien fet en medi sòlid i líquid. En medi sòlid, *Lactobacillus* LB11 havia inhibit el creixement de 3 dels 8 patògens: de forma completa a *Pseudomonas aeruginosa* PA05, i de forma parcial a *Staphylococcus aureus* SA11 i a *Enterococcus* spp. E15; *Lactobacillus* LB35 havia inhibit de forma completa el creixement de tots els patògens, excepte a *Candida albicans* Y17, essent aquest *Lactobacillus* LB35 l'únic capaç d'inhibir el creixement de la soca d'*Escherichia coli* EC16. En medi líquid, la soca LB11 havia obtingut percentatges de transmitància superiors al 70% en front totes les soques, excepte *Proteus mirabilis* PM01, *Enterococcus* E15 i *C. albicans* Y17; la soca LB35 va aconseguir uns percentatges de

transmitància superiors al 70% en front totes les soques, excepte *Klebsiella pneumoniae* KP08, *Enterococcus* E15 i *C. albicans* Y17.

Abans de la seva utilització en els diferents assaigs, les soques de *Lactobacillus* va ser cultivades en brou MRS, incubant-se a 37° C, en un 5% de CO₂, durant 48 hores en un primer cultiu i durant 24 hores en un segon subcultiu. La soca d'*E. coli* EC16, utilitzada com a control, va ser cultivada en brou Cervell-Cor, incubant-se a 37° C, en atmòsfera aeròbica, durant 24 hores.

Fraccionament per ultrafiltració:

El segon subcultiu de *Lactobacillus* va ser esterilitzat per filtració (0,22 µm, Millipore) i fraccionat per ultrafiltració. Primer i només per estandaritzar la tècnica d'ultrafiltrat, es va utilitzar una membrana que deixava passar substàncies de pes mol.lecular inferior a 10 kDa (Ultrafree 0,5 - Biomax 10, Millipore). Posteriorment es va utilitzar una membrana de 5 kDa (Ultrafree 15 - Biomax 5, Millipore), amb la qual es van obtenir dues fraccions: la inferior a 5 kDa i la superior a 5 kDa de pes mol.lecular, a més de la Total sense fraccionar. Posteriorment es van liofilitzar alíquotes d'un mL de cada una de les tres fraccions. El concentrat resultant de la liofilització es va resuspendre en 100 µL de PBS o 100 µL dels tampons adients per a cada reacció de lisi enzimàtica, obtenint-se dil.lucions 1:10. Aquestes dil.lucions es van conservar a -24° C fins als assaigs de difusió en agar des de pous o de tractament enzimàtic.

Assaig de difusió en agar des de pous:

La capacitat d'inhibició del creixement microbià exercida per les dil.lucions dels liofilitzats dels sobrenadants fraccionats i totals dels cultius de *Lactobacillus*, es va determinar medint l'halo d'inhibició del creixement de la soca indicadora *E. coli* EC16, mitjançant l'assaig de difusió en agar des de pous.

Medi: Columbia agar base (Difco) + 0,5% d'extracte de llevat (BBL).

1a Capa: Es fonen 20 mL del medi, s'atempera a 50° C. S'inoculen 1×10^4 UFC/mL d'*E. coli* EC 16. S'agita i es dispensa en una placa de Petri. Es deixa solidificar.

2a Capa: Es fonen 7 mL del mateix medi, es dispensen sobre la 1a capa. Es deixar solidificar.

Pous: Es practiquen de vuit a nou pous de 9 mm diàmetre. A cada pou es dispensen 100 µL de la fracció tractada. Com a control, en un pou de cada placa es dispensa la mateixa quantitat de fracció, sense tractar.

Incubació: Per afavorir la difusió de la substància inhibidora dins l'agar, s'incuba la placa a 4° C, durant 2 hores. Posteriorment s'incuba a 37° C, en un 5% de CO₂, durant 24 hores.

Lectura: A les 24 hores es mesura el diàmetre de l'halo d'inhibició del creixement de la soca indicadora *E. coli* EC16, al voltant de cada pou on s'ha inoculat la substància inhibidora excretada pel *Lactobacillus*. Es considera que hi ha inhibició del creixement, quan el diàmetre d'halo inhibitori és superior a 11 mm o similar al diàmetre d'inhibició al voltant del pou on hi ha la soca de *Lactobacillus* sense tractar.

Carga mínima del pou:

Prèviament a l'assaig anteriorment descrit, va ser necessari conèixer el nivell mínim de carga que s'ha d'inocular en un pou de 9 mm de diàmetre, per observar-hi la inhibició del creixement de la soca control. Per això es va utilitzar l'assaig de difusió en agar des de pous, els quals es carregaven amb concentracions diferents i descendents de les fraccions d'ultrafiltració liofilitzades, i es mesura l'halo d'inhibició. Aquesta concentració mínima es va expressar en $\mu\text{L/pou}$. Així, en els futurs assaigs, cada pou havia de ser carregat com a mínim, amb aquesta quantitat per poder garantir la inhibició del creixement.

Determinació de l'activitat inhibidora:

L'activitat inhibidora, es quantifica definint el títol com el corresponent a la dil.lució més alta que mostra una inhibició completa del creixement de la soca indicadora. En general, aquesta capacitat inhibidora s'expressa en unitats d'activitat per mililitre (UA/mL), donat que va ser 1 mL la quantitat inicial que es va fraccionar per ultrafiltració (16, 35, 38, 59, 91, 94, 100, 223).

Amb l'assaig de difusió en agar des de pous es va realitzar la quantificació de l'activitat de les fraccions liofilitzades, amb dil.lucions dobles seriades, utilitzant PBS a pH 7,0. La dil.lució inicial va ser 1:10, després 1:20, 1:40, 1:80 i així successivament. Després de l'assaig es mesura l'halo d'inhibició, i s'observa fins a quina dil.lució hi ha inhibició del creixement de la soca control. Així es determina l'activitat inhibidora de cada soca.

Tractaments:

Es van realitzar per coneixer la sensibilitat o resistència de les fraccions d'ultrafiltració liofilitzades dels *Lactobacillus* LB11 i LB35 a les següents condicions:

Calor: 100° C durant 20 minuts.

Autoclavat: 121°C durant 15 minuts.

Temps de conservació: –70° C durant 1 any.

Enzims lítics: pronasa (2 mg/mL), pepsina (3,3-6,6 mg/mL), tripsina (2 mg/mL), proteinasa K (1 mg/mL), liozima (6,6 mg/mL), N-glicosilasa-F (38,5-99 U/mL), α -amilasa (4-6,6 mg/mL) i lipasa (900-1900 U/mL) (Boehringer Mannheim). Els enzims es van afegir a les dilucions dels liofilitzats fins arribar a la concentració recomanada per cada enzim. En diversos enzims es van utilitzar dues concentracions finals, la recomanada per la literatura i el doble d'aquesta. Les dilucions es van incubar a 37° C durant 60', seguint mètodes ja ressenyats per diversos autors. (16, 36, 43, 59, 96, 132, 195, 199, 220, 223, 230)

Després dels diferents tractaments físics i químics, es va comprobar si les fraccions liofilitzades mantenien l'activitat antimicrobiana, mitjançant assaigs de difusió en agar des de pous. Com a control es va utilitzar una mostra amb tampó de reacció sense enzim.

Una fracció liofilitzada es va considerar resistent al tractament, quan s'observava la presència d'halo d'inhibició, és a dir, sí conservava la seva

capacitat antimicrobiana. A la inversa, una fracció liofilitzada es va considerar sensible al tractament, quan l'halo era molt petit o no s'observava, és a dir, quan havia perdut la seva activitat antimicrobiana.

SDS-PAGE:

L'electroforesi en gel de poliacrilamida ha estat utilitzada amb dos objectius: 1) Validar la tècnica de tractament amb enzims lítics, és a dir, demostrar que les condicions, amb les quals es portaven a terme els assaigs de tractament amb enzims lítics, eren les adients. Això es demostrava si la banda electroforètica corresponent a l'albumina desapareixia després del tractament lític. 2) Comprovar el resultat del tractament amb enzims lítics dels sobrenadants filtrats de cultius de *Lactobacillus*, és a dir, comprovar si la mostra conserva o no el patró de bandes electroforètiques característic, després del tractament enzimàtic.

Els materials i mètodes utilitzats per realitzar el SDS-PAGE, han estat desenvolupats en base a diversos articles publicats (5, 99, 111, 186, 187, 191) i amb el sistema d'electroforesi BioRad mini Protean II® (BioRad). Els gels separador i preparador s'han preparat amb unes concentracions d'acrilamida/bis-acrilamida del 12% i 4%, respectivament. Les tincions s'han realitzat amb blau de Coomassie. A més dels controls de pes molecular (Broad Range Standards, 200 - 6,5 kDa, BioRad), s'han utilitzat diversos controls de mostres, segons els SDS-PAGE, així en les electroforesis amb albumina, els controls han estat l'enzim lític i la mateixa albumina sense tractar; en canvi, en

les electroforesis amb soques de *Lactobacillus*, els controls han estat el medi MRS sense inocular i el mateix filtrat sense tractar.

En els SDS-PAGE realitzats com a eina de validació de la tècnica de tractament amb enzims lítics, es va utilitzar albúmina, fracció V (Merck) a una concentració de 0,1 mg/mL i pepsina a una concentració 6 mg/mL.

Pel que fa als SDS-PAGE amb filtrats dels cultius de *Lactobacillus* i enzims lítics, en una fase inicial es van fer electroforesi amb les 15 soques de la col.lecció, pero en la fase estandaritzada es van utilitzar bàsicament els *Lactobacillus* LB11 i LB35, en les diferents fraccions actives (< 5 kDa i Total). Pel que fa als enzims lítics, amb proteïnasa K a una concentració d'1 mg/mL es van realitzar 16 gels, amb pepsina a una concentració de 3,3 mg/mL es van realitzar sis gels i amb tripsina a una concentració de 2 mg/mL es van realitzar cinc gels. Un problema va ser la dificultat de visualitzar les bandes corresponents a les substàncies de baix pes mol.lecular (<15kDa). Per corregir-ho es va realitzar la tècnica de SDS-PAGE en un gel separador amb més concentració d'acrilamida/bisacrilamida (Anderson i cols. 83, Schägger i cols. 87). No es va resoldre el problema.

Cromatografia:

Es va utilitzar la tècnica de cromatografia en fase inversa (High Performance Liquid Chromatography -HPLC- reverse phase), com diversos autors han realizat

(96, 132, 217) per a purificar i separar les substàncies inhibidores segons el seu caràcter hidrofòbic o hidrofílic.

Es practicà cromatografia del sobrenadant estèril ultrafiltrat de la fracció de pes molecular inferior a 5 kDa, dels *Lactobacillus* LB11 i LB35 cultivats en el medi MRS. Donat que el medi MRS és ric en pèptids i els pics cromatogràfics d'aquests interferien en la identificació els pics cromatogràfics de les probables substàncies actives, es va treballar amb fraccions, les quals agrupaven diversos pics cromatogràfics que podrien correspondre tant a pèptids del medi, com a probables substàncies actives.

Les fraccions obtingudes es varen numerar segons l'ordre d'aparició en l'elució, donat que elueix més aviat una substància hidrofílica que una d'hidrofòbica, llavors la fracció 1 és la més hidrofílica. Amb les diverses fraccions resultants es va realitzar l'assaig de difusió en agar des de pous, per determinar quina era la fracció cromatogràfica amb activitat inhibidora. Com a control es van utilitzar pous carregats amb el medi de cultiu. A la fracció activa se li van realitzar una segona cromatografia. Les subfraccions obtingudes es varen numerar segons l'ordre d'aparició, així la subfracció 1 és la més hidrofílica. Amb les subfraccions cromatogràfiques resultants es va practicar un segon assaig de difusió en agar des de pous, per tal d'observar quina era la subfracció cromatogràfica amb activitat inhibidora.

