

ELIANE MELO BROLAZO¹JOSE ANTONIO SIMÕES²MARIA ELENA FÁTIMA NADER³MARIA SILVINA JUÁREZ TOMÁS⁴GUSTAVO BUENO GREGORACCI⁵CAMILA MARCONI⁶

Prevalência e caracterização de espécies de lactobacilos vaginais em mulheres em idade reprodutiva sem vulvovaginites

Prevalence and characterization of vaginal lactobacillus species in women at reproductive age without vulvovaginitis

Artigo original

Palavras-chave

Lactobacillus /isolamento & purificação
Lactobacillus/epidemiologia
Vagina/microbiologia
Reação em cadeia da polimerase/métodos
Vulvovaginite

Keywords

Lactobacillus/isolation & purification
Lactobacillus/epidemiology
Polymerase chain reaction/methods
Vagina/microbiology
Vulvovaginitis

Resumo

OBJETIVO: identificar espécies de lactobacilos isolados do conteúdo vaginal de mulheres saudáveis e assintomáticas; determinar as espécies mais prevalentes e caracterizá-las fenotipicamente. **MÉTODOS:** lactobacilos foram isolados em meio seletivo a partir de amostras de conteúdo vaginal de 135 mulheres, sem queixa de corrimento e com diagnóstico laboratorial negativo para infecções vaginais, acompanhadas em um ambulatório de Planejamento Familiar. Os isolados foram identificados por PCR multiplex e, quando necessário, submetidos ao sequenciamento do gene RNAr 16S. Foram também avaliados quanto à acidificação do meio de cultura, à produção de ácido láctico, de H₂O₂, bacteriocinas e a capacidade de adesão às células epiteliais. **RESULTADOS:** oitenta e três cepas de lactobacilos foram isoladas e identificadas, sendo as espécies predominantes *L. crispatus* (30,1%), *L. jensenii* (26,5%), *L. gasseri* (22,9%) e *L. vaginalis* (8,4%). Apenas 20 destes isolados não produziram H₂O₂ em quantidades detectáveis. Das 37 linhagens selecionadas para teste de adesão a células epiteliais, 12 apresentaram adesão entre 50 a 69%, 10 apresentaram 70% ou mais, e as restantes pouca ou nenhuma adesão. Nenhum dos isolados produziu bacteriocinas. **CONCLUSÕES:** as espécies de lactobacilos mais prevalentes em mulheres sem vulvovaginites, isoladas em meio de cultura seletivo e identificadas por métodos moleculares, foram *L. crispatus*, *L. jensenii* e *L. gasseri*. Além de mais frequentes, tais linhagens também apresentaram melhor produção de H₂O₂ e atingiram menores valores de pH em meio de cultura.

Abstract

PURPOSE: to identify species of lactobacillus isolated from the vaginal contents of healthy and asymptomatic women, determining the most prevalent species and characterizing them phenotypically. **METHODS:** lactobacillus have been isolated in selective milieu from samples of the vaginal contents of 135 women without complaints of vaginal secretion, and with negative laboratorial diagnosis of vaginal infection, followed up at an outpatient clinic. After being identified by multiplex PCR, the isolates have been submitted to RNAr 16S gene sequencing, when necessary. They have also been evaluated concerning the production of lactic acid, H₂O₂, bacteriocins and the ability to adhere to epithelial cells. **RESULTS:** eighty-three lactobacillus strains were isolated and identified, *L. crispatus* (30.1%), *L. jensenii* (26.5%), *L. gasseri* (22.9%) e *L. vaginalis* (8.4%), being the prevalent species. Only 20 of those isolates did not present H₂O₂ production, in detectable amounts. From the 37 strains selected for the test of adhesion to the epithelial cells, 12 presented 50 to 69% of adhesion, 10 presented 70% or more, and the remaining, little or no adhesion at all. None of the tested strains produced bacteriocins. **CONCLUSIONS:** the lactobacillus species more prevalent in women without vulvovaginitis, isolated in selective culture milieu and identified by molecular methods were *L. crispatus*, *L. jensenii* and *L. gasseri*. Besides the fact of being more prevalent, these strains also presented better production of H₂O₂, and reached lower pH values in the culture milieu.

Correspondência:

Eliane Melo Brolazo
Caixa Postal: 6181
CEP 13084-971 – Campinas/SP, Brasil.
Fone: (19) 3289-2856
Fax: (19) 3289-2440
E-mail: elianeb@unicamp.br

Recebido

9/4/09

Aceito com modificações

29/4/09

Ambulatório de Planejamento Familiar da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil.

¹ Pós-graduanda (Doutorado) em Microbiologia pelo Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil.

