

ELIANE MELO BROLAZO

**PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE
LACTOBACILOS VAGINAIS EM MULHERES SAUDÁVEIS
EM IDADE REPRODUTIVA**

Tese de Doutorado

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIS GUILLERMO BAHAMONDES

**Unicamp
2009**

ELIANE MELO BROLAZO

**PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE
LACTOBACILOS VAGINAIS EM MULHERES SAUDÁVEIS
EM IDADE REPRODUTIVA**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Tocoginecologia, área de Ciências Biomédicas

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIS GUILLERMO BAHAMONDES

**Unicamp
2009**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

B787p Brolazo, Eliane Melo
Prevalência e caracterização de espécies de
lactobacilos vaginais em mulheres saudáveis em idade
reprodutiva / Eliane Melo Brolazo. Campinas, SP:
[s.n.], 2009.

Orientador : Luis Guillermo Bahamondes
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Lactobacilos. 2. Identificação. 3. Microbiota
(Medicina). I. Bahamondes, Luis Guillermo. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Prevalence and characterization of lactobacilos vaginais species in healthy women at reproductive age

Keywords: • Lactobacillus
 • Identification
 • Microbiota

Titulação: Doutor em Tocoginecologia
Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Luis Guillermo Bahamondes
Prof. Dr. Rodrigo Paupério Soares Camargo
Profa. Dra. Edna Marina Cappi Maia
Prof. Dr. Paulo César Giraldo
Profa. Dra. Arlete Maria dos Santos Fernandes

Data da defesa: 17-06-2009

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: ELIANE MELO BROLAZO

Orientador: Prof. Dr. LUIS GUILLERMO BAHAMONDES

Membros:

1.

2.

3.

4.

5.

Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 17/06/2009

Dedico este trabalho...

*Ao Prof. Dr. José Antonio Simões,
Um amigo querido com quem iniciei este projeto...*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Luis Guillermo Bahamondes, meu orientador, pelo carinho com que me recebeu e pela ajuda na finalização deste estudo.

Às enfermeiras do CEMICAMP, Creuza Hidalgo Regina, Maria Cecília Monteiro Dantas, Maria Margarete Hidalgo, Marina Vilarroel, Nádia Marchi, Sara Castro e Ximena Arce, pela colaboração na coleta das amostras, sem as quais este estudo não seria realizado.

Às auxiliares de enfermagem Laís, Edite e Eliane pela ajuda no atendimento às voluntárias no ambulatório de Planejamento Familiar.

À Dra. María Elena Fátima Nader e toda equipe do Laboratório de Microbiologia Preventiva do CERELA, María Silvina Juárez Tomás, María Claudia Otero, María Carolina Espeche, Natalia Cecila Maldonado e Esteban Vera Pingitore por me receberem com tanto carinho e atenção e tornarem minha temporada em Tucumán inesquecível.

Ao Prof. Dr. Domingos Silva Leite e à Monique Ribeiro Tiba, por toda colaboração na padronização da identificação dos lactobacilos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Brocchi pela gentileza e disponibilidade com que me recebeu em seu laboratório nas etapas finais deste estudo, e ao Gustavo Bueno Gregoracci pela colaboração no sequenciamento dos lactobacilos.

À Camila Marconi, que ao longo deste trabalho tornou-se uma grande amiga e supercompanheira na realização dos experimentos para identificação dos lactobacilos.

À Adriana Barros, pela ajuda e paciência na preparação do material para qualificação e finalização deste trabalho.

A toda equipe da ASTEC, pela competência e disponibilidade durante a realização deste estudo.

Às mulheres que participaram voluntariamente deste estudo, sem as quais nada disso seria possível.

Em Especial:

Aos meus pais, Roberto e Regina, por estarem sempre torcendo pelo meu sucesso.

As minhas queridas amigas Karla e Kátia, que ao comemorarem um aniversário me abriram um novo caminho...