RESULTATS

En les 14 ultrafiltracions amb la membrana de 5 kDa, es van obtenir dues fraccions, la > a 5 kDa i la < a 5 kDa. Aquestes dues fraccions, juntament amb la fracció total, que va servir de control, constitueixen les tres fraccions amb les que es va assajar la presència d'activitat inhibidora del creixement. En els 9 assaigs de difusió en agar des de pous practicats es va comprovar que les fraccions amb més capacitat d'inhibició van ser les < a 5 kDa i les totals. Durant la primera fase d'estandarització, quan la membrana utilitzada era de 10 kDa, en els 4 assaigs practicats les fraccions més actives van ser les < 10 kDa i les totals.

En els 5 assaigs de difusió en agar des de pous practicats, es va establir que la carga mínima d'un pou, per detectar activitat inhibidora del creixement era de 45 µL pel *Lactobacillus* LB11 i de 40 µL pel *Lactobacillus* LB35. Per garantir la inhibició del creixement, cada pou ha de ser carregat com a mínim, amb aquesta quantitat.

En els 11 assaigs de difusió en agar des de pous realitzats, es va establir que l'activitat inhibidora del *Lactobacillus* LB11 era de 20 UA/mL ja que es va detectar inhibició en el pou corresponent a la dil.lució 1:20. Pel *Lactobacillus* LB35 l'activitat inhibidora era de 40 UA/mL.

En els assaigs de difusió en agar des de pous practicats, es va observar que l'activitat de la substància inhibidora excretada pels *Lactobacillus* LB11 i LB35, es va mantenir després dels tractaments amb calor a la temperatura de 100°C (4 assaigs), autoclavat a la temperatura de 121°C (2 assaigs) i després d'un any de conservació a -70°C (2 assaigs). També es va comprobar que l'activitat inhibidora resistia el tractament amb tots els enzims lítics estudiats: pepsina (13 assaigs), proteïnasa K (7 assaigs), N-glicosilasa-F (6 assaigs), tripsina (4 assaigs), pronasa (4 assaigs), α -amilasa (4 assaigs), lisozima (2 assaigs) i lipasa (2 assaigs).

En els 14 assaigs de SDS-PAGE practicats amb els filtrats dels cultius *Lactobacillus* tractats o no amb enzims lítics, les bandes entre 60 kDa i 30 kDa van desaparèixer en les mostres tractades amb proteïnasa K i amb pepsina, en canvi amb tripsina aquesta desaparició va ser menys clara o no van desaparèixer.

Els quatre assaigs de SDS-PAGE practicats amb l'albúmina tractada o no amb pepsina, van permetre demostrar que les condicions dels assaigs de tractament amb enzims lítics eren correctes, ja que en els carrils amb albúmina sense tractar es va observar la banda corresponent a l'albúmina (70 kDa), mentre que en els carrils amb albúmina tractada va desaparèixer.

En la primera cromatografia es van obtenir 5 fraccions del *Lactobacillus* LB11 i 11 fraccions del *Lactobacillus* LB35. En els dos *Lactobacillus*, la fracció 1 és la

que va mostrar inhibició de creixement en els assaigs de difusió en agar des de pous. Aquesta fracció de cromatografia correspon a mol·lècules amb caràcter més hidrofílic. La segona cromatografia es va practicar exclusivament a la fracció cromatogràfica activa del *Lactobacillus* LB11 (fracció 1). De les 47 subfraccions cromatogràfiques resultants, es va detectar activitat inhibidora en les subfraccions 5, 6, 7 i 8, resultat que indica que la part amb capacitat d'inhibició del creixement posseeix un marcat caràcter hidrofílic.

Els resultats dels diversos assaigs, s'esquematitzen en la següent taula.

	Fracció	Activitat	Carga	Fracció	Subfracció
<i>Lactobacillus</i>	Activa (pous)	Inhibidora	Mínima	Activa (HPLC)	Activa (HPLC)
LB11	< 5 kDa	20 UA/mL	45 µL	1	5-8
LB35	< 5 kDa	40 UA/mL	40 µL	1	ND

ND: No determinat.

DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

Les soques de *Lactobacillus* LB11 i LB35, previament caracteritzades per aquest equip (138, 139, 140), mostren diverses propietats per ser utilitzades com probiòtics: gran capacitat d'adherència a les CEV i de bloqueig de l'adherència dels uropatògens a aquest epitel·li i alt poder d'inhibició del creixement microbià.

Mitjantçant el fraccionament del concentrat liofilitzat del sobrenadant dels *Lactobacillus* i posteriors assaigs de difusió en agar des de pous, s'ha estimat que el pes molecular de les substàncies inhibidores produïdes pels *Lactobacillus* LB11 i LB35 és < a 5 kDa. Posteriorment, per tècnica de cromatografia en fase inversa i comprovació de l'activitat de cada fracció cromatogràfica mitjantçant l'assaig de difusió en agar des de pous, s'ha demostrat que les fraccions actives són les més hidrofíliques, reforçant-se el postulat de que podrien correspondre a pèptids. A més, el fet que el liofilitzat del *Lactobacillus* LB35 fos més actiu que el del LB11, amb una diferència de 40 UA/mL enfront 20 UA/mL, confirma resultats previs, ja que *Lactobacillus* LB35 en l'assaig de difusió en agar des de pous conseguia inhibir amb menys carrega que el LB11 el creixement de la soca indicadora i en els assaigs d'inhibició del creixement, LB35 es va mostrar com el més inhibidor dels diversos uropatògens, tant en medi líquid com, principalment, en medi sòlid.

Les substàncies inhibidores han resultat ser termoestables, cronoestables i resistents a l'autoclau. A la literatura, hi ha una certa diversitat pel que fa a la caracterització de les bacteriocines. Alguns autors en descriuen de termolàbils i altres de termoestables; unes són resistents a l'autoclavat, mentre que altres perden el 75% de la seva activitat després d'autoclavar-les. Unes tenen pesos moleculars estimats < a 5 kDa, i altres > a 10 kDa (17, 35, 59, 132, 220, 223, 230).

En aquest treball les substàncies inhibidores han resultat totalment resistents als enzims lítics (proteïnases, amilases i lipases). En canvi, en la literatura hi ha bastanta unanimitat en la sensibilitat a la majoria d'enzims proteolítics, amb o sense sensibilitat afegida als enzims que trenquen glúcids o lípids (17, 35, 59, 132, 220, 223, 230).

Per la tècnica de SDS-PAGE s'ha detectat la desaparició de bandes en les mostres de *Lactobacillus* tractades amb proteïnasa K i pepsina, el que indica que aquestes bandes són de caràcter protèic. Aquesta desaparició de bandes ha estat menys evident en les mostres de *Lactobacillus* tractades amb tripsina, enzim més específic que només hidrolitza enllaços peptídics on el primer aminoàcid és arginina o lisina (4).

El fet que la tècnica de SDS-PAGE no donés prou poder de resolució per les bandes amb pes mol.lecular inferior a 15 kDa, fa que no es pugui saber si les fraccions amb més activitat inhibidora són sensibles o no als tractaments amb enzims lítics.

El SDS-PAGE amb l'albúmina tractada i no amb enzims proteolítics, ha permès demostrar que les condicions de les reaccions enzimàtiques proteolítiques eren les correctes. Aquestes mateixes condicions s'han aplicat en el tractament dels ultrafiltrats liofilitzats amb enzims lítics.

Analitzant conjuntament aquestes propietats, es pot postular que la/es substància/es que secreten els *Lactobacillus* LB 11 i LB 35 presenta/en un perfil que podria correspondre a pèptids molt petits o substàncies relacionades.

IV. DISCUSSIÓ

És ben coneguda la capacitat de *Lactobacillus* com agent probiòtic de l'aparell digestiu (155, 32, 40, 69, 63, 66, 93, 130, 136, 221), en canvi, està menys estudiat el seu potencial com a probiòtic de l'aparell genito-urinari, on dues malalties, com la infecció del tracte urinari i la vulvovaginitis candidiàsica, tenen una repercussió socio-laboral importantíssima.

En l'aparell genito-urinari, un agent probiòtic es defineix com una preparació de microorganismes vius, que utilitzats intravaginalment restitueixen l'equilibri ecològic de la flora i prevenen infeccions. (127).

Per tal que un agent sigui eficaç com a probiòtic microbià en l'aparell genito-urinari és indispensable que les soques bacterianes que el componen estiguin correctament caracteritzades (3, 7, 31, 65, 184), d'acord amb uns criteris de selecció establerts prèviament (3, 56, 65, 124, 127, 141, 142). És a dir, com agent bioterapèutic s'han d'escollir aquelles soques que acumulin el màxim de característiques favorables, per desenvolupar-se en una flora i en un contexte fisiològic concret, i exercir les funcions probiòtiques de la manera més optimitzada.

Aquest treball ha pretés aprofundir en el coneixement dels mecanismes pels quals *Lactobacillus* és el microorganisme essencial de l'ecosistema vaginal humà, tant per la conservació, protecció i l'equilibri de la flora que li és pròpia, com per la regeneració de la mateixa. És a dir, a pretés a partir d'una col·lecció de *Lactobacillus*, caracteritzar les seves propietats per tal de poder acabar

seleccionant les soques amb més potencial per a ser utilitzades com agents probiòtics en l'aparell genito-urinari.

Com en treballs anteriors del mateix equip (7), s'han trobat grans diferències en la capacitat d'adherència dels diferents *Lactobacillus* a les cèl.lules de l'epiteli vaginal. Els *Lactobacillus* dels Grups d'Hemaglutinació III i II varen aconseguir els valors més alts d'adhesió, amb una mitjana de 147,5 i 142,3 microorganismes per CEV, respectivament, mentre que els *Lactobacillus* del Grup I van mostrar una capacitat d'adherència menor, amb una mitjana d'adhesió de 57,7. Globalment, la soca de *Lactobacillus* més adherent va ser *Lactobacillus* LB35, del Grup III, amb una mitjana de 161,1; i la que menys va ser *Lactobacillus* LB5, del Grup I, amb una mitjana de 20,4.

Altres investigadors han trobat mitjanes d'adherència de *Lactobacillus* a CEV més baixes (23, 25, 30, 87, 166, 228) i més altes (188). Aquesta disparitat de resultats pot ser explicada pels diferents materials i mètodes utilitzats en els respectius treballs. Una de les variables que pot influir en aquestes diferències és la concentració de *Lactobacillus* inoculats; així, Tuomola *et al* (218) i Greene *et al* (67) demostraren que el grau d'adherència de *Lactobacillus* a les cèl.lules Caco-2, depen de la concentració de l'inocul. Una altra variant és el tipus de cèl.lules emprades per realitzar els assaigs: cèl.lules uretrals humanes (30), línies cel.lulars establertes com HeLa i Caco-2 (51, 67, 125, 188, 218). Una altra variant és el pH del medi on es practica l'assaig (67). Catalanotti *et al* (29), van registrar que la màxima d'adhesió dels *Lactobacillus* a CEV s'estableix a

pH 4,4; essent aquest el pH en el que s'han realitzat els assaigs d'adherència en aquest treball.

Tot i que no era un objectiu d'aquest treball estudiar la capacitat d'adherència dels uropatògens a les CEV, es va assajar aquesta capacitat per tal de poder escollir la soca més adherent de cada espècie, per posteriorment, ser utilitzada en els assaigs del bloqueig exercit per *Lactobacillus* sobre l'adherència dels uropatògens a les CEV. Es demostrà que hi ha grans diferències entre els gèneres i espècies d'uropatògens i inclús entre soques d'una mateixa espècie, en la seva capacitat per adherir-se a l'epiteli. Així, d'entre els bacils Gram negatiu la soca amb més capacitat adhesiva va resultar ser *Escherichia coli* EC26, la qual expresa tres tipus d'adhesines: fimbries tipus 1, fimbries P i adhesines X (8, 9); a diferència de la soca d'*E. coli* EC4, sense cap adhesina i que va mostrar la mitjana d'adherència més baixa de l'espècie. De tots els bacils Gram negatiu estudiats, el que va obtindre l'adherència més baixa va ser *Proteus mirabilis* PM3.

Pel que fa als cocs Gram positiu, el més adherent va ser *Staphylococcus aureus* SA11, i el menys *S. saprophyticus* SS9. Les mitjanes d'adherència dels cocs Gram positiu són superiors a les dels bacils Gram negatiu, excloent a les d'*E. coli*. Això és probablement degut a que la concentració d'inocul dels cocs era 12 vegades superior a la dels bacils. Respecte als llevats, la soca més adherent va ser *Candida albicans* Y18, i la menys *C. albicans* Y17.