² Professor do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil.

³ Doutora em Microbiologia; Pesquisadora responsável pelo Laboratório de Microbiologia Preventiva do Centro de Referência para Lactobacilos – CERELA – Tucumán, Argentina.

⁴ Doutora em Microbiologia; Pesquisadora do Laboratório de Microbiologia Preventiva do Centro de Referência para Lactobacilos – CERELA – Tucumán, Argentina.

⁵ Pós-graduando (Doutorado) em Microbiologia (Genética e Biologia Molecular) pelo Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil.

⁶ Pós-graduanda (Doutorado) pelo Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Botucatu (SP), Brasil.

Este projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 05/52649-4, pelo Programa de Doutorando no Brasil com Estágio no Exterior (PDEE) – Capes Processo: 4624/06-8 e subsídios do Conselho Nacional de Investigações Científicas e Técnicas da Argentina (CONICET).

Introdução

Em mulheres saudáveis, a flora vaginal é composta predominantemente por lactobacilos. Durante o período reprodutivo, há grande aporte de glicogênio nas células epiteliais da vagina, estimuladas pela presença de estrógenos. Este glicogênio é metabolizado pelos lactobacilos para formação de ácido láctico, o qual inibe o crescimento de outras espécies bacterianas, principalmente patogênicas e constitui o principal mecanismo de defesa local^{1,2}.

Esta atividade antagonista dos lactobacilos vaginais é um fator importante na proteção contra várias infecções, principalmente a vaginose bacteriana (VB), a vulvovaginite mais comum nas mulheres em idade reprodutiva. A VB causa corrimento vaginal geralmente com mau cheiro, além de consequências mais sérias, como parto prematuro e aumento do risco de contrair e transmitir o vírus da imunodeficiência humana (HIV)^{3,4}. É caracterizada pela substituição da flora vaginal normal, na qual predominam os lactobacilos por uma proliferação acentuada de *Gardnerella vaginalis* e outros micro-organismos anaeróbios associados^{5,6}.

A produção de ácidos orgânicos pelos lactobacilos mantém o pH vaginal menor ou igual a 4,5, criando um ambiente inóspito para os patógenos. O pH ácido, abaixo de 4,5, dificulta o crescimento da *G. vaginalis*, que tem como faixa ótima de crescimento, pH entre 6,0 e 6,5⁵. Além disso, a fixação dos lactobacilos no epitélio vaginal é favorecida em pH de 3,8 a 4,2, enquanto a *G. vaginalis* não se fixa às células do epitélio nessas condições de pH⁷.

Além dos ácidos orgânicos, os lactobacilos produzem outras substâncias antimicrobianas como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e bacteriocinas. A inibição de espécies bacterianas pela presença de H₂O₂ também é um mecanismo de antagonismo bastante importante. Os lactobacilos são capazes de oxidar os carboidratos por uma via metabólica, cujo produto final é o H₂O₂ e este na ausência de peroxidase, se acumula. O excesso desse metabólito pode inibir ou matar outros micro-organismos, principalmente os grupos com carência ou baixa produção de peroxidase, como os anaeróbios¹. Por isso, a ausência de lactobacilos produtores de H₂O₂ permite o crescimento dos micro-organismos catalase-negativos, sendo considerado um importante fator na fisiopatologia da VB⁸.

O tratamento preconizado para VB é o metronidazol, efetivo contra a maioria dos micro-organismos anaeróbios envolvidos nesta vulvovaginite. A taxa de cura de sete a dez dias após o tratamento está em torno de 80%, mas a recolonização vaginal com lactobacilos nem sempre ocorre após o tratamento, e as taxas de recidiva para VB chegam a 40% em médio prazo⁹.

Várias alternativas têm sido pesquisadas no sentido de prevenir a recidiva da VB após o tratamento habitual.

A alternativa mais promissora seria o uso de lactobacilos probióticos para recolonização vaginal. Infelizmente, nenhuma tentativa neste sentido obteve sucesso. A maior dificuldade parece estar no encontro da “linhagem ideal” de lactobacilos, capaz de recompor a flora vaginal, visto que a grande maioria das cepas experimentadas nem conseguem aderir ao epitélio vaginal^{10,11}. Assim, o objetivo deste estudo foi identificar taxonomicamente as espécies de lactobacilos isolados do conteúdo vaginal de mulheres saudáveis e assintomáticas; determinar as espécies mais prevalentes e caracterizá-las quanto à capacidade de acidificação, produção de ácido láctico, H₂O₂, bacteriocinas e sua capacidade de adesão às células do epitélio vaginal. Estas propriedades nos permitem selecionar um grupo de cepas para potencial aplicação biotecnológica, ou seja, com características de interesse para composição de um produto para a reconstituição de microbiota vaginal.