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	viii
Resumo	ix
Summary	xi
1. Introdução	13
2. Objetivos	21
2.1. Objetivo Geral.....	21
2.2. Objetivos Específicos	21
3. Publicações	22
3.1. Artigo 1	23
3.2. Artigo 2	40
4. Discussão.....	64
5. Conclusões.....	67
6. Referências Bibliográficas.....	68
7. Anexos	72
7.1. Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	72
7.2. Anexo 2 – Ficha de Admissão.....	74

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

CDC Centro de Controle e Prevenção de Doenças norte-americano

HIV Vírus da imunodeficiência adquirida

H₂O₂ Peróxido de hidrogênio

íons H⁺ Íons hidrogênio

PCR Reação em cadeia da polimerase

pH Potencial hidrogeniônico

VB Vaginose bacteriana

Resumo

A microflora vaginal de mulheres saudáveis em idade reprodutiva é composta por uma variedade de bactérias aeróbias e anaeróbias, mas as espécies dominantes são os lactobacilos (bacilos de Döderlein), que exercem significativa influência sobre a microbiota local. Além de restringir o crescimento de patógenos competindo pelo espaço e nutrientes, os lactobacilos produzem substâncias antimicrobianas como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e bacteriocinas. Esta atividade antagonista é importante na proteção contra várias infecções, principalmente a vaginose bacteriana (VB). **Objetivos:** Identificar as espécies de lactobacilos isolados do conteúdo vaginal de mulheres saudáveis e assintomáticas e determinar as espécies mais prevalentes e caracterizá-las quanto à produção de ácido láctico, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e sua capacidade de adesão às células do epitélio vaginal. **Métodos:** Foram isoladas 83 linhagens de lactobacilos de amostras de conteúdo vaginal de 135 mulheres, sem queixa de corrimento e com diagnóstico laboratorial negativo para infecções vaginais, acompanhadas no ambulatório de Planejamento Familiar da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP. As linhagens isoladas foram identificadas por PCR multiplex e, quando necessário, submetidas ao sequenciamento do gene

RNAr 16S. Foram então avaliadas quanto à produção de ácido láctico, de H_2O_2 , bacteriocinas e a capacidade de adesão às células epiteliais.

Resultados: A espécie predominante foi *L. crispatus* presente em 30,1% das mulheres, seguida de *L. jensenii* (26,5%), *L. gasseri* (22,9%) e *L. vaginalis* (8,4%). As outras espécies isoladas foram *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. reuteri* e *L. rhamnosus*, com duas linhagens cada uma, e *L. mucosae* e *L. salivarius* com uma cepa cada. Das 83 linhagens de lactobacilos analisadas, apenas 20 não apresentaram produção de H_2O_2 detectável pela técnica de cultivo em ágar MRS com TMB. Foram selecionadas 37 linhagens para teste de adesão às células epiteliais. Destas, 12 tiveram adesão entre 50% e 69% e 10 igual ou maior a 70%. As linhagens restantes apresentaram pouca capacidade de aderir às células epiteliais. Nenhuma das linhagens testadas 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*. Dentre as linhagens analisadas, além de mais frequentes, estas também foram as que atingiram menores valores de pH em meio de cultura e apresentaram melhor produção de H_2O_2 .

Palavras-chave: lactobacilos vaginais, multiplex PCR, ecossistema vaginal, identificação molecular, mulheres saudáveis.

Summary

The vaginal microflora of healthy women is composed of a large variety of aerobic and anaerobic bacteria. The dominant species is a group of lactobacilli (Doderlein's bacillus), which has a significant effect on vaginal microbiota, curtailing the growth of pathogens competing for space and nutrients. The lactobacilli specie produces various antimicrobial substances that include organic acids, hydrogen peroxide (H_2O_2) and bacteriocins. **Objectives:** Identify the prevalence of the different species of lactobacilli isolated from the vagina of healthy asymptomatic women, determine the most prevalent species and characterize them regarding the production of lactic acid, hydrogen peroxide (H_2O_2) and their capacity to adhere to vaginal epithelial cells. **Methods:** Eighty-three strains of lactobacilli were isolated from the vagina of 135 women, with no complaints of vaginal discharge and negative laboratory diagnosis for vaginal infection, who were being followed up at the Family Planning clinic of the Medical school, Unicamp. The isolates were identified using multiplex polymerase chain reaction (PCR) and, when necessary, *16S rRNA* gene sequencing. They were then evaluated with regards to the production of lactic acid, H_2O_2 , bacteriocins, and their capacity to adhere to epithelial cells.