Aquest treball, com d'altres (23, 30, 97, 166, 205), investiga el bloqueig de l'adherència dels uropatògens, analitzant-lo principalment des de la perspectiva de bloqueig per exclusió, on els *Lactobacillus* adherits prèviament a l'epiteli exclouran l'adherència dels uropatògens, que arribats posteriorment pretenen colonitzar-lo. Aquesta seria la situació que en realitat constitueix una etapa important en la patogènesi de la ITU, es a dir, la de la colonització vaginal per l'uropatogen. En el bloqueig per competició, els *Lactobacillus* i els uropatògens arribats alhora competeixen pels receptors de les CEV. En el bloqueig per desplaçament, els uropatògens adherits primer han d'ésser desplaçats pel *Lactobacillus*, que ha de repoblar la vagina. Aquesta seria la situació que es dona després d'un episodi d'ITU.

Els resultats dels assaigs de bloqueig de l'adherència s'han expressat des de dos punts de vista. L'un, purament estadístic (*t* de Student-Fischer), reflecteix si ha hagut una diferència estadísticament significativa entre l'adhesió del patogen a 50 cèl.lules de l'epiteli vaginal comptades consecutivament, quan aquestes han estat preincubades o no amb *Lactobacillus*. L'altre, s'expressa en percentatges de bloqueig. A l'hora de comparar entre soques de *Lactobacillus*, el punt de vista percentual dona més matisos, són xifres, s'hi poden veure certes variacions en els números; en canvi, el punt de vista estadístic només pot ser: sí (equival a un 1) o no (equival a un 0) existeix diferència significativa.

Per exemple, quan s'analitza el bloqueig del *Lactobacillus* LB35 en front *E. coli* EC26, la mitjana d'adherència es de 187,5 *E. coli* per cèl.lula de l'epiteli vaginal,

xifra que decau fins a 37,9 *E. coli* per cèl.lula vaginal quan prèviament s'han inoculat les cèl.lules amb el *Lactobacillus* LB35. Des del punt de vista estadístic, la comparació és significativa (187,5 vs 37,9), o sigui equival a 1; des del percentual *Lactobacillus* LB35 bloqueja l'adherència del 79,8% dels *E. coli* EC26 (79,8% és el percentage de 149,6 respecte 187,5, d'on 149,6 és 187,5 del control menys 37,9).

Dels assaigs de bloqueig per exclusió, es conclou que hi ha grans diferències entre les soques de *Lactobacillus*, en la seva capacitat per bloquejar l'adherència dels uropatògens a les CEV, per exemple l'adhesió de *P. mirabilis* es bloquejada en un 79,6% per *Lactobacillus* LB35 i només en un 2,5% per *Lactobacillus* LB28. També es conclou que hi ha importants diferències inclús en la capacitat de bloqueig d'una mateixa soca de *Lactobacillus* en front diversos uropatògens, és a dir *Lactobacillus* LB11 bloqueja l'adherència de *Pseudomonas aeruginosa* PA05 en un 93,5% i de *P. mirabilis* només en un 26,8%. Els *Lactobacillus* del Grup d'Hemaglutinació III són els que han presentat més activitat bloquejadora de l'adherència dels uropatògens a les CEV (61,9%), seguits dels del Grup I (52,6%) i per últim, dels del Grup II (49,5%). A més, cinc *Lactobacillus* del Grup III varen mostrar la major capacitat bloquejadora en front de cinc dels set uropatògens provats, entre ells *E. coli* el microorganisme que amb més freqüència provoca ITU (37, 98). Globalment, la soca de *Lactobacillus* LB35 ha obtingut el percentatge més alt de bloqueig de l'adherència, amb una mitjana de bloqueig dels bacils Gram negatiu del 78,8% i dels cocs Gram positiu del 67,8%.

P. aeruginosa PA05, *Klebsiella pneumoniae* KP07 i *S. saprophyticus* SS25, han estat bloquejades significativament pels 15 *Lactobacillus* estudiats. Al contrari, *P. mirabilis* PM01 ha estat el menys bloquejat, ja que només només 6 dels 15 *Lactobacillus*, entre ells LB35, l'han bloquejat significativament.

Hi ha diferències importants en el potencial de bloqueig que *Lactobacillus* exerceix enfront *E. coli*. Els *Lactobacillus* dels Grups I i II varen mostrar un potencial baix, bloquejant el 9,7% i 30,9%, respectivament; en canvi el Grup III va assolir una mitjana de bloqueig del 58,6%, destacant dins d'aquest Grup, la soca LB35 amb el percentatge més elevat (79,8%).

Si com es dedueix, *Lactobacillus* no és del tot capaç de bloquejar l'adherència d'*E. coli* a l'epiteli vaginal, i si tenim en compte que *E. coli* és el microorganisme dominant de la flora fecal i que per tant molt probablement existeix un fluxe constant de soques fecals d'*E. coli* en direcció a vagina, això explicaria en part, per que *E. coli* és l'agent causal més freqüent d'ITU.

Els *Lactobacillus* del Grup III es van comportar com els més bloquejadors de *Candida albicans* Y18, amb una mitjana de 62,9%, seguits dels *Lactobacillus* del Grup II (50,6%) i del Grup I (26,1%). Aquesta activitat de bloqueig d'adherència dels llevats és similar a l'exercida pels *Lactobacillus* dels Grups III i II contra l'adherència dels bacteris uropatògens, ja que es va assolir un percentage del 61,9% i del 49,5%, respectivament; en canvi la mitjana de

bloqueig del Grup I és menor en els assaigs de llevats (26,1% vs 52,6%). Es conclou que la capacitat de *Lactobacillus* per a bloquejar l'adherència a CEV, és lleugerament més elevada en front els bacteris que en front els llevats.

De les 15 soques de *Lactobacillus* estudiades, vuit, LB11, LB35, LB38, LB39, LB41 i LB65 (Grup III), LB25 (Grup II) i LB5 (Grup I), han aconseguit bloquejar significativament l'adherència de *C. albicans* Y18 a les cèl.lules de l'epiteli vaginal, essent el *Lactobacillus* LB65 el que ha obtingut el percentatge de bloqueig més alt, un 88,2%.

Davant dels llevats, les diferents soques de *Lactobacillus* tampoc es van comportar d'una manera uniforme a l'hora d'expressar la seva capacitat de bloqueig de l'adherència de *C. albicans* Y18 a les cèl.lules de l'epiteli vaginal. Ni tan sols s'hi van comportar els *Lactobacillus* pertanyents a un mateix Grup d'hemaglutinació, així, dins del Grup I, LB5 va bloquejar molt intensament (69,3%), mentre que LB21 quasi no va bloquejar (0,6%).

Els assaigs de bloqueig de l'adherència per competició i per desplaçament, van ser realitzats amb els dos *Lactobacillus* que millor bloquejaven per exclusió: *Lactobacillus* LB11 i LB35 i els dos uropatògens que més freqüentment produeixen ITU en dones joves: *E. coli* i *S. saprophyticus*. En els assaigs de bloqueig per competició, *Lactobacillus* LB35 va mostrar més potencial per bloquejar els uropatògens, encara que els dos *Lactobacillus* van bloquejar-los de manera significativa. En els assaigs de bloqueig per desplaçament, les dues

soques de *Lactobacillus* van desplaçar *E. coli* i *S. saprophyticus* de manera similar, encara que *Lactobacillus* LB35 va mostrar un potencial lleugerament superior que el va fer significatiu des del punt de vista estadístic.

En resum, *Lactobacillus* LB35 va bloquejar l'adherència tant d'*E. coli* EC26 com de *S. saprophyticus* SS25 per tots els mecanismes, exclusió, competició i desplaçament. *Lactobacillus* LB11 va bloquejar l'adherència de *E. coli* per tots tres mecanismes, i l'adherència de *S. saprophyticus* per exclusió i competició, però no per desplaçament. Boris *et al* (23) han publicat una soca de *Lactobacillus* que va bloquejar l'adherència de *C. albicans* a CEV pel mecanisme de competència, mentre que havia estat incapaç de fer-ho pels de desplaçament i d'exclusió. La mateixa soca va bloquejar l'adherència de *Gardnerella vaginalis* per competició i desplaçament però no per exclusió.

A la vagina sana o restablerta amb probiòtics després d'una ITU (i per tant, sana), *Lactobacillus* probablement bloqueja als uropatògens per exclusió. Però en certes situacions d'alt risc d'ITU (71, 156) quan la població de *Lactobacillus* és molt reduïda i la vagina és colonitzada per altres microorganismes, la capacitat de *Lactobacillus* per a desplaçar els patògens adherits, esdevé una propietat clau per a tenir èxit com a probiòtic.

En conclusió, la soca de *Lactobacillus* LB35 ha estat la que ha mostrat una capacitat més alta de bloqueig de l'adherència dels uropatògens pels tres mecanismes, essent a més a més, la més adherent a les cèl.lules vaginals.

Lactobacillus LB11 és també una soca avantatjada en les capacitats d'adherència i bloqueig de l'adherència.

És difícil d'explicar el perquè una mateixa soca de *Lactobacillus* mostra activitats bloquejadores tan diferents en front diversos uropatògens. Els resultats d'aquest treball suggereixen que les bases de la capacitat bloquejadora podrien trobar-se en els receptors situats a la superfície de les cèl·lules de l'epiteli vaginal i al tipus d'enllaç que s'estableix entre els microorganismes i aquests receptors. Així, els *Lactobacillus* adherits d'una manera específica als seus receptors, per una simple ocupació física d'espai podrien bloquejar de manera inespecífica, però amb resultats efectius als receptors de *P. aeruginosa* o de *K. pneumoniae* i amb resultats menys efectius als receptors de *P. mirabilis*. Una altra possibilitat seria que alguns *Lactobacillus* i determinats uropatògens compartissin el mateix receptor específic a la cèl·lules de l'epiteli vaginal, i que s'imposes el microorganisme amb més afinitat pel receptor. S'ha demostrat que hi ha diferències entre els receptors segons les espècies de *Lactobacillus*; Boris *et al* (23), van demostrar que *L. acidophilus* i *L. gasseri* tenien afinitat per les glicoproteïnes, mentre que *L. jensenii* pels carbohidrats.

També s'ha discutit la possibilitat que en el bloqueig de l'adherència dels uropatògens per part de *Lactobacillus*, intervinguessin unes substàncies anomenades biosurfactants, que són produïdes per algunes soques de *Lactobacillus* (137, 173, 224). Aquestes substàncies contenen proteïnes i

carbohidrats, i estan anclades a la pared cel·lular. Velraeds *et al* (224) varen descriure la surlactina, biosurfactant produït per *L. acidophilus* RC-14, amb capacitat d'interferir l'adherència inicial d'*Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *S. epidermidis* i *C. albicans* a la silicona.

En relació a la inhibició del creixement, en medi sòlid la soca amb més capacitat ha estat *Lactobacillus* LB35, del Grup III, la qual ha inhibit el creixement de les set soques d'uropatògens assajades. Els *Lactobacillus* del Grup II no han inhibit cap dels patògens en cap dels assaigs realitzats. Els uropatògens més inhibits han estat *Enterococcus* E15 inhibit per vuit soques de *Lactobacillus* i *S. aureus* SA11 inhibit per quatre. L'uropatogen menys inhibit ha estat *E. coli* EC16, només inhibit per *Lactobacillus* LB-35. Els *Lactobacillus* han mostrat major capacitat d'inhibició del creixement dels cocs Gram positiu que dels bacils Gram negatiu. Cap soca de *Lactobacillus* ha inhibit el creixement en medi sòlid de les tres soques de *Candida*.