Métodos

Foram convidadas a participar do estudo mulheres em idade reprodutiva, sem queixa de corrimento vaginal, acompanhadas no ambulatório de Planejamento Familiar da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). As 135 mulheres selecionadas, após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética, sob número #202/2005, passaram por consulta ginecológica. Durante a consulta, foi realizada coleta do material vaginal para o isolamento dos lactobacilos e para a bacterioscopia de secreção vaginal corada por Gram para confirmação da ausência de infecções vaginais. Nos esfregaços corados, os morfotipos bacterianos foram quantificados de acordo com os critérios de Nugent, Krohn e Hillier¹². Apenas as pontuações de 0 a 3 foram consideradas como ausência de infecções genitais. Amostras endocervicais foram coletadas em UCM (*Universal Collection Medium*, Digene, São Paulo, Brasil), para posterior detecção de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoea*, utilizando o hc2 CT/GC DNA test (Digene, Galtehrsburg, EUA). Além disso, foi colhida uma lâmina para realização de citologia para detecção de HPV (papiloma vírus humano) e alterações celulares neoplásicas.

As amostras de conteúdo vaginal, coletadas em meio de transporte Amies com carvão (CB Products, Corumbataí, Brasil), foram semeadas em duas placas de ágar seletivo De Man-Rogosa-Sharpe (MRS, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) e incubadas a 37 °C por 24 a 48 horas, em atmosfera anaeróbica (Forma Anaerobic System, Thermo Electron Corporation, Waltham, EUA), com 5% de CO₂ (Forma Series II Water Jacketed CO₂ incubator – Thermo Electron Corporation). As colônias isoladas foram previamente identificadas com base nas

características morfológicas (bacilos Gram-positivos) e reação negativa a catalase, e armazenadas a 70 °C negativos, em caldo MRS suplementado com 10% de glicerol.

■ Identificação dos lactobacilos

Para a identificação molecular, o DNA das linhagens isoladas foi extraído e purificado através do kit MasterPure and Ready-Lyse (Epicentre Biotechnologies, Madison, EUA). A identificação da espécie foi realizada por PCR multiplex em duas etapas, de acordo com o método descrito por Song et al.¹³. Um conjunto de iniciadores (primers) foi utilizado para agrupar os lactobacilos. Em função do tamanho do fragmento amplificado, outro conjunto de iniciadores foi empregado para a identificação da espécie em cada um dos quatro grupos de lactobacilos¹³.

As reações foram realizadas em Termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) com volume final de 30 µL, empregando Taq DNA polimerase (Fermentas, Burlington, Canadá).

Os primers específicos utilizados foram desenhados por Song et al.¹³, com base nas sequências dos genes 16S e 23S, além da sequência contida no espaço intragênico 16S-23S. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídio.

Para padronização do método, foram utilizadas 11 linhagens padrão adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, EUA): *L. delbrueckii* (ATCC 10705), *L. acidophilus* (ATCC 4356), *L. crispatus* (ATCC 33820), *L. gasseri* (ATCC 9857), *L. jensenii* (ATCC 25258), *L. paracasei* (ATCC 27092), *L. rhamnosus* (ATCC 53103), *L. fermentum* (ATCC 14932), *L. plantarum* (ATCC 14917), *L. reuteri* (ATCC 53608) e *L. salivarius* (ATCC 29602).

■ Sequenciamento do gene RNAr 16S

Oito linhagens de lactobacilos não puderam ser identificadas através da técnica de PCR Multiplex e foram submetidas ao sequenciamento do gene RNAr 16S. O DNA extraído previamente dos isolados de lactobacilos foi submetido à amplificação de um fragmento de aproximadamente 1.400 bp do gene RNAr 16S, utilizando os primers p27-forward (5'-AGA GTT TGATCM TGG CTC AG -3') e p1401-reverse (5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG -3').

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o ET Terminator™ Mix (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido), utilizando primers internos do gene rRNA 16S, B4 (5'-TAT TAC CGC GGC TGC TGG CA -3') e (5'-TGC CAC CAG CCG CGG TAA TA), conforme descrito anteriormente¹⁴. As reações foram realizadas segundo instruções do fabricante (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido) e a incubação, em termociclador Eppendorf.

Os produtos da reação de sequenciamento foram submetidos à purificação com ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, EUA), conforme instruções do fabricante. A reação de sequenciamento foi precipitada com etanol absoluto, lavada com etanol 70% e ressuspendida em tampão contendo formamida (conforme instruções do fabricante). Foram então submetidas ao sequenciamento em Megabace 1000 System (GE Healthcare).