Results: The predominant species found were *L. crispatus* (in 30.1% of the women), followed by *L. jensenii* (26.5%), *L. gasseri* (22.9%) and *L. vaginalis* (8.4%). The other species isolated were *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. reuteri* and *L. rhamnosus* (two strains) and *L. mucosae* and *L. salivarius* (one strain). Only 20 out of 83 lactobacilli analyzed using the plate technique (in MRS agar with TMB) were found to be non-producers of H₂O₂. Thirty-seven lineages were selected and tested for their capacity to adhere to epithelial cells. Of these, 12 had an adhesion between 50% and 69% and 10 equal or superior to 70%. The remainder had little capacity to adhere to epithelial cells. None of the strains tested produced bacteriocins. **Conclusions:** *L. crispatus*, *L. jensenii* and *L. gasseri* were the most prevalent species isolated in selective culture media and identified through molecular techniques. Besides their frequencies, they also presented best H₂O₂ production and lowest pH in culture media.

Key-words: vaginal lactobacilli, multiplex PCR, vaginal ecosystem, molecular identification, healthy women.

1. Introdução

Os lactobacilos, também conhecidos como bacilos de Döderlein são dominantes na microflora vaginal de mulheres saudáveis e exercem significativa influência sobre a microbiota local, composta por grande variedade de bactérias aeróbias e anaeróbias (1).

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, que inibe o crescimento de outras espécies bacterianas, principalmente patogênicas e atuando como principal mecanismo de defesa local (2,3). Além de restringir o crescimento de patógenos competindo pelo espaço e nutrientes (4,5), os lactobacilos produzem substâncias que inibem o crescimento microbiano como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e bacteriocinas (6).

Esta atividade antagonista dos lactobacilos vaginais é importante na proteção contra várias infecções, principalmente a vaginose bacteriana (VB), a vulvovaginite mais comum nas mulheres em idade reprodutiva. Em mulheres

com VB, observa-se a redução ou a ausência de lactobacilos vaginais, aumento da concentração de *Gardnerella vaginalis* e de microrganismos anaeróbios associados a ela, como *Mobiluncus* sp, *Prevotella* sp e *Peptostreptococcus* sp. Também ocorrem alterações bioquímicas no fluido vaginal, que incluem a elevação do pH, aumento da concentração de diaminas e poliaminas, além da produção de enzimas que atuam como fatores de virulência como mucinases, collagenases e proteases inespecíficas. Estas substâncias servem como substrato para o crescimento dos microrganismos associados à *G. vaginalis*, promovem a efetiva aderência das bactérias às células epiteliais e acabam facilitando a passagem dos microrganismos e seus produtos até o trato reprodutivo superior, além de dificultar a ação do sistema de defesa do hospedeiro (7).

A VB provoca corrimento vaginal com mau cheiro, podendo desencadear problemas mais sérios, como parto prematuro e aumento do risco de contrair e transmitir o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (8,9).

O tratamento com metronidazol, via oral ou intravaginal, recomendado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças norte-americano (10) e também pelo Ministério da Saúde, é efetivo na maioria dos casos, pois a *G. vaginalis* e os microrganismos anaeróbios associados são sensíveis à droga utilizada. A taxa de cura de 7 a 10 dias após o tratamento está ao redor de 80%. Estudos demonstram que 30% a 40% das mulheres tratadas com sucesso com metronidazol via oral apresentam episódios recorrentes de VB em um período de três meses após o tratamento (7).

Não se sabe o porquê da recidiva da VB; entretanto acredita-se que a mesma ocorra pela não reconstituição da microbiota vaginal com predominância de lactobacilos produtores de ácidos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, que atuam como inibidores do crescimento da *Gardnerella vaginalis* e outros patógenos (3,11).