En medi líquid, *Lactobacillus* ha exhibit una major capacitat d'inhibició del creixement dels patògens uro-genitals. Les soques del Grup II són les que han obtingut la mitjana de transmitància més alta, és a dir les més inhibidores, i dins d'aquest grup *Lactobacillus* LB25 s'ha comportat com el més inhibidor de tota la col·lecció i *Lactobacillus* LB56 com el menys inhibidor. Al contrari que en medi sòlid, en medi líquid els *Lactobacillus* han mostrat major capacitat d'inhibició del creixement dels bacils Gram negatiu que dels cocs Gram positiu. La soca d'uropatogen més inhibida ha estat *P. aeruginosa* PA05 i la que menys

Enterococcus E15. En un mateix assaig la mateixa soca de *Lactobacillus* pot mostrar diferents capacitats enfront els diversos uropatògens, així el *Lactobacillus* LB35 inhibeix molt el creixement de *S. saprophyticus* SS25 (85% de transmitància) i molt poc el de *K. pneumoniae* KP08 (32%). Així mateix, s'ha detectat una inversió en els resultats inhibitoris entre el dos assaigs, ja que *Enterococcus* E15 ha estat l'uropatogen més inhibit en medi sòlid i el menys inhibit en medi líquid i *P. aeruginosa* PA05 ha estat poc inhibida en medi sòlid i en canvi la més inhibida de tots els uropatògens en medi líquid.

El major poder d'inhibició observat en el medi líquid, pot ser degut a que en aquest medi, hi ha una millor difusió dels factors inhibidors. De tota manera, això sol no explica la manca de correlació entre els resultats dels assaigs en medi sòlid i líquid, especialment si una soca d'uropatogen pot ser la més inhibida en medi sòlid i la menys en líquid, quan el que caldria esperar és que la capacitat inhibidora es mantingués o s'incrementés en el líquid degut a la major facilitat de difusió dels factors d'inhibició. Per explicar aquest fet s'ha postulat (59, 128, 173, 195, 204) que els *Lactobacillus* produeixen diferents substàncies antimicrobianes, que aquestes substàncies són heterogènies, i que algunes d'elles actuen millor en medi sòlid i altres millor en líquid. Aquesta heterogenicitat també podria explicar el fet de que en medi sòlid s'inhibeix millor el creixement dels cocs Gram positiu, i en medi líquid el dels bacils Gram negatiu.

Cap soca de *Lactobacillus* ha aconseguit inhibir el creixement de *C. albicans* Y17, en medi sòlid. En medi líquid els resultats varen millorar lleugerament, ja que *Lactobacillus* LB68 del Grup II va mostrar una transmissió del 53% i *Lactobacillus* LB39 del Grup III del 45% (140). Altres equips també han descrit que *Lactobacillus* no és prou capaç d'inhibir *in vitro* ni *in vivo* el creixement de *Candida* spp. (76, 134, 198). En canvi, altres publicacions mostren a *Lactobacillus* com un inhibidor del creixement dels llevats, tan *in vitro* (27, 50, 162), com *in vivo* (84, 85, 180).

En referència a la caracterització de les substàncies inhibidores produïdes per *Lactobacillus*, el primer que es va comprovar va ser que les substàncies inhibidores eren excretades pel bacteri, ja que aquesta capacitat era conservada pels sobrenadants filtrats dels medis de cultiu on havien crescut els *Lactobacillus*. Posteriorment es va caracteritzar aquesta substància i s'arribà a la convicció que era termoestable, cronoestable, resistent a l'autoclau.

Per ultrafiltració amb una membrana de 5 kDa i posterior assaig de l'activitat inhibidora per la tècnica de difusió en agar des de pous, s'arribà a la conclusió que la substància inhibidora posseeix un pes molecular < a 5 kDa. Posteriorment, per cromatografia en fase inversa, a base de fraccionar la fracció d'ultrafiltració < a 5 kDa i amb les fraccions resultants aplicar la tècnica de difusió en agar des de pous i realitzar una segona cromatografia de la fracció activa, s'arribà a la conclusió de que la fracció amb capacitat d'inhibició

del creixement, és de caràcter hidrofílic i que aquest perfil podria correspondre a pèptids o substàncies relacionades.

En la literatura hi ha una certa diversitat en el resultat de la caracterització de les substàncies inhibidores del creixement microbià. Hi ha diferències en la resistència al calor i a l'autoclavat, també hi ha disparitat en els pesos mol.leculars (17, 35, 59, 132, 220, 223, 230).

S'ha demostrat que les substàncies inhibidores tenen diferent potencial d'activitat, així *Lactobacillus* LB35 va resultar més actiu que LB11, ja que la seva activitat inhibidora va ser superior (40 UA/mL vs 20 UA/mL) enfront la soca d'*E. coli* EC16. Es tracta de soques de *Lactobacillus* diferents, encara que ambdues de la espècie *L. crispatus*. Itoh *et al* (94) demostren que gassericina A de *L. gasseri* LA39, necessita 250 UA/mL per inhibir *Listeria monocytogenes*, 500 UA/mL per inhibir *S. aureus* i 50 UA/mL per inhibir *L. delbruecki* subsp. *bulgaricus*.

En una primera aproximació, amb la tècnica de SDS-PAGE a partir de gels carregats amb filtrats estèrils de cultius de *Lactobacillus*, es varen detectar bandes protèiques entre 30-60 kDa, en les mostres corresponents a les soques amb més poder inhibidor. Aquestes bandes no es varen veure en les mostres corresponents als *Lactobacillus* amb menys poder inhibitori, ni en els controls. Aquest fet, suggereix que els *Lactobacillus* excreten substàncies protèiques, i que les substàncies inhibidores podrien ser proteïnes.

El SDS-PAGE ha servit també per comprovar el resultat del tractament amb els enzims lítics. Així, les bandes, entre 30 i 60 kDa, que apareixen en els carrils carregats amb sobrenadants estèrils de diverses soques de *Lactobacillus*, es perden quan aquests sobrenadants són tractats amb proteïnasa K i pepsina i es perden menys amb tripsina. Aquesta pèrdua es més o menys intensa, depenent de la soca. Per tant, es reforça la conclusió que en el sobrenadant dels cultius de *Lactobacillus* hi ha substàncies de caracter proteïc. A la literatura s'ha descrit (35) que la lactobina A, una bacteriocina excretada per *L. amylovorus* LGM, és sensible al tractament amb proteïnasa K i tripsina, però resistent a α -amilasa, liozima i lipasa. A més a més la lactococcina R, de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R, és sensible a alguns enzims proteolítics com proteïnasa K i pronasa, però és resistent a altres com tripsina i lipasa (230), perfil que coincideix amb els resultats d'aquest estudi.

Per tal de comprovar que les bandes observades corresponien realment a les substàncies inhibidores excretades pel *Lactobacillus*, es van concentrar les substàncies inhibidores per liofilització, posteriorment es van tractar amb enzims lítics i es va comprovar l'activitat inhibidora mitjançant els assaigs de difusió en agar des de pous. En aquests assaigs, les substàncies van resultar resistents a tots els enzims lítics provats (proteïnases, amilases i lipases). A la literatura, utilitzant metodologies similars, la majoria de substàncies actives són sensibles a quasi tots els enzims proteolítics assajats, amb o sense sensibilitat

afegida als enzims que trenquen glúcids o lípids (17, 35, 59, 132, 220, 223, 230),

Una limitació de la tècnica de SDS-PAGE va ser la dificultat de visualitzar les bandes corresponents als factors inhibidors de baix pes mol.lecular (<15kDa), ja que migraven i es perdien per la part inferior del gel. Al no objectivar aquestes bandes, no és possible afirmar ni negar que s'hagessin alterat amb el tractament enzimàtic lític. En el supòsit que amb SDS-PAGE s'hagués observat una alteració en les bandes < a 5 kDa després del tractament, es podria postular que aquestes correspondrien a les substàncies actives, ja que aquest és el pes mol.lecular que s'els ha estimat en els assaigs de difusió en agar des de pous. Aquesta aparent contradicció entre, per una banda, els resultats dels assaigs de tractament amb enzims lítics i posterior difusió en agar des de pous, els quals que han demostrat que les substàncies actives són resistents a aquests enzims i per una altra banda, els resultats globals del SDS-PAGE que mostra que hi són sensibles, podria ser deguda, entre altres causes, a que les substàncies inhibidores són pèptids petits que no poden ser trancats pels enzims lítics provats.

En aquest treball, com en un altre anterior (116), s'ha demostrat que els *Lactobacillus* amb més poder adherent (els del Grup III), varen ser també els més capaços de bloquejar l'adherència tant dels uropatògens com dels llevats. Els *Lactobacillus* del Grup I es varen comportar com poc adherents, encara que posseïen una mitjana de capacitat bloquejadora dels uropatògens lleugerament

superior a la del Grup II, essent el Grup II més adherent que el Grup I. Aquest últim fet suggereix que malgrat aquesta correlació entre les dues propietats, els mecanismes d'adherència i de bloqueig de l'adherència poden ser diferents.

Al comparar les dues propietats anteriors amb l'activitat inhibidora del creixement, es troba que pels *Lactobacillus* del Grup III existeix bona correlació entre les tres propietats, ja que és un Grup amb molta capacitat d'adherència, molt poder bloquejador de l'adhesió i gran activitat inhibidora del creixement tant dels uropatògens com dels llevats. Aquesta concordància, és probablement deguda a una acumulació de propietats que coincideixen en determinades soques de *Lactobacillus*, ja que l'adherència depen de biosurfactants, interaccions entre adhesines i de mol.lècules de coagregació, mentre que la inhibició del creixement es deguda a la producció de substàncies com bacteriocines i altres factors inhibidors, secreció d'àcids, de H₂O₂, etc. (59, 137, 162, 173).

L'objectiu primari d'aquest treball és el de seleccionar les dues o tres soques de *Lactobacillus* més ben dotades per utilitzar-les com agents bioterapèutics. Totes les soques de *Lactobacillus* estudiades són d'origen vaginal i humà, excreten H₂O₂ i han tolerat perfectament la manipulació *in vitro* (congelació, subcultius, créixement en diferents medis).

A més, les soques que se seleccionin han de complir els criteris exigibles a un agent bioterapèutic, és a dir, facilitat de creixement *in vitro*, temps de generació

relativament curt, capacitat d'adhesió i competició pels receptors d'adherència dels patògens, capacitat de producció de substàncies antimicrobianes i tòxiques per altres organismes i de competició pels nutrients.

Per tractare-se del gènere *Lactobacillus* i de soques d'origen vaginal humà es presuposen amb capacitat de supervivència en la flora local i de colonització de la vagina, tolerància a les substàncies que aquesta conté, capacitat d'estabilitzar i equilibrar aquest ecosistema, potencial per estimular la immunitat local i general i escassa o nul.la patogenicitat per l'hoste; propietats que en la seva majoria s'hauran de comprovar en propers assaigs. També s'haurà d'estudiar la facilitat de conservació i estabilitat en la formulació química i s'haurà de conèixer la dosi òptima i la via d'administració més adient.

De moment i en base a les propietats estudiades, a continuació es presenten les cinc soques de *Lactobacillus* que han mostrat els millors resultats en dos o més dels assaigs realitzats. Per tant, aquestes són les cinc soques seleccionades com les més aptes per ser utilitzades en productes bioterapèutics.

Lactobacillus LB35: del Grup d'hemaglutinació III identificat com a *L. crispatus*. Presenta la més alta adherència a les cèl.lules de l'epiteli vaginal (161,7 lactobacils/cèl.lula). Globalment, és el més bloquejador de l'adherència dels uropatògens a les cèl.lules de l'epiteli vaginal, i en particular, el més bloquejador de l'adherència d'*E. coli* (79,8%), *P. mirabilis* (79,6%) i *S.*

saprophyticus (74,5%). També és el més inhibidor del creixement d'*E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. saprophyticus* i *Enterococcus* en assaigs en medi sòlid i obté una elevada inhibició del creixement dels mateixos uropatògens, excepte de *K. pneumoniae* i *Enterococcus*, en assaigs en medi líquid.

Lactobacillus LB59: del Grup d'hemaglutinació II identificat com a *L. jensenii*. Presenta una bona adherència a les cèl.lules de l'epiteli vaginal (133,3% lactobacils/cèl.lula), és el més bloquejador de l'adherència de *S. saprophyticus* (83,6%) a l'epiteli vaginal, el més inhibidor del creixement de *P. mirabilis* (85%) i *S. saprophyticus* (92%) i el segon en inhibició d'*E. coli* (82%) en assaigs en medi líquid.