As sequências obtidas para cada amostra foram alinhadas através do programa Clustal W, gerando uma sequência de aproximadamente 1.100 bp do gene rRNA 16S. As sequências obtidas foram analisadas utilizando o BLAST para identificação da espécie¹⁵. Todos os isolados foram identificados com similaridade mínima de 98% entre a sequência analisada e aquelas existentes no banco de dados.

■ Caracterização dos lactobacilos

Produção de ácido láctico

Os lactobacilos foram semeados em caldo LAPTg (extrato levedura/peptona/triptona/tween80/glicose)¹⁶, pH 6,5 e incubados a 37 °C por 24 horas em anaerobiose. Após o período de incubação, foram medidos no sobrenadante os valores de pH com potenciômetro (Testo AG, Lenzkirch, Alemanha). O ácido láctico produzido foi quantificado utilizando-se o kit D-Lactic Acid (Boehringer, Mannheim, Alemanha) com leitura da absorbância a 340 nm, em espectrofotômetro (Celm, Barueri, Brasil).

Produção H₂O₂

Os lactobacilos foram cultivados a 37 °C em condições anaeróbias por 48 horas, em ágar MRS contendo 0,25 mg/mL de TMB (tetrametilbenzidina, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 0,01 mg/mL de horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich). As colônias de lactobacilos produtores de peróxido apresentam coloração azul quando expostas ao ar e a intensidade desta coloração foi avaliada em cruzes (muito intensa 4+, intensa 3+, moderada 2+, fraca 1+ e ausente 0). Dada a subjetividade desta avaliação, a dosagem semiquantitativa com Meckoquant strip test (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) também foi empregada, após cultivo em caldo MRS.

Produção de bacteriocinas

Os lactobacilos foram cultivados em caldo MRS e a partir destes cultivos foram preparados filtrados dos sobrenadantes. Estes filtrados foram adicionados a orifícios feitos no ágar de placas recém-semeadas com o micro-organismo indicador (*Gardnerella vaginalis* ATCC 14018) para detecção de bacteriocinas, através da formação de halos de inibição do crescimento do micro-organismo indicador nestas placas. Visando descartar a ação de ácidos

provenientes do metabolismo e de H_2O_2 , o procedimento foi repetido com os sobrenadantes neutralizados (ao pH inicial do meio) e o peróxido foi degradado com a utilização de catalase (Sigma Chemical Co., Saint Louis, EUA).

Capacidade de adesão às células do epitélio vaginal

Foi realizada de acordo com metodologia desenvolvida previamente¹⁷. As células do epitélio vaginal foram coletadas em meio de cultivo comercial (Advanced MEM, Gibco, Paisley, Reino Unido), centrifugadas e lavadas repetidamente até a remoção da microbiota original. A concentração desta suspensão celular foi ajustada a 10^5 células/mL. Os lactobacilos provenientes de subcultivos em meio seletivo foram lavados e ressuspensos em Advanced MEM, com concentração ajustada a 10^7 lactobacilos/mL. Volumes iguais das duas suspensões foram misturados e incubados por uma hora a $37^\circ C$, em estufa de CO_2 . Como controle negativo foi feita uma suspensão de células vaginais apenas com Advanced MEM, sem suspensão de lactobacilos. As misturas foram então lavadas e centrifugadas repetidamente até a remoção das bactérias não aderidas. A partir dos pellets lavados, foram preparadas lâminas coradas pelo método de Gram. A leitura foi feita contando-se o número de lactobacilos aderidos a cada célula observada, número de células com lactobacilos aderidos e número total de células observadas. A partir destes dados, foi calculado o índice de adesão (número de bactérias aderidas ou o de células com bactérias aderidas) e a porcentagem de adesão (número de células com bactérias aderidas ou número total de células contadas).

Resultados

A média da idade das 135 mulheres foi de $31,6 \pm 6,1$ anos. O pH vaginal aferido em média foi de $4,2 \pm 0,4$ e o escore de Nugent $1,4 \pm 0,9$ (média \pm desvio padrão). Das 135 amostras coletadas, 11 foram excluídas por infecções (oito positivas para *Chlamydia trachomatis* ou *Neisseria gonorrhoea*, duas para *Candida sp* e uma com os dois tipos de infecção concomitantes). Todas as mulheres incluídas no estudo apresentaram resultado de citologia oncológica dentro dos limites da normalidade. Das amostras efetivamente incluídas, foram isoladas 83 cepas de lactobacilos. Destes, 75 linhagens (90%) foram identificadas pelo método do Multiplex PCR e as oito restantes foram submetidas ao sequenciamento do gene RNAr 16S. Os resultados obtidos por essa técnica permitiram a identificação de 100% das linhagens testadas. Das oito linhagens sequenciadas, sete se alinharam com a espécie *Lactobacillus vaginalis* e uma com a espécie *Lactobacillus mucosae*.