A produção de ácidos orgânicos pelos lactobacilos mantém um pH menor ou igual a 4,5, criando um ambiente inóspito para os patógenos. O pH ácido, abaixo de 4,5, não favorece o crescimento da *G. vaginalis*, que tem como faixa ótima de crescimento pHs entre 6,0-6,5, enquanto os outros anaeróbios associados crescem em pHs acima de 5,5 (12). Além disto, a fixação dos lactobacilos no epitélio vaginal é favorecida em pHs entre 3,8 e 4,2, enquanto a *G. vaginalis* tem poucas condições de crescer e se fixar às células do epitélio em pHs abaixo de 4,5 (7).

A inibição de crescimento de espécies bacterianas pela presença de H_2O_2 é um mecanismo de antagonismo bem conhecido e talvez um dos mais importantes. As bactérias lácticas, entre elas os lactobacilos, não utilizam o sistema do citocromo para oxidação dos carboidratos, portanto o produto final da redução do oxigênio não é a água. Este grupo utiliza flavoproteínas, que reduzem o oxigênio a H_2O_2 . Este peróxido, na ausência de uma enzima que o degrade, acumula-se, e o excesso pode inibir ou matar outros microrganismos, principalmente os grupos com carência ou baixa produção de peroxidases, como os anaeróbios. Por isso, a ausência de lactobacilos produtores de H_2O_2

permite o crescimento dos microrganismos catalase-negativos, como os encontrados em altas concentrações na VB (13).

As bacteriocinas são substâncias de natureza protéica, sintetizadas por bactérias e que exercem ação bactericida sobre outras bactérias estritamente relacionadas com a espécie produtora. Quando estas proteínas têm um espectro de ação mais amplo, atuando contra uma maior variedade de microrganismos, como bactérias Gram positivas, Gram negativas e até contra alguns fungos, são denominadas bacteriocinas-*like*. O mecanismo de ação destas proteínas ainda não está completamente esclarecido, mas existem evidências de que as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas atuam sobre a membrana celular dos microrganismos susceptíveis, promovendo orifícios na membrana celular, extravasamento de íons e conseqüentemente morte celular (11). No caso das bacteriocinas produzidas por lactobacilos (lactocinas), sabe-se que este efeito bactericida é influenciado por concentração de íons H^+ (presentes em pH ácido). Quando o pH vaginal aumenta, as lactocinas perdem efetividade. O mesmo ocorre com a atividade da H_2O_2 que depende do pH ácido, pois com a elevação do pH o peróxido é degradado. (3).

Como as recidivas da VB são comuns e acredita-se que a reconstituição da microflora vaginal normal não seja favorecida, tem sido tentado recolonizar a vagina com lactobacilos exógenos, todavia ainda sem sucesso. Inicialmente, foram testados lactobacilos provenientes de iogurte e outros produtos alimentícios, mas estas linhagens não conseguiram se estabelecer no ambiente vaginal e restaurar a microflora local. O principal motivo teria sido a falha desses

lactobacilos em aderir ao epitélio vaginal. Diversos estudos têm sido desenvolvidos utilizando linhagens de origem vaginal para a recolonização do epitélio. Para isso, é necessário selecionar e identificar as melhores linhagens, com propriedades adequadas, que inclusive podem variar de acordo com as diferentes populações (14,15).

Para a reconstituição da microbiota intestinal já existem diversos produtos probióticos, elaborados a partir da seleção de linhagens de bactérias lácticas, produtoras de bacteriocinas ou outros fatores de proteção. Para a elaboração de produtos probióticos vaginais são necessários isolamento, identificação taxonômica e seleção de características importantes, como produção peróxido de hidrogênio e capacidade de aderir às células do epitélio vaginal (15).

Historicamente, a espécie mais comum de lactobacilo isolado no ambiente vaginal humano foi *L. acidophilus*, o que inspirou a criação de diversos produtos como pílulas e tabletes para a reconstituição da flora e até o uso de tratamentos caseiros contra alterações vaginais utilizando iogurte. Infelizmente, estes tratamentos não se mostraram efetivos, provavelmente porque, além de existirem diferenças significativas entre as linhagens isoladas de alimentos e as capazes de colonizar o epitélio da vagina, os métodos de taxonomia utilizados ainda eram insuficientes para determinar as espécies de origem vaginal (16).