Lactobacillus LB39: del Grup d'hemaglutinació III identificat com a *L. crispatus*. Presenta una molt bona adherència a les cèl.lules de l'epiteli vaginal (149,0 lactobacils/cèl.lula), és el més bloquejador de l'adhesió de *P. aeruginosa* (98,2%) i *S. aureus* (69%) a les cèl.lules de l'epiteli vaginal i el més inhibidor del creixement de *P. aeruginosa* (94%) en assaigs en medi líquid.

Lactobacillus LB65: del Grup d'hemaglutinació III identificat com a *L. crispatus*. Presenta una bona adherència a les cèl.lules de l'epiteli vaginal (131,1% lactobacils/cèl.lula) i és el més bloquejador de l'adhesió de *C. albicans* (88,2%) a les cèl.lules de l'epiteli vaginal.

Lactobacillus LB68: del Grup d'hemaglutinació II identificat com a *L. jensenii*. Presenta una bona adherència a les cèl.lules de l'epiteli vaginal (108,7% lactobacils/cèl.lula) i és el més inhibidor del creixement de *C. albicans* (53%) en assaigs en medi líquid.

Alguns autors (58, 162) postulen que les combinacions de dues soques de *Lactobacillus* amb propietats complementàries podrien ser més efectives que una soca única. Per aquest motiu, en una primera aproximació es proposen formulacions amb dues soques de les seleccionades, en funció de la combinació de les propietats que aporten cadascuna una d'elles i de la patologia que es preten previndre.

Lactobacillus LB35 + *Lactobacillus* LB59. Es tracta d'un *L. crispatus* i un *L. jensenii*, de Grups d'Hemaglutinació diferents. Aquesta combinació inhibiria i bloquejaria a *E. coli*, *P. mirabilis* i *S saprophyticus*. Les seves majors indicacions serien la prevenció de les infeccions del tracte urinari recurrents en dones sanes premenopàusiques i en dones sanes postmenopàusiques i també la normalització i reequilibri de la flora vaginal després d'un primer o segon episodi d'infecció.

Lactobacillus LB35 + *Lactobacillus* LB39. Es tracta d'un *L. crispatus* i un *L. crispatus*, del mateix Grup d'Hemaglutinació. La incorporació del *Lactobacillus* LB39 aportaria prevenció contra *P. aeruginosa* i *S. aureus*, agents etiològics d'infecció urinària en malalts amb factors predisponents. Podria estar indicat en

la prevenció de les infeccions recurrents en pacients amb factors predisponents d'infecció urinària.

Lactobacillus LB65 + *Lactobacillus* LB68. Es tracta d'un *L. crispatus* i un *L. jensenii*, de Grups d'Hemaglutinació diferents. Aquesta combinació bloquejaria l'adhesió de *C. albicans* a l'epiteli vaginal i inhibiria el creixement d'aquest llevat. Per tant, estaria indicat en la prevenció i el tractament de la vulvovaginitis candidiàsica.

V. CONCLUSIONS

1. Les soques de *Lactobacillus* amb més capacitat d'adherència a les cèl.lules de l'epiteli vaginal són el *Lactobacillus* LB35, seguit del LB25 i del LB56. Per Grups d'Hemaglutinació, el més adherent és el Grup III, seguit del Grup II i del Grup I.
2. Els *Lactobacillus* amb més capacitat de bloqueig per exclusió de l'adherència dels uropatògens a les cèl.lules de l'epiteli vaginal, són *Lactobacillus* LB35, seguit del LB30 i del LB39. Per grups, el més bloquejador és el Grup III seguit del Grup I i del Grup II. Hi ha grans diferències en la capacitat de les diferents soques de *Lactobacillus* estudiades per bloquejar l'adherència d'un determinat patògen. També hi ha grans diferències en la capacitat de bloqueig que una mateixa soca de *Lactobacillus* pot exercir enfront els diferents patògens.
3. El *Lactobacillus* LB35 ha mostrat ser capaç de bloquejar també per competició i per desplaçament l'adherència de la soca d'*Escherichia coli* EC26 a les cèl.lules de l'epiteli vaginal.
4. L'activitat inhibidora del creixement exercida per *Lactobacillus* enfront els patògens, és més elevada en els assaigs practicats en medi líquid que en sòlid, degut probablement a que el líquid permet una millor difusió dels factors inhibidors. No hi ha correlació exacta entre els resultats obtinguts en aquests dos medis, ja que els bacils Gram negatiu són els

més inhibits en medi líquid, mentre que els cocs Gram positiu ho són en medi sòlid.

5. Les soques de *Lactobacillus* més inhibidores del creixement dels patògens en medi sòlid són el *Lactobacillus* LB35 seguit del LB11 i del LB65, tots pertanyents al Grup III; i en medi líquid el *Lactobacillus* LB 25, seguit del LB5 i del LB 21. El *Lactobacillus* més inhibidor del creixement d'*E. coli* en medi sòlid és el *Lactobacillus* LB35 i en medi líquid el *Lactobacillus* LB38, essent LB35 la quarta millor soca.
6. Els factors inhibidors del creixement són excretats per *Lactobacillus*, ja que els sobrenadants de cultius de *Lactobacillus* esterilitzats per filtració, conserven l'activitat inhibidora. Activitat que és manté quan aquests sobrenadants es concentren per ultrafiltració, liofilització i cromatografia.
7. La substància inhibidora excretada per *Lactobacillus*, s'ha caracteritzat com termoestable, baroestable, crioestable, cronoestable i hidrofílica. El seu pes mol.lecular estimat per ultrafiltració és < a 5 kDa.
8. L'activitat de la substància inhibidora és diferent depenent de les soques de *Lactobacillus* estudiades.
9. S'han obtingut resultats en part contradictoris a l'hora de determinar l'estructura química de la substància inhibidora. En els assaigs amb

mostres tractades amb enzims lítics, i posteriorment SDS-PAGE, sembla que podria correspondre a una proteïna, encara que si es practica la tècnica de difusió en agar des de pous es detecta resistència a les proteïnases, amilases i lipases, fet que suggereix que podria tractar-se de pèptids petits.

10. La capacitat d'adherència dels *Lactobacillus* a les cèl.lules de l'epiteli vaginal es correlaciona amb la capacitat de bloqueig de l'adherència dels patògens al mateix epiteli, i també amb la seva capacitat inhibidora del creixement d'aquests microorganismes. La correlació entre les dues primeres propietats, és probablement deguda a que comparteixen de manera específica o inespecífica els receptors a les cèl.lules epitelials. L'última associació sembla més aviat una coincidència que es dona en algunes soques concretes de *Lactobacillus*.

11. Tenint en compte els resultats obtinguts, s'han seleccionat els *Lactobacillus* LB35, LB39, LB59, LB65 i LB68 com candidats a producte bioterapèutic ja que són els que millor compleixen els requisits exigits com són, entre altres, una alta adherència a les cèl.lules de l'epiteli vaginal, un fort poder de bloqueig de l'adherència dels patògens a les cèl.lules de l'epiteli vaginal i una bona activitat d'inhibició del creixement d'aquests patògens.

12. Aquests *Lactobacillus* sols o combinats entre sí, podrien tenir un paper important en la regulació i equilibri de l'ecosistema vaginal humà, i contrarrestar als patògens uro-genitals que hi arribin. Les indicacions preventives i/o terapèutiques més immediates podrien ser les infeccions del tracte urinari i les vulvovaginitis candidiàsiques.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. **Agace W, Connell H, Svanborg C.** Host resistance to urinary tract infection. En: Mobley H, Warren J, eds. Urinary tract infections. Molecular pathogenesis and clinical management. Washington: American Society for Microbiology, **1996**; 221-43.
2. **Aguirre M, Collins MD.** Lactic acid bacteria and human clinical infection. J Appl Bacteriol **1993**; 75: 95-107.
3. **Alander M, De Smet I, Nollet L, Verstraete W, von Wright A, Mattila-Sandholm T.** The effect of probiotic strains on microbiota of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME). Int J Food Microbiol **1999**; 46: 71-9.
4. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J,** eds. How cells are studied. Molecular biology of the cell. New York: Garland Publishing, Inc., **1994**; 139-91.
5. **Anderson B, Berry R, Telser A.** A sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis system that separates peptides and proteins in the molecular weight range of 2,500 to 90,000. Anal Biochem **1983**; 132: 365-75.
6. **Anderssen E, Diep D, Nes I, Eijsink V, Nissen-Meyer J.** Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, Plantacirins EF and JK, and the induction factor Plantacirina A. Appl Environ Microbiol **1998**; 64: 2269-72.
7. **Andreu A, Stapleton AE, Fennel CL, Hillier SL, Stamm WE.** Hemagglutination, adherence, and surface properties of vaginal *Lactobacillus* species. J Infect Dis **1995**; 171: 1237-40.

8. **Andreu A, Stapleton AE, Fennel CL, Lockman HA, Xercavins M, Fernández F et al.** Urovirulence determinants of *Escherichia coli* strains causing prostatitis. *J Infect Dis* **1997**; 176: 464-7.
9. **Andreu A, Xercavins M, Fernández F.** Fimbrias tipo 1, fimbrias P y adhesinas S, en cepas de *Escherichia coli* productoras de pielonefritis, cistitis e infecciones urinarias de repetición. *Med Clin (Barc)* **1989**; 92: 409-12.
10. **Andreu A.** Infecciones urinarias: aspectos puntuales. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **1995**; 13:527-31.
11. **Antonio M, Hawes S, Hillier S.** The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J Infect Dis* **1999**; 180: 1950-6.
12. **Antonio M, Hillier SL.** Repetitive sequence PCR (Rep-PCR) DNA fingerprint of *Lactobacillus crispatus* CTV- 005 vaginal suppository strain. En: Abstracts of the 97th American Society for Microbiology General Meeting. Miami Beach, 4-8 de mayo, **1997**; p 126 (resum C-035).
13. **Axelsson L, Holck A.** The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J Bacteriol* **1995**; 177: 2125-37.
14. **Baerheim A, Larsen E, Digranes A.** Vaginal application of lactobacilli in the prophylaxis of recurrent lower urinary tract infection in women. *Scand J Prim Health Care* **1994**; 12: 239-43.

15. **Bantar C, Relloso S, Rodríguez-Castell F, Smayevsky J, Bianchini H.** Abscess caused by vancomycin-resistant *Lactobacillus confusus*. J Clin Microbiol **1991**; 29: 2063-4.
16. **Barefoot S, Klaenhammer T.** Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl Environ Microbiol **1983**; 45: 1808-15.
17. **Barefoot S, Klaenhammer T.** Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. Antimicrob Agents Chemother **1984**; 26: 328-34.
18. **Barrow G, Feltham R,** eds. Characters of Gram-positive bacteria. Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge: Cambridge University Press, **1993**; 75-9.
19. **Bayer A, Chow A, Concepcion A, Guze L.** Susceptibility of 40 lactobacilli to six antimicrobial agents with broad Gram-positive anaerobic spectra. Antimicrob Agents Chemother **1978**; 14: 720-2.
20. **Blom H, Katla T, Hagen B, Axelsson L.** A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins. Int J Food Microbiol **1997**; 38: 103-9.
21. **Blombreg L, Henriksson A, Conway PL.** Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus* spp. Appl Environ Microbiol **1993**; 59: 34-9.
22. **Boris S, Suárez JE, Barbés C.** Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. J Appl Microbiol **1997**; 83: 413-20.