A espécie predominante foi *L. crispatus*, presente em 25 de 83 amostras (30,1%), seguida de *L. jensenii* (26,5%), *L. gasseri* (22,9%) e *L. vaginalis* (8,4%) (Tabela 1). As outras espécies isoladas foram *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. reuteri* e *L. rhamnosus*, com duas cepas cada uma, e *L. mucosae* e *L. salivarius* com uma cepa cada (Tabela 2).

Quanto à capacidade de acidificação, as espécies que apresentaram maior redução de pH em meio de cultura foram *L. jensenii*, com valor médio de 3,65 e *L. gasseri*, com 3,72. Apesar da significativa acidificação do meio de cultura observada, nenhuma das linhagens avaliadas

Tabela 1 - Espécies de lactobacilos mais prevalentes e caracterização quanto à produção de ácido láctico, H_2O_2 e capacidade de adesão às células epiteliais vaginais (índice e percentual de adesão)

Espécie/Caracterização	<i>L. crispatus</i>			<i>L. jensenii</i>			<i>L. gasseri</i>			<i>L. vaginalis</i>		
	n	Média	Desvio padrão	n	Média	Desvio padrão	n	Média	Desvio padrão	n	Média	Desvio padrão
Acidificação meio cultura	25	4,1	0,5	22	3,6	0,8	19	3,7	0,2	7	5,2	0,6
Produção de ácido láctico (mg/mL)	25	0,05	0,04	22	0,05	0,04	19	0,06	0,05	7	0,04	0,04
Produção de H_2O_2	25	1,4	1,04	22	2,5	1,05	19	1,7	1,03	7	0,4	0,7
Índice de adesão	6	2,1	0,9	13	3,6	3,3	10	3,6	2,8	1	1,0	-
Percentual de adesão	6	56,2	14,4	13	53,6	22,2	10	48,2	18,1	1	47,5	-

Tabela 2 - Espécies de lactobacilos menos prevalentes e caracterização quanto à produção de ácido láctico, H_2O_2 e capacidade de adesão às células epiteliais vaginais (índice e percentual de adesão)

Espécie/Caracterização	<i>L. delbrueckii</i>			<i>L. fermentum</i>			<i>L. reuteri</i>			<i>L. rhamnosus</i>			<i>L. mucosae</i>		<i>L. salivarius</i>	
	n	Média	Desvio padrão	n	Média	Desvio padrão	n	Média	Desvio padrão	n	Média	Desvio padrão	n	Média	n	Média
Acidificação meio cultura	2	4,4	0,5	2	5,2	0,09	2	4,9	0,1	2	4,01	0,01	1	5,4	1	4,1
Produção de ácido láctico (mg/mL)	2	0,05	0,05	2	0,06	0,08	2	0,02	0,03	2	0,03	0,00	1	0,05	1	0,04
Produção de H_2O_2	2	0,5	0,7	2	0,0	0,0	2	0,0	0,0	2	1,0	1,4	1	2,0	1	1,0
Índice de adesão	2	2,2	1,3	2	6,8	7,6	1	2,7	-	1	11,1	-	0	-	1	60,8
Percentual de adesão	2	52,5	24,7	2	70,0	24,7	1	70,0	-	1	85,0	-	0	-	1	85,0

apresentou alta produção de ácido láctico. Das 83 cepas de lactobacilos analisadas, apenas 20 não apresentaram produção de H_2O_2 detectável pela técnica de cultivo em ágar MRS com TMB (tetrametilbenzidina, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Destas, 18 foram consideradas boas produtoras (3+), e quatro como muito boas (4+). Neste grupo, notou-se predomínio das espécies *L. jensenii*, com três cepas muito boas e dez boas produtoras, *L. crispatus* com seis cepas boas produtoras, *L. gasseri* com três boas produtoras e uma muito boa.

A análise semiquantitativa da produção de H_2O_2 pelo sistema *Meckoquant strip test* foi menos sensível, com 40 linhagens consideradas negativas para produção de H_2O_2 (dados não apresentados). Quanto à produção de bacteriocinas, em todos os sobrenadantes testados foi observada uma diminuição na concentração de colônias ao redor dos orifícios, ou seja, ocorreu uma redução do crescimento do micro-organismo indicador, mas sem a formação de um halo verdadeiro (dados não apresentados). Dada esta inibição parcial, os sobrenadantes foram tratados e testados novamente, mas nesta etapa não houve formação de halo ou redução de crescimento.