Atualmente sabe-se que a determinação da espécie dos lactobacilos baseados no perfil fermentativo, ou seja, no fenótipo, é insuficiente para definir a espécie (17). Talvez por isto, antes do desenvolvimento de técnicas moleculares de

identificação, observava-se uma disparidade entre as espécies de lactobacilos predominantes isolados em diferentes locais:

Em estudo realizado no Canadá, a partir de amostras de secreção vaginal de 88 mulheres em idade reprodutiva, saudáveis e sexualmente ativas, foram isoladas 68 linhagens de lactobacilos e identificadas pelos métodos tradicionais (perfil bioquímico). A espécie mais frequente foi *L. jensenii*, seguida de *L. acidophilus* e *L. casei*. Também foram isoladas espécies de *L. gasseri*, *L. plantarum* e *L. brevis* (18). Enquanto que na Argentina, a partir do material vaginal de 200 mulheres com idade entre 19 e 45 anos, foram isolados 134 lactobacilos, identificados pelo estudo do perfil bioquímico (sistema Api). A maioria dos isolados foi identificada como obrigatoriamente homofermentativos (56%), com as espécies *L. delbrueckii* e *L. acidophilus* como mais frequentes. Do grupo dos heterofermentativos facultativos (24% do total), as espécies dominantes foram o *L. paracasei* e *L. agilis*. E entre os heterofermentativos obrigatórios (20%), a espécie *L. brevis* foi predominante. (15).

O uso de análises genéticas provocou um avanço na taxonomia dos lactobacilos. A partir de estudos baseados na homologia do DNA foi demonstrado que o grupo de lactobacilos anteriormente classificado como *L. acidophilus* é bastante heterogêneo, sendo subdividido em seis diferentes espécies que não podem ser distinguidas bioquimicamente: *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri* e *L. jensenii* (19). Estudos posteriores realizados com técnicas moleculares de identificação revelaram que *L. crispatus*, *L. gasseri* e *L. jensenii* são as espécies mais comumente encontradas na vagina humana (20).

A utilização das técnicas moleculares para identificação dos lactobacilos permitiu a maior confiança e reprodutibilidade na classificação das espécies isoladas, e a partir daí observou-se que as espécies predominantes em mulheres de diversas partes do mundo podem ser as mesmas, mas que existem variações nas características destas linhagens, ou seja, linhagens diferentes da mesma espécie podem apresentar variações que as tornam mais ou menos efetivas na proteção contra agentes infecciosos (17).

Atualmente existem diversos métodos que utilizam ferramentas de biologia molecular para identificar espécies bacterianas. Pode-se utilizar *randomly amplified polymorphic DNA* (RAPD) (19), *amplified ribosomal DNA restriction analyses* (ARDRA), ribotipagem (21) e sequenciamento do gene *RNAr 16S* (22) ou ainda a amplificação de determinadas regiões do DNA bacteriano por PCR multiplex (23).

Para estudos epidemiológicos e a possível utilização de lactobacilos vaginais como probióticos, é imprescindível a correta identificação taxonômica das espécies (24).

A caracterização e seleção de linhagens de lactobacilos para recolonização vaginal devem considerar como importantes a atividade inibitória *in vitro* contra espécies isoladas de mulheres com VB, produção de ácido em meio líquido e produção de H₂O₂ e bacteriocinas, além de capacidade de adesão em células epiteliais vaginais (25).

Estas propriedades permitem selecionar um grupo de linhagens para potencial aplicação biotecnológica, ou seja, com características de interesse para elaboração de um produto para reconstituição da microbiota vaginal. Com isso, talvez seja possível evitar a reinstalação da vaginose bacteriana, reduzindo o uso de antibióticos ou mesmo como tratamento coadjuvante após a antibioticoterapia tradicional.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Determinar a prevalência e as características fenotípicas e genotípicas das diferentes espécies de lactobacilos isolados do conteúdo vaginal de mulheres em idade reprodutiva e sem vulvovaginites.