23. **Boris S, Suárez JE, Vázquez F, Barbés C.** Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infect Immun* **1998**; 66: 1985-9.
24. **Bruberg M, Nes I, Eijsink V.** Pheromone-induced production of antimicrobial peptides in *Lactobacillus*. *Mol Microbiol* **1997**; 26: 347-60.
25. **Bruce AW, Reid G.** Intravaginal instillation of lactobacilli for prevention of recurrent urinary tract infections. *Can J Microbiol* **1988**; 34: 339-43.
26. **Buts J, Bernasconi P, Van Craynest M, Maldague P, De Meyer R.** Response of human and rat small intestinal mucosa to oral administration of *Saccharomyces boulardii*. *Pediatr Res* **1986**; 20: 192-6.
27. **Cadieux P, Burton J, Gardiner G, Braunstein I, Bruce A, Kang CY et al.** *Lactobacillus* strains and vaginal ecology. *JAMA* **2002**; 287: 1940-1.
28. **Carr PL, Felsenstein D, Friedman RH.** Evaluation and management of vaginitis. *J Gen Intern Med* **1998**; 13: 335-46.
29. **Catalanotti PG, Rosano F, De Paolis P, Baroni A, Buttini G, Tufano MA.** Effects of cetyltrimethylammonium naproxenate on the adherence of *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus curtisii*, and *Lactobacillus acidophilus* to vaginal epithelial cells. *Sex Transm Dis* **1994**; 21: 338-44.
30. **Chan RCY, Reid G, Irvin RT, Bruce AW, Costerton JW.** Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragments. *Infect Immun* **1985**; 47: 84-9.
31. **Charteris W, Kelly P, Morelli L, Collins J.** Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotics *Lactobacillus* and

38. **DeVuyst L, Callewaert R, Crabbé K.** Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology* **1996**; 142: 817-27.
39. **Diep D, Håvarstein L, Nes I.** A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Mol Microbiol* **1995**; 18: 631-9.
40. **Doug-Wagner R, Pierson C, Warner T, Dohnalek M, Farmer J, Roberts L et al.** Biotherapeutics effects of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice. *Infect Immun* **1997**; 65: 4165-72.
41. **Drago L, Gismondo M, Lombardi A, de Haën C, Gozzini L.** Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. *FEMS Microbiol Lett* **1997**; 153: 455-63.
42. **Drutz DJ.** *Lactobacillus* prophylaxis for *Candida* vaginitis. *Ann Intern Med* **1992**; 116:419-20.
43. **Eijsink V, Brurberg M, Middelhoven H, Nes I.** Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. *J Bacteriol* **1996**; 178: 2232-7.
44. **Eijsink V, Skeie M, Middelhoven H, Brurberg M, Nes I.** Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* **1998**; 64: 3275-81.
45. **Elmer G, Surawicz C, McFarland L.** Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *JAMA* **1996**; 275: 870-6.

46. **Eschenbach D, Davick P, Williams B, Klebanoff S, Young-Smith K, Critchlow C et al.** Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* **1989**; 27: 251-6.
47. **Felten A, Barreau, Bizet C, Lagrange P, Philippon A.** *Lactobacillus* species identification, H₂O₂ production, and antibiotic resistance and correlation with human clinical status. *J Clin Microbiol* **1999**; 37: 729-33.
48. **Fernandes C, Shahani K, Amer M.** Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products. *FEMS Microbiol Rev* **1987**; 46: 343-56.
49. **Fidel PL, Sobel JD.** Protective immunity in experimental *Candida* vaginitis. *Res Immunol* **1998**; 149: 361-73.
50. **Fitzsimmons N, Berry DR.** Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*: evidence for the involvement of a peroxidase system. *Microbios* **1994**; 80: 125-133.
51. **Fourniat J, Colomban C, Linxe C, Karam D.** Heat-killed *Lactobacillus acidophilus* inhibits adhesion of *Escherichia coli* B41 to HeLa cells. *An Rech Vet* **1992**; 23: 361-70.
52. **Fowler J, Latta R, Stamey T.** Studies of introital colonization in women with recurrent urinary infections. VIII. The role of bacterial interference. *J Urol* **1977**; 118: 296-8.
53. **Foxman B, Zhang L, Palin K, Tallman P, Marrs C.** Bacterial virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates from first-time urinary tract infection. *J Infect Dis* **1995**; 171: 1514-21.

54. **Fruchart C, Salah A, Gray C, Martin E, Stamatoullas A, Bonmarchand G et al.** *Lactobacillus* species as emerging pathogens in neutropenic patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1997**; 16: 681-4.
55. **Fuller R.** Nature of the determinant responsible for the adhesion of lactobacilli to chicken crop epithelial cells. *J Gen Microbiol* **1975**; 87: 245-50.
56. **Fuller R.** Probiotics in human medicine. *Gut* **1991**; 32: 439-42.
57. **García-Rodríguez JA, Muñoz JL.** Estructura bacteriana. En: García-Rodríguez JA, Picazo JJ, eds. *Microbiología Médica. 1-Microbiología médica general*. Madrid: Harcourt Brace; **1998**; p. 41-51.
58. **Gardiner G, Heinemann C, Bruce A, Beuerman D, Reid G.** Persistence of *Lactobacillus fermentum* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 but not *L. rhamnosus* GG in the human vagina as demonstrated by randomly amplified polymorphic DNA. *Clin Diag Lab Immunol* **2002**; 9: 92-6.
59. **Garriga M, Hugas M, Aymerich T, Monfort JM.** Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from fermented sausages. *J Appl Bacteriol* **1993**; 75: 142-8.
60. **Garver K, Muriana P.** Detection, identification and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from retail foods products. *Int J Food Microbiol* **1993**; 19: 241-58.
61. **Ghelardi E, Tavanti A, Lupetti A, Celandroni F, Boldrini E, Campa M, Senesi S.** Control of *Candida albicans* murine vaginitis by topical

- administration of polycarbophil-econazole complex. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**; 42: 2434-6.
62. **Gilbert D, Moellering R, Jr., Sande M**, eds. Initial choice of antimicrobial therapy. *The Sanford guide to antimicrobial therapy*. Hyde Park: Antimicrobial Therapy, Inc., **1999**; 49.
63. **Gilliland S**. Health and nutritional benefits from acid lactic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **1990**; 87: 175-88.
64. **Glover D, Larsen B**. Longitudinal investigation of *Candida* vaginitis in pregnancy: role of superimposed antibiotic use. *Obstet Gynecol* **1998**; 91: 115-8.
65. **Goldin B**. Health benefits of probiotics. *Br J Nutr* **1998**; 80: S203-7.
66. **Gorbach S, Chang T, Goldin B**. Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. *Lancet* **1987**; 2 (8574): 1519.
67. **Greene JY, Klaenhammer TR**. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol* **1994**; 60: 4487-94.
68. **Griffiths J, Daly J, Dodge R**. Two cases of endocarditis due to *Lactobacillus* species: antimicrobial susceptibility, review, and discussion of therapy. *Clin Infect Dis* **1992**; 15: 250-5.
69. **Guarino A, Canani R, Spagnuolo M, Albano F, Di Benedetto L**. Oral bacterial therapy reduces the duration of symptoms and of viral excretion in children with mild diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **1997**; 25: 516-9.

-
70. **Guarner F, Schaafsma G.** Probiotics. *Int J Food Microbiol* **1998**; 39: 237-8.
71. **Gupta K, Stapleton A, Hooton T, Roberts P, Fennell C, Stamm W.** Inverse association of H₂O₂-producing lactobacilli and vaginal *Escherichia coli* colonization in women with recurrent urinary tract infections. *J Infect Dis* **1998**; 178: 446-50.
72. **Hamilton-Miller J, Shah S, Smith C.** Probiotics remedies are not what they seem. *BMJ* **1996**; 312: 55-6.
73. **Hamilton-Miller JM, Shah S.** Susceptibility patterns of vaginal lactobacilli to eleven oral antibiotics. *J Antimicrob Chemother* **1994**; 33: 1059-60.
74. **Hamilton-Miller JM, Shah S.** Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of lactobacilli. *Lett Appl Microbiol* **1998**; 26: 153-4.
75. **Hauge H, Mantzilas D, Moll G, Konings W, Driessen A, Eijsink V et al.** Plantaricin A is an amphiphilic α -helical bacteriocin-like pheromone which exerts antimicrobial and pheromone activities through different mechanisms. *Biochemistry* **1998**; 37: 1626-32.
76. **Hawes S, Hillier S, Benedetti J, Stevens C, Koutsky L, Wølner-Hanssen P et al.** Hydrogen peroxide-producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections. *J Infect Dis* **1996**; 174: 1058-63.
77. **Henriksson A, Conway P.** Isolation of human fecal bifidobacteria which reduce signs of *Salmonella* infection when orogastrically dosed to mice. *J Appl Microbiol* **2001**; 90: 223-8.

78. **Henriksson A, Szewzyk R, Conway P.** Characteristics of the adhesive determinants of *Lactobacillus fermentum* 104. *Appl Environ Microbiol* **1991**; 57: 499-502.
79. **Herra C, Cafferkey M, Keane C.** The in-vitro susceptibilities of vaginal lactobacilli to four broad-spectrum antibiotics, as determined by the agar dilution and E test methods. *J Antimicrob Chemother* **1995**; 35: 775-83.
80. **Herthelius M, Gorbach SL, Mølby R, Nord CE, Pettersson L, Winberg J.** Elimination of vaginal colonization with *Escherichia coli* by administration of indigenous flora. *Infect Imm* **1989**; 57: 2447-51.
81. **Hillier SL, Krohn MA, Klebanoff SJ, Eschenbach DA.** The relationship of hydrogen peroxide-producing lactobacilli to bacterial vaginosis and genital microflora in pregnant women. *Obstet Gynecol* **1992**; 79: 369-73.
82. **Hillier SL, Lau J.** Vaginal microflora in postmenopausal women who have not received estrogen replacement therapy. *Clin Infect Dis* **1997**; 25 (Suppl 2): S123-6.
83. **Hillier SL, Moncla BJ.** Anaerobic Gram-positive nonsporeforming bacilli and cocci. En: Balows A, Hausler W, Jr., Herrmann K, Isenberg H, Shadomy H, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: American Society for Microbiology, **1991**; 522-37.
84. **Hilton E, Isenberg HD, Alperstein P, France K, Borenstein MT.** Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candidal vaginitis. *Ann Intern Med* **1992**; 116: 353-7.
85. **Hilton E, Rindos P.** *Lactobacillus* GG vaginal suppositories and vaginitis. *J Clin Microbiol* **1995**; 33: 1433.

-
86. **Hooton T, Scholes D, Hughes J, Winter C, Roberts P, Stapleton A et al.** A prospective study of risk factors for symptomatic urinary tract infection in young women. *N Engl J Med* **1996**; 335: 468-74.
 87. **Hooton TM, Fennell CL, Clark AM, Stamm WE.** Nonoxynol-9: differential activity and enhancement of bacterial adherence to vaginal epithelial cells. *J Infect Dis* **1991**; 164: 1216-9.
 88. **Hori T, Kiyoshima J, Shida K, Yasui H.** Augmentation of cellular immunity and reduction of influenza virus titer in aged mice fed *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Clin Diag Lab Immunol* **2002**; 9: 105-8.
 89. **Hostetter MK.** Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev* **1994**; 7: 29-42.
 90. **Hughes VL, Hillier SL.** Microbiologic characteristics of *Lactobacillus* products used for colonization of the vagina. *Obstet Gynecol* **1990**; 75: 244-8.
 91. **Hyronimus B, Le Marrec C, Urdaci M.** Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I₄. *J Appl Microbiol* **1998**; 85: 42-50.
 92. **Isenberg HD, D'Amato R.** Indigenous and pathogenic microorganisms of humans. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: American Society for Microbiology, **1995**; 5-18.

93. **Isolauri E, Juntunen M, Rautanen T, Sillanauke P, Koivula T.** A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* **1991**; 88: 90-7.
94. **Itoh T, Fujimoto Y, Toba T, Saito T.** Inhibition of food-borne pathogenic bacteria by bacteriocins from *Lactobacillus gasseri*. *Lett Appl Microbiol* **1995**; 21: 137-41.
95. **Jack R, Tagg J, Ray B.** Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* **1995**; 59: 171-200.
96. **Jiménez-Díaz R, Ruiz-Barba J, Cathcart D, Holo E, Nes I, Sletten K et al.** Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Appl Environ Microbiol* **1995**; 61: 4459-63.
97. **Jin LZ, Ho YW, Ali MA, Abdullah N, Jalaludin S.** Effect of adherent *Lactobacillus* spp. on *in vitro* adherence of *salmonellae* to the intestinal epithelial cells of chicken. *J Appl Bacteriol* **1996**; 81: 201-6.
98. **Johnson J.** Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* **1991**; 4: 80-128.
99. **Judd R.** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of peptides. En: Walker J, eds. *The Protein protocols handbook*. Totowa: Humana Press Inc., **1996**; 101-7.
100. **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: 1061-7.