A partir dos resultados de produção de H_2O_2 , foram selecionadas 37 linhagens para o estudo de adesão ao epitélio vaginal. Destas, 12 apresentaram porcentagem de adesão entre 50 e 69% e dez, um índice igual ou maior a 70%. As restantes apresentaram pouca capacidade de aderir às células epiteliais.

Discussão

A espécie *L. crispatus* foi a mais frequente em nosso estudo, presente em quase um terço das amostras, seguida de *L. jensenii* e *L. gasseri*, o que corrobora estudos prévios utilizando técnicas moleculares para identificação de lactobacilos isolados de mulheres aparentemente saudáveis^{18,19}. Estudos mais recentes realizados nos Estados Unidos, Japão e Europa, utilizando técnicas de biologia molecular têm mostrado que além de *L. crispatus*, *L. jensenii* e *L. gasseri* outras espécies bastante frequentes são *L. iners* e *L. vaginalis*²⁰⁻²².

A espécie *L. iners* tem características muito distintas dos outros lactobacilos, não é cultivável em meio MRS e apresenta grande variedade morfológica e tintorial, sendo descrita como bacilos curtos Gram-negativos e tem sido encontrada no ambiente vaginal em estudos que avaliam a microbiota por métodos moleculares, os quais independem de cultivo e isolamento prévio^{21,23}. A capacidade de produção de substâncias inibidoras de patógenos por esta espécie não foi estudada, portanto não se conhece sua influência no equilíbrio da microbiota vaginal. A espécie *L. vaginalis*, no entanto, foi encontrada em 8,4% de nossas amostras.

Os lactobacilos das espécies *L. vaginalis* e *L. mucosae* só foram identificados através do sequenciamento do gene

que codifica o rRNA 16S, pois a técnica de identificação por PCR Multiplex foi desenvolvida inicialmente para lactobacilos intestinais e o conjunto de primers utilizados mostrou-se insuficiente para a identificação de todas as espécies de origem vaginal.

Outras espécies (*L. fermentum*, *L. delbrueckii*, *L. reuteri*, *L. rhammosus* e *L. salivarius*) foram pouco frequentes, provavelmente por se tratar de mulheres saudáveis, sugerindo que as mesmas não tenham as mesmas características competitivas quando comparadas às espécies mais frequentes²⁴.

Do total de amostras estudadas, foram encontradas duas ou mais espécies de lactobacilos em apenas 7,2%, ou seja, a grande maioria das mulheres saudáveis é colonizada por uma única espécie dominante de lactobacilo, o que é consistente com os dados de outros estudos^{24,25}.

Em relação às características consideradas potencialmente benéficas em lactobacilos, foram avaliadas a produção de ácido através da redução de pH do meio de cultura, e através da quantificação de ácido láctico. As espécies de *L. jensenii* e *L. gasseri* estudadas foram as únicas que atingiram valores médios de pH em meio de cultivo, menores do que 4,0 (3,65 e 3,72, respectivamente), enquanto a média de *L. crispatus* foi levemente superior, 4,13, o que confirma que estas espécies são importantes para a acidificação do meio vaginal. Estes dados são compatíveis com os achados de Boskey et al., os quais compararam o pH inicial do meio de cultura e a concentração de bactérias, e observaram que os lactobacilos vaginais param de crescer e acidificar quando atingem o pH na faixa de 3,2 a 4,8, valores estes comparáveis com o pH observado *in vivo*²⁶.

A produção do ácido láctico foi baixa para todas as linhagens avaliadas, comparando-se com dados de literatura que descreveram a variabilidade de tal produção entre 1,5mg/mL a 2.250 mg/mL⁵. Esta discrepância entre os valores de ácido láctico pode ser decorrente da inadequação do método utilizado, pois apesar desta baixa detecção de ácido láctico, várias linhagens mostraram capacidade de acidificar o meio de cultura. Outra possibilidade é a produção de outros ácidos orgânicos, como o ácido acético, já que este pode não ser o único responsável pela redução do pH do meio⁵. Já foi reportado que o ácido láctico e o acético produzidos por bactérias lácticas podem agir sinérgicamente para inibir o crescimento de patógenos²⁷.