2.2. Objetivos Específicos

- Isolar e identificar as espécies dos lactobacilos vaginais de mulheres sem vulvovaginites.
- Verificar a capacidade de acidificação do meio de cultivo e de produção de ácido láctico dos lactobacilos isolados.
- Quantificar a produção de peróxido de hidrogênio dos lactobacilos isolados.
- Avaliar a capacidade de produção de bacteriocinas dos lactobacilos isolados.
- Avaliar a capacidade de adesão dos lactobacilos às células do epitélio vaginal.

3. Publicações

Artigo 1 - **Correlation between API 50 CH and Multiplex polymerase chain reaction for the identification of vaginal lactobacilli in Campinas, Brazil**

E. Brolazo¹, D. Silva-Leite², M. Ribeiro-Tiba², M. Villarroel¹, C. Marconi¹, J. A. Simões¹

Submetido à publicação no Journal of Microbiological Methods em 13 de fevereiro de 2009.

Artigo 2 - **Prevalência e caracterização de espécies de Lactobacilos vaginais em mulheres em idade reprodutiva sem vulvovaginites**

Eliane Melo Brolazo, José Antonio Simões, Maria Elena Fátima Nader, Maria Silvina Juárez Tomás, Gustavo Bueno Gregoracci, Camila Marconi.

Submetido à publicação na Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia em 07 de abril de 2009.

Aceito para publicação em 28 de abril de 2009.

3.1. Artigo 1

Correlation between API 50 CH and Multiplex polymerase chain reaction for the identification of vaginal lactobacilli in Campinas, Brazil

Assunto: Editor handles MIMET-D-09-00100

De: s.jongbloed@erasmusmc.nl

Data: Sex, Fevereiro 13, 2009 5:59 am

Para: elianeb@unicamp.br

Prioridade: Normal

**Filtros de
Mensagem:
Opções:**

Ms. Ref. No.: MIMET-D-09-00100

Title: Correlation between API 50 CH and Multiplex polymerase chain reaction for the identification of vaginal lactobacilli in Campinas, Brazil
Journal of Microbiological Methods

Dear Ms Brolazo,

Your submission entitled "Correlation between API 50 CH and Multiplex polymerase chain reaction for the identification of vaginal lactobacilli in Campinas, Brazil" will be handled by Editor Alex van Belkum.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/mimet/>.

Your username is: elianeb

Your password is: brolazo

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Journal of Microbiological Methods

Correlation between API 50 CH and Multiplex polymerase chain reaction for the identification of vaginal lactobacilli in Campinas, Brazil

E. Brolazo¹, D. Silva-Leite², M. Ribeiro-Tiba², M. Villarroel¹, C. Marconi¹, J. A. Simões¹

1 Department of Obstetrics and Gynaecology and Women Hospital, School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil.

2 Department of Microbiology and Immunology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Sao Paulo, Brazil.

Running headline: PCR for vaginal lactobacilli identification

***Corresponding author:**

Eliane Brolazo, MSc.

Caixa Postal 6181

13084-971, Campinas, SP, Brazil.

Telephone: +55-19-3289-2856 / Fax: +55-19-3289-2440

E-mail: elianeb@unicamp.br

SUMMARY

Aims: To compare two techniques to identify species of vaginal lactobacilli, one based on their biochemical profile, the other using molecular biology. **Methods:** A carbohydrate fermentation test (API 50 CH) was compared with multiplex polymerase chain reaction (PCR) for the identification of species of vaginal lactobacilli from 135 healthy women. The kappa index was used to evaluate agreement between the methods. **Results:** Using the molecular technique, *L. crispatus* (32.6%), *L. jensenii* (25%) and *L. gasseri* (20.6%) were the most frequent species. However, using the biochemical technique, the most frequent were: *L. acidophilus* (34.8%), *L. crispatus* (27.2%) and *L. fermentum* (13%). Although *L. acidophilus* was the species most frequently identified by its biochemical profile, no cases were found by PCR. Agreement between the methods was low for all the most common species. Although *L. crispatus* was identified in similar numbers using the two methods (32.6% and 27.2%), agreement was also relatively low (kappa = 0.52). **Conclusions:** Our results confirmed the limits of the biochemical methods and the applicability of a previously published method (Multiplex PCR) for the identification of lactobacilli in the vaginal tract, focusing on further necessary improvement of this latter, targeting to *L. vaginalis* and *L. iners*.