101. **Kandler O, Weiss N.** Regular, nonsporing Gram-positive rods. En: Sneath P, Mair N, Sharpe M E, Holt J, eds. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, **1986**; 1208-34.
102. **Keane F, Ison C, Taylor-Robinson D.** A longitudinal study of the vaginal flora over a menstrual cycle. *Internat J STD AIDS* **1997**; 8: 489-94.
103. **Klaenhammer T.** Bacteriocins of acid lactic bacteria. *Biochimie* **1988**; 70: 337-49.
104. **Klaenhammer T.** Genetics of bacteriocins produced by acid lactic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **1993**; 12: 39-86.
105. **Klebanoff S, Hillier S, Eschenbach D, Waltersdorff A.** Control of the microbial flora of the vagina by H₂O₂-generating lactobacilli. *J Infect Dis* **1991**; 164: 94-100.
106. **Klebanoff S, Watts R, Mehlin C, Headley C.** Lactobacilli and vaginal host defense: Activation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat, cytokine production, and NF-κB. *J Infect Dis* **1999**; 179: 653-60.
107. **Klein G, Zill E, Schindler R, Louwers J.** Peritonitis associated with vacomycin-resistant *Lactobacillus rhamnosus* in a continuous ambulatory peritoneal dialysis patient: organism identification, antibiotic therapy, and case report. *J Clin Microbiol* **1998**; 36: 1781-3.
108. **Koneman E, Allen S, Dowell V, Janda W, Sommers H, Winn W,** eds. *Bacilos Gram positivos aerobios. Diagnóstico microbiológico Texto y*

- Atlas a color. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S:A., **1992**; 453-87.
109. **Kontiokari T, Sundqvist K, Nuutmen M, Pokka T, Koskel M, Uhari M.** Randomised trial of cranberry-lingonberry juice and *Lactobacillus* GG drink for the prevention of urinary tract infections in women. *BMJ* **2001**; 322: 1571-3.
110. **Lachlak N, Ageron E, Zampatti O, Michel G, Grimont P.** Composition of the *Lactobacillus acidophilus* complex isolated from vaginal flora. *Microbiologica* **1996**; 19: 123-32.
111. **Laemli U.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **1970**; 227: 680-95.
112. **Larsen B, Galask R.** Vaginal microbial flora: composition and influences of host physiology. *Ann Intern Med* **1982**; 96: 926-30.
113. **Larsen B.** Vaginal flora in health and disease. *Clin Obstet Gynecol* **1993**; 36: 107-21.
114. **Larsen B, Monif G.** Understanding the bacterial flora of the female genital tract. *Clin Infect Dis* **2001**; 32:67-77.
115. **Levison ME, Trestman I, Quach R, Sladowski C, Floro CN.** Quantitative bacteriology of the vaginal flora in vaginitis. *Am J Obstet Gynecol* **1979**; 133: 139-44.
116. **Lidbeck A, Nord C.** Lactobacilli and the normal human anaerobic microflora. *Clin Infect Dis* **1993**; 16 (suppl 4): S181-7.
117. **Lomberg H, Hanson LA, Jacobsson B, Jodal U, Leffler H, Svanvorg-Edén C.** Correlation of P blood group, vesicouretral reflux, and bacterial

- attachment in patients with recurrent pyelonephritis. *N Eng J Med* **1983**; 308: 1189-92.
118. **Mackey T, Lejeune V, Janssens M, Wauters G.** Identification of vancomycin-resistant lactic bacteria isolated from humans. *J Clin Microbiol* **1993**; 31: 2499-2501.
119. **Mård P.** The vaginal ecosystem. *Am J Obstet Gynecol* **1991**; 165: 1163-8.
120. **Marteau P, Rambaud JC.** Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. *FEMS Microbiol Rev* **1993**; 12: 207-20.
121. **Matsuzaki T.** Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Int J Food Microbiol* **1998**; 41: 133-40.
122. **McDougall, Holzapfel W, Schillinger U, Feely D, Rupnow J.** Scanning electron microscopy to target cells and molecular weight determination of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* D53. *Int J Food Microbiol* **1994**; 24: 295-308
123. **McFarland L, Surawicz C Greenberg R, Fekety R, Elmer G, Moyer K et al.** A randomised placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *JAMA* **1994**; 271: 1913-8.
124. **McFarland LV, Elmer GW.** Biotherapeutic agents: past, present and future. *Microecol Ther* **1995**; 23: 46-73.

125. **McGroarty JA, Chong S, Reid G, Bruce AW.** Influence of spermicidal compound nonoxynol-9 on the growth and adhesion of urogenital bacteria in vitro. *Curr Microbiol* **1990**; 21: 219-33.
126. **McGroarty JA.** Cell surface appendages of lactobacilli. *FEMS Microbiol Lett* **1994**; 124: 405-10.
127. **McGroarty JA.** Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract. *FEMS Immunol Med Microbiol* **1993**; 6: 251-64
128. **McGroarty J, Reid G.** Detection of a *Lactobacillus* substance that inhibits *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* **1988**; 34: 974-8.
129. **McLean N, McGroarty J.** Growth inhibition of metronidazole-susceptible and metronidazole-resistant strains of *Gardnerella vaginalis* by lactobacilli in vitro. *Appl Environ Microbiol* **1996**; 62: 1089-92.
130. **Millar M, Bacon C, Smith S, Hall M.** Enteral feeding of premature infants with *Lactobacillus* GG. *Archiv Dis Childhood* **1993**; 69: 483-9.
131. **Millsap KW, Reid G, van der Mei HC, Busscher HJ.** Adhesion of *Lactobacillus* species in urine and phosphate buffer to silicone rubber and glass under flow. *Biomaterials* **1997**; 18: 87-91.
132. **Miteva V, Ivanova I, Budakov I, Pantev A, Stefanova T, Danova S, et al.** Detection and characterization of novel antibacterial substance produced by a *Lactobacillus delbrueckii* strain 1043. *J Appl Microbiol* **1998**; 85: 603-14.
133. **Mitrovic S, Kranjic-Zec I, Arsic V, Dzamic A.** Candida adherence to human epithelial cells with regard to its pathogenicity. *J Chemother* **1995**; 7: 18-20.

134. **Monif GRG, Carson HJ.** Female genital tract bacterial coisolates with *Candida albicans* in patients without clinical vaginitis. *Infect Dis Obstet Gynecol* **1998**; 6: 52-6.
135. **Morata de Ambrosini V, González S, Pesce. De Ruiz Holgado A, Oliver G.** Study of the morphology of the cell walls of some strains of lactic acid bacteria and related species. *J Food Prot* **1998**; 61: 557-62.
136. **Naaber P, Klaus K, Sepp E, Björkstén B, Mikelsaar M.** Colonization of infants and hospitalised patients with *Clostridium difficile* and Lactobacilli. *Clin Infect Dis* **1997**; 25 (Suppl 2): S189-90.
137. **Neu T.** Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacterial with interfaces. *Microbiol Rev* **1996**; 60: 151-66.
138. **Osset J, Bartolomé RM, Andreu A.** Estudio del bloqueo que *Lactobacillus* ejerce sobre la adhesión de los uropatógenos al epitelio vaginal. En: Programa y Resúmenes del VIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Palma de Mallorca, 24-27 de maig, **1998**; p. 214 (resum 22-9).
139. **Osset J, Bartolomé RM, Andreu A.** Inhibitory activity and adherence blockage of vaginal Lactobacillus against *C. albicans*. En: Program and Abstracts of International Congress of Sexually Transmitted Diseases and Research. Sevilla, 19-22 d'octubre, **1997**; p. 174 (resum P 671).
140. **Osset J, Bartolomé RM, Andreu A.** Inhibitory activity of *Lactobacillus* against uropathogens. En: Abstracts of the 97th American Society for Microbiology General Meeting. Miami Beach, 4-8 de maig, **1997**; p. 83 (resum B-315).

141. **Osset J, Bartolomé RM, García E, Andreu A.** Assessment of the capacity of *Lactobacillus* to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cells. *J Infect Dis* **2001**; 183: 485-91.
142. **Osset J, Bartolomé RM, García E, Andreu A.** Papel de *Lactobacillus* como factor protector de la candidiasis vaginal. *Med Clin (Barc)* **2001**; 117: 285-8.
143. **Osset J, García E, Bartolomé RM, Andreu D, Valero ML, Andreu A.** Caracterización de las sustancias antibióticas excretadas por *Lactobacillus*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2000**; 18 (supl 1): 7 (resum 23).
144. **Otero L, Palacio V, Carreño F, Méndez FJ, Vázquez F.** Vulvovaginal candidiasis in female sex workers. *Int J STD AIDS* **1998**; 9: 526-30.
145. **Ouwehand AC, Conway PL.** Purification and characterization of a component produced by *Lactobacillus fermentum* that inhibits the adhesion of K88 expressing *Escherichia coli* to porcine ileal mucus. *J Appl Bacteriol* **1996**; 80: 311-8.
146. **Parente E, Brienza C, Moles M, Ricciardi A.** A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. *J Microbiol Meth* **1995**; 22: 95-108.
147. **Peeters R, Snauwaert R, Segers J, Van Cutsem, Amery W.** Observations on candidal vaginitis. *Am J Obstet Gynecol* **1972**; 112: 80-6.
148. **Pelletier C, Bouley C, Cayuela C, Bouttier S, Bourlioux P, Bellon-Fontaine MN.** Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp.

- casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. Appl Environ Microbiol **1997**; 63: 1725-31.
149. **Perdigon G, Nader de Macías M, Álvarez S, Oliver G, Pesce de Ruiz Holgado A.** Effect of periorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. Infect Immun **1986**; 53: 404-10.
150. **Pfaller M, Herwaldt L.** The clinical microbiology laboratory and infection control: Emerging pathogens, antimicrobial resistance, and new technology. Clin Infect Dis **1997**; 25: 858-70.
151. **Pfau A, Sacks T.** The bacterial flora of the vaginal vestibule, urethra and vagina in premenopausal women with recurrent urinary tract infections. J Urol **1981**; 126: 630-4.
152. **Piccinni MP, Vultaggio A, Scaletti C, Livi C, Gómez MJ, Giudizi M et al.** Type 1 T Helper cells specific for *Candida albicans* antigens in peripheral blood and vaginal mucosa of women with recurrent vaginal candidiasis. J Infect Dis **2002**; 186: 87-93.
153. **Pool-Zobel BL, Neudecker C, Domizlaff I, Ji S, Schillinger U, Rummey C, et al.** *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-mediated antigenotoxicity in the colon of rats. Nutr Cancer **1996**; 26: 365-80.
154. **Pouwels P, Leer R, Boersma W.** The potential of *Lactobacillus* as a carrier for oral immunization: Development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigens, J Biotechnol **1996**; 44: 183-92.

155. **Pozo-Olano J, Warram J, Gómez R, Cavazos M.** Effect of a Lactobacilli preparations on traveler's diarrhea. A randomised, double blind clinical trial. *Gastroenterology* **1978**; 74: 829-30.
156. **Raz R, Stamm W.** A controlled trial of intravaginal estriol in postmenopausal women with recurrent urinary tract infections. *N Eng J Med* **1993**; 329: 753-6.
157. **Redondo-López V, Cook RL, Sobel JD.** Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev Infect Dis* **1990**; 12: 856-72.
158. **Reid G, Beuerman D, Heinemann C, Bruce A.** Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2001**; 32: 37-41.
159. **Reid G, Brooks HJL, Bacon DF.** In vitro attachment of *Escherichia coli* to human uroepithelial cells: variation in receptivity during the menstrual cycle and pregnancy. *J Infect Dis* **1983**; 148: 412-21.
160. **Reid G, Bruce A, Cook R, Llano M.** Effect on urogenital flora of antibiotic therapy for urinary tract infection. *Scand J Infect Dis* **1990**; 22: 43-7.
161. **Reid G, Bruce A, Fraser N, Heinemann C, Owen J, Henning B.** Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2001**; 30: 49-52.
162. **Reid G, Bruce A.** Selection of *Lactobacillus* strains for urogenital probiotic applications. *J Infect Dis* **2001**; 183 (Suppl 1): S77-80.