Quanto à produção de H_2O_2 , das 83 linhagens de lactobacilos analisadas, apenas 20 não apresentaram produção de H_2O_2 detectável pela técnica de crescimento em ágar MRS com TMB. Contudo, a técnica de detecção de H_2O_2 pelo sistema *Meckoquant strip test* apresentou menor sensibilidade, com 40 linhagens consideradas negativas para produção de H_2O_2 . As melhores produtoras de H_2O_2 foram as espécies *L. jensenii*, *L. crispatus* e *L. gasseri*, resultados que concordam com outros estudos

que mostraram que espécies como *L. gasseri* e outras do grupo do *L. acidophilus* (*L. crispatus* e *L. jensenii*) são caracteristicamente boas produtoras de H_2O_2 ²⁸. Alguns autores acreditam que deve haver relação entre a espécie e a capacidade de produção de H_2O_2 e que não há relação entre a origem da linhagem (proveniente de mulheres com ou sem VB) e a produção de H_2O_2 ²².

A não observação de halos verdadeiros indica a ausência de produção de bacteriocinas pelas cepas testadas. A redução de crescimento observada sem o tratamento dos sobrenadantes, e ausente após tratamento, sugere a ação de H_2O_2 e redução de pH por ácidos, ao invés de bacteriocinas.

Das 37 linhagens selecionadas para avaliação da capacidade de adesão, as espécies *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii* e *L. salivarius* e uma de *L. fermentum* testadas apresentaram porcentagem de adesão maior que 70%; entretanto, estas apresentaram baixa capacidade de produção de H_2O_2 . Das linhagens com porcentagem de adesão igual ou maior que 70%, uma da espécie *L. crispatus*, duas *L. jensenii* e uma *L. gasseri* apresentaram também boa produção de peróxido.

A predominância dos lactobacilos tem sido reconhecida como responsável pela manutenção do equilíbrio do ecossistema vaginal. A perda dos lactobacilos pode predispor a mulher à aquisição de infecções geniturinárias. Por esta razão, o uso de lactobacilos selecionados pode ser efetivo na restauração da microbiota vaginal e na prevenção de infecções. Para isso, é necessário identificar corretamente

e caracterizar as linhagens de lactobacilos com relação à produção de substâncias inibidoras e quanto à capacidade de adesão às células do epitélio vaginal²⁹.

Para preparação de um produto para a reconstituição da microbiota vaginal, estas linhagens com características mais promissoras devem ser estudadas mais profundamente, quanto às suas propriedades biotecnológicas e ausência de infectividade ou efeitos colaterais, a fim de serem testados e aplicados em humanos²⁹.

Apesar de limitações da metodologia escolhida, a respeito da produção de ácido láctico e do isolamento da espécie *L. iners*, foi possível caracterizar e identificar todos os isolados.

Em conclusão, este estudo mostrou que as espécies mais prevalentes em mulheres saudáveis, isoladas em meio de cultura seletivo e identificadas por métodos moleculares, são *L. crispatus* (30,1%), *L. jensenii* (26,5%), *L. gasseri* (22,9%) e *L. vaginalis* (8,4%). Além de mais prevalentes, as espécies *L. crispatus*, *L. jensenii* e *L. gasseri* foram as que atingiram, em média, menores valores de pH (próximos a 4,0) e apresentaram melhor produção de H_2O_2 , características sugeridas como importantes para proteção contra várias infecções, principalmente a VB.

Agradecimentos

À Sirlei Morais pela colaboração nas análises estatísticas.

Referências

- Reddy G, Altaf M, Naveena BJ, Venkateshwar M, Kumar EV. Amyolytic bacterial lactic acid fermentation: a review. *Biotechnol Adv.* 2008;26(1):22-34.
- Dembélé T, Obdržálek V, Votava M. Inhibition of bacterial pathogens by lactobacilli. *Zentralbl Bakteriol.* 1998;288(3): 395-401.
- Darwish A, Elshar EM, Hamadeh SM, Makarem MH. Treatment options for bacterial vaginosis in patients at high risk of preterm labor and premature rupture of membranes. *J Obstet Gynaecol Res.* 2007;33(6):781-7.
- Atashili J, Poole C, Ndumbe PM, Adimora AA, Smith JS. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. *AIDS.* 2008;22(12):1493-501.
- Aroutcheva A, Gariti D, Simon M, Shott S, Faro J, Simoes JA, et al. Defense factors of vaginal lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;185(2):375-9.
- Vitali B, Pugliese C, Biagi E, Candela M, Turroni S, Bellen G, et al. Dynamics of vaginal bacterial communities in women developing bacterial vaginosis, candidiasis, or no infection, analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and real-time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(18):5731-41.
- French JI, McGregor JA. Bacterial vaginosis infections diseases in women. In: Faro S, Soper DE, editors. *Infectious diseases in women.* Philadelphia: WB Saunders; 2001. p. 221-39.
- Eschenbach DA, Davick PR, Williams BL, Klebanoff SJ, Young-Smith K, Critchlow CM, et al. Prevalence of hydrogen peroxide-producing Lactobacillus species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol.* 1989;27(2):251-6.
- Livengood CH 3rd, Soper DE, Sheehan KL, Fenner DE, Martens MG, Nelson AL, et al. Comparison of once-daily and twice-daily dosing of 0,75% metronidazole gel in the treatment of bacterial vaginosis. *Sex Transm Dis.* 1999;26(3):137-42.
- Hillier S, Holmes KK. Sexually transmitted pathogens. In: Holmes KK, Sparling PF, Mardh PA, Lemon SM, Stamm WE, Piot P, editors. *Sexually transmitted diseases.* 3rd ed. Washington, DC: McGraw-Hill; 2001. p. 563-604.