Key words: carbohydrate fermentation test; multiplex PCR; identification; vaginal lactobacilli; healthy women; vaginal ecosystem

INTRODUCTION

The vaginal microflora of healthy women is composed of a large variety of aerobic and anaerobic bacteria; however, the dominant species is a group of lactobacilli also known as Doderlein's bacillus, which has a significant effect on vaginal microbiota (Wilks *et al.*, 2004). As well as curtailing the growth of pathogens competing for space and nutrients (Chan *et al.*, 1985; Velraeds *et al.*, 1996), lactobacilli produce various antimicrobial substances that include organic acids, hydrogen peroxide (H₂O₂) and bacteriocins (Kaewsrichan *et al.*, 2006). Organic acid production by lactobacilli maintains vaginal pH at ≤ 4.5 , creating an inhospitable environment for pathogens. In addition to these acids, the combination of hydrogen peroxide (H₂O₂) and bacteriocins suppresses the endogenous pathogenic flora and maintains the equilibrium of the vagina (Dembele, Obdrzalek and Votava, 1998).

There are inherent differences among the various species of vaginal lactobacilli with respect to their ability to confer protection and some species are known to be predominant in healthy women, presumably those that are most capable of inhibiting pathogenic bacteria. For epidemiological studies and to enable the possible use of vaginal lactobacilli as probiotics, the correct taxonomic identification of the species is crucial (Boyd, *et al.*, 2005).

Taxonomic identification using kits such as the API 50 CH (bioMerieux, Craponne France), based on phenotypical characteristics (carbohydrate fermentation), is still widely used. The most common species of lactobacilli identified in the vagina using this method is *L. acidophilus* (Boskey *et al.*, 1999). However, different species may be identified as the same species what explains

the variation in the results of epidemiological studies in which identification of lactobacilli was carried out using this methodology (Vasquez *et al.*, 2002). Currently, definition of the species of lactobacillus based on the fermentative profile (phenotype), albeit practical, is known to be an inaccurate method of identification (Pavlova *et al.*, 2002).

Therefore, the use of genetic analyses represented an advance in the taxonomy of lactobacilli. Studies based on the DNA homology of lactobacilli concluded that the species previously classified according to its phenotype as *L. acidophilus* in fact consists of six different groups that cannot be differentiated biochemically. These groups were then genetically classified into six different species: *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri* and *L. jensenii* (Pavlova *et al.*, 2002). Later studies carried out using molecular biology revealed *L. crispatus*, *L. gasseri* and *L. jensenii* to be the most commonly found species in the human vagina (Song *et al.*, 1999).

Although identification based on DNA homology increased available knowledge on the taxonomic relationships between the species of lactobacilli, identification of strains of vaginal origin using this method is extremely laborious. Therefore, faster and more easily reproducible methods need to be developed to genetically determine the distribution of species of human vaginal lactobacilli (Song *et al.*, 2000).

Various methods use molecular biology tools to identify species of bacteria, including randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) (Vasquez *et al.*, 2002), amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), ribotyping and subsequent comparison with the ribosomal database project (RDP) (Maidak *et al.*, 2001), and sequencing and comparison with GenBank databases

(www.ncbi.nlm.nih.gov) (Zhou *et al.*, 2004) or even the amplification of certain regions of bacterial DNA using multiplex PCR with primers that produce fragments of DNA of different sizes for each species (Song *et al.*, 2000).

The technique of multiplex PCR uses primers whose design is based on the specific sequences of bacterial DNA that codify the regions of 16S and 23S ribosomal RNA, which