163. **Reid G, Bruce AW, McGroarty JA, Cheng KJ, Costerton JW.** Is there a role for Lactobacilli in prevention of urogenital and intestinal infections?. Clin Microbiol Rev **1990**; 3: 335-44.
164. **Reid G, Bruce AW, Taylor M.** Influence of three-day antimicrobial therapy and *Lactobacillus* vaginal suppositories on recurrence of urinary tract infection. Clin Ther **1992**; 14: 11-6.
165. **Reid G, Burton J.** Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. Microbes Infect **2002**; 4: 319-24.
166. **Reid G, Cook RL, Bruce AW.** Examination of strains of lactobacilli for properties that may influence bacterial interference in the urinary tract. J Urol **1987**; 138: 330-5.
167. **Reid G, Cuperus PL, Bruce AW, van der Mei HC, Tomczek L, Khoury AH et al.** Comparison of contact angles and adhesion to hexadecane of urogenital, dairy and poultry lactobacilli: effect of serial culture passages. Appl Environ Microbiol **1992**; 58: 1549-53.
168. **Reid G, Lam D, Bruce AW, van der Mei HC, Busscher HJ.** Adhesion of lactobacilli to urinary catheters and diapers: effect of surface properties. J Biomed Mat Res **1994**; 28: 731-4.
169. **Reid G, McGroarty J, Angotti R, Cook R.** *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropatogens. Can J Microbiol **1988**; 34: 344-51.
170. **Reid G, Millsap K, Bruce AW.** Implantation of *Lactobacillus casei* var *rhamnosus* into vagina. Lancet **1994**; 344: 1229.

171. **Reid G, Sobel JD.** Bacterial adherence in the pathogenesis of urinary tract infection: A review. *Rev Infect Dis* **1987**; 9: 470-87.
172. **Reid G, Soboh F, Bruce A, Mittelman M.** Effect of nutrient composition on the in vitro growth of urogenital lactobacilli and uropathogens. *Can J Microbiol* **1998**; 44: 866-71.
173. **Reid G.** Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *Am J Clin Nutr* **2001**; 73 (Suppl 2): S437-43.
174. **Reid G.** Probiotic therapy and functional foods for prevention of urinary tract infections: state of the art and science. *Curr Infect Dis Rep* **2000**: 2: 518-22.
175. **Rein M.** Vulvovaginitis y cervicitis. En: Mandell G, Douglas R, Bennett J, eds. *Enfermedades infecciosas, principios y práctica*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A., **1991**; 1003-16.
176. **Ries A.** Treatment of vaginal infections: candidiasis, bacterial vaginosis, and trichomoniasis. *J Am Pharm Assoc* **1997**; 37: 563-9.
177. **Rodríguez L, Batlle M, Oriol A, Ribera JM.** Bacteriemia por *Lactobacillus* spp. en un paciente con neutropenia secundaria al tratamiento de una leucemia aguda. *Med Clin (Barc)* **2001**; 117: 758.
178. **Rosenstein I, Grady D, Hamilton-Miller J, Brumfitt W.** Relationship between adhesion of *Escherichia coli* to uro-epithelial cells and the pathogenesis of urinary infection: problems in the methodology and analysis. *J Med Microbiol* **1985**; 20: 335-44.

179. **Ross R, Lee M, Delaney M, Onderdonk B.** Mixed-effect models for predicting microbial interactions in the vaginal ecosystem. *J Clin Microbiol* **1994**; 32: 871-7.
180. **Ross R, Lee M, Onderdonk A.** Effect of *Candida albicans* infection and clotrimazole treatment on vaginal microflora in vitro. *Obstet Gynecol* **1995**; 86: 925-30.
181. **Rossel Goffeng A, Holst E, Nilsson C, Milsom I, Andersch B.** Microorganisms in vaginal fluid from women in prolonged pregnancy. *Gynecol Obstet Invest* **1997**; 44: 16-20.
182. **Rush C, Hafner L, Timms P.** Lactobacilli: vehicles for antigens delivery to the females urogenital tract. En: Mestecky J, eds. *Advances in Mucosal Immunology*. New York: Plenum press, **1995**; p. 1547-52.
183. **Russo T, Stapleton A, Wenderoth S, Hooton T, Stamm W.** Chromosomal restriction fragment length polymorphism analysis of *Escherichia coli* strains causing recurrent urinary tract infections in young women. *J Infect Dis* **1995**; 172: 440-5.
184. **Salminen S, von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, de Vos W et al.** Demonstration of safety of probiotics – a review. *Int J Food Microbiol* **1998**; 44: 93-106.
185. **Saltzman J, Russell R, Golner B, Barakat S, Dallal G, Goldin B.** A randomised trial of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 to treat lactose intolerance. *Am J Clin Nutr* **1999**; 69: 140-6.
186. **Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T,** eds. Appendix B: preparation of reagents and buffers used in molecular cloning. *Molecular cloning, a*

- laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; B16-17.
187. **Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T**, eds. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of proteins. Molecular cloning, a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; 18--46-49.
188. **Sarem F, Sarem-Damerdjı LO, Nicolas JP**. Comparison of the adherence of three *Lactobacillus* strains to Caco-2 and Int-407 human intestinal cell lines. Lett Appl Microbiol 1996; 22: 439-42.
189. **Saxelin M, Chuang NH, Chassy B, Rautelin H, Mäkelä H, Salminen S** et al. Lactobacilli and bacteriemia in Southern Finland, 1989-1992. Clin Infect Dis, 1996; 22: 564-6.
190. **Schaeffer A**. What do we know about the urinary tract infection-prone individual?. J Infect Dis 2001; 183 (Suppl 1): S66-9.
191. **Schägger H, von Jagow G**. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal Biochem 1987; 166: 368-79.
192. **Schiffrin E, Brassat D, Servin A, Rochat F, Donnet-Hughes A**. Immune modulation of blood leukocytes in humans by acid bacteria criteria for strain selection. Am J Clin Nutr 1997; 66: S515-20.
193. **Schillinger U, Holzapfel H**. Guidelines for manuscripts on bacteriocins of lactic acid bacteria. Int J Food Microbiol 1996; 33: iii-v.
194. **Schillinger U, Kaya M, Lücke FK**. Behavior of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. J Appl Bacteriol 1991; 70: 473-8.

195. **Schillinger U, Lücke FK.** Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ Microbiol* **1989**; 55: 1901-6.
196. **Scholes D, Hooton T, Roberts P, Stapleton A, Gupta K, Stamm W.** Risk factors for recurrent urinary tract infection in young women. *J Infect Dis* **2000**; 182: 1177-82.
197. **Seligman S.** Döderlein's bacillus: friend or foe?. *Br J Obstet Gynaecol* **1995**; 102: 763-4.
198. **Shalev E, Battino S, Weiner E, Colodner R, Keness Y.** Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* compared with pasteurized yogurt as prophylaxis for recurrent candidal vaginitis and bacterial vaginosis. *Arch Fam Med* **1996**; 5: 593-6.
199. **Silva M, Jacobus N, Deneke C, Gorbach S.** Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob agents Chemother* **1987**; 31: 1231-3.
200. **Sobel J, Kaye D.** Infecciones del tracto urinario. En: Mandell G, Douglas R, Bennett J, eds. *Enfermedades infecciosas, principios y práctica*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S:A, **1991**; 612-42.
201. **Sobel JD, Chaim W.** Vaginal microbiology of women with acute recurrent vulvovaginal candidiasis. *J Clin Microbiol* **1996**; 34: 2497-9.
202. **Sobel JD.** Vaginitis. *N Eng J Med* **1997**; 337: 1896-1903.
203. **Sobel JD.** Vulvovaginitis, when *Candida* becomes a problem. *Sex Trans Dis* **1998**; 16: 763-8.

-
204. **Sobrino O, Rodríguez J, Moreira W, Fernández M, Sanz B, Hernández P.** Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages. *Int J Food Microbiol* **1991**; 13: 1-10.
205. **Spencer RJ, Chesson A.** The effect of *Lactobacillus* spp. on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes. *J Appl Bacteriol* **1994**; 77: 215-20.
206. **Spiegel C.** Bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Rev* **1991**; 4: 485-502.
207. **Spinillo A, Capuzzo E, Acciano S, De Santolo A, Zara F.** Effect of antibiotic use on the prevalence of symptomatic vulvovaginal candidiasis. *Am J Obstet Gynecol* **1999**; 180: 14-7.
208. **Sprunt K, Leidy G.** The use of bacterial interference to prevent infection. *Can J Microbiol* **1988**; 34: 332-8.
209. **Stamey T, Sexton C.** The role of vaginal colonization with Enterobacteriaceae in recurrent urinary infections. *J Urol* **1975**; 113: 214-7.
210. **Stamey TA.** The role of introital enterobacteria in recurrent urinary infections. *J Urol* **1973**; 109: 467-72.
211. **Stamm W, Raz R.** Factors contributing to susceptibility of postmenopausal women to recurrent urinary tract infections. *Clin Infect Dis* **1999**; 28: 723-5.
212. **Stapleton A, Nudelman E, Clausen H, Hakomori S, Stamm W.** Binding of uropathogenic *Escherichia coli* R45 to glycolipids extracted from vaginal epithelial cells is dependent on histo-blood group secretor status. *J Clin Invest* **1992**; 90: 965-72.

-
213. **Stringaro A, Crateri P, Pellegrini G, Arancia G, Cassone A, De Bernardis F.** Ultrastructural localization of the secretory aspartyl proteinase in *Candida albicans* cell wall *in vitro* and in experimentally infected rat vagina. *Mycopathologia* **1997**; 137: 95-105.
214. **Suárez JE.** Microbiología y genética molecular de las bacterias del ácido láctico. En: Casadesús J, ed. Microbiología y genética molecular. Huelva: Universidad de Huelva, **1995**; 571-95.
215. **Svanborg-Edén C, Freter R, Hagberg L, Hull R, Hull S, Leffler H et al.** Inhibition of experimental ascending urinary tract infection by an epithelial cell-surface receptor analogue. *Nature* **1982**; 298: 560-2.
216. **Svanborg-Edén C, Hanson LA, Jodal U, Lindberg U, Akerlund AS.** Variable adherence to normal urinary-tract epithelial cells of *Escherichia coli* strains associated with various forms of urinary-tract infection. *Lancet* **1976**; 1 (7984): 490-2.
217. **Tahara T, Yoshioka S, Utsumi R, Kanatani K.** Isolation and partial characterization of bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* JCM 2124. *FEMS Microbiol Lett* **1997**; 148: 97-100.
218. **Tuomola EM, Salminen SJ.** Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cells cultures. *Int J Food Microbiol* **1998**; 41: 45-51.
219. **Vallor A, Antonio M, Hawes S, Hillier S.** Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli: role of hydrogen peroxide production. *J Infect Dis* **2001**; 184: 1431-6

-
220. **Van Reenen C, Dicks L, Chikondas M.** Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *J Appl Bacteriol* **1998**; 84: 1131-7.
221. **Vandenbergh PA.** Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol Rev* **1993**; 12; 221-38.
222. **Vanderhoof JA, Young RJ.** Use of probiotics in childhood gastrointestinal disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **1998**; 27: 323-32.
223. **Vaughan E, Daly C, Fitzgerald G.** Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. *J Appl Bacteriol* **1992**; 73: 299-308.
224. **Velraeds MMC, Van de Belt-Gritter B, Van der Mei HC, Reid G, Busscher HJ.** Interference in the initial adhesion of uropathogenic bacteria and yeast to silicone rubber by a *Lactobacillus acidophilus* biosurfactant. *J Med Microbiol* **1998**; 47: 1081-5.
225. **Velraeds MMC, van der Mei HC, Reid G, Busscher HJ.** Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* to solid substrata by an adsorbed biosurfactant layer from *Lactobacillus acidophilus*. *Urology* **1997**; 49: 790-4.
226. **Wadström T, Andersson, Sydow M, Axelsson L, Lindgren S, Gullmar B.** Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *J Appl Bacteriol* **1987**; 62: 513-20.