11. Ocana VS, Bru E, De Ruiz Holgado AA, Nader-Macias ME. Surface characteristics of lactobacilli isolated from human vagina. *J Gen Appl Microbiol.* 1999;45(5):203-12.
12. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram strain interpretation. *J Clin Microbiol.* 1991;29(2):297-301.
13. Song Y, Kato N, Liu C, Matsumiya Y, Kato H, Watanabe K. Rapid identification of 11 human intestinal Lactobacillus species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;187(2):167-73.
14. Wilks M, Wiggins R, Whaley A, Hennessy E, Warwick S, Porter H, et al. Identification and H₂O₂ production of vaginal lactobacilli from pregnant women at high risk of preterm birth and relation with outcome. *J Clin Microbiol.* 2004;42(2):713-7.
15. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215(3):403-10.
16. Juárez Tomás MS, Ocaña VS, Wiese B, Nader-Macías ME. Growth and lactic acid production by vaginal Lactobacillus acidophilus CRL 1259, and inhibition of uropathogenic Escherichia coli. *J Med Microbiol.* 2003;52(Pt 12):1117-24.
17. Ocaña VS, Nader-Macías ME. Adhesion ability of lactobacillus to vaginal epithelia. In: Spencer JFT, Spencer ALR, editors. *Public health microbiology: methods and protocols.* Clifton: Humana Press; 2004. p. 441-5.
18. Pavlova SI, Kilic AO, Kilic SS, So JS, Nader-Macias ME, Simoes JA, et al. Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. *J Appl Microbiol.* 2002;92(3):451-9.
19. Kiliç AO, Pavlova SI, Alpaly S, Kiliç SS, Tao L. Comparative study of vaginal Lactobacillus phages isolated from women in the United States and Turkey: prevalence, morphology, host range, and DNA homology. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8(1):31-9.
20. Boyd MA, Antonio MA, Hillier SL. Comparison of API 50 CH strips to whole-chromosomal DNA probes for identification of Lactobacillus species. *J Clin Microbiol.* 2005;43(10):5309-11.
21. De Backer E, Verhelst R, Verstraelen H, Alqumber MA, Burton JP, Tagg JR, et al. Quantitative determination by real-time PCR of four vaginal Lactobacillus species, Gardnerella vaginalis and Atopobium vaginae indicates an inverse relationship between L. gasseri and L. iners. *BMC Microbiol.* 2007;7:115.
22. Song YL, Kato N, Matsumiya Y, Liu CX, Kato H, Watanabe K. Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from Japanese women and newborn infants. *J Clin Microbiol.* 1999;37(9):3062-4.
23. Vázquez A, Jakobsson T, Ahrné S, Forsum U, Molin G. Vaginal lactobacillus flora of healthy Swedish women. *J Clin Microbiol.* 2002;40(8):2746-9.
24. Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR, Forney LJ. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology.* 2004;150(Pt 8):2565-73.
25. Antonio MA, Hawes SE, Hillier SL. The identification of vaginal Lactobacillus species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J Infect Dis.* 1999;180(6):1950-6.
26. Boskey ER, Telsch KM, Whaley KJ, Moench TR, Cone RA. Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. *Infect Immun.* 1999;67(10):5170-5.
27. Adams MR, Hall CJ. Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *Int J Food Sci Technol.* 1988;23(3):287-92.
28. Juárez Tomás MS, Zonenschain D, Morelli L, Nader-Macías ME. Characterisation of potentially probiotic vaginal lactobacilli isolated from Argentinean women. *Br J Biomed Sci.* 2005;62(4):170-4.
29. Kaewsrichan J, Peeyananjarasri K, Kongprasertkit J. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006;48(1):75-83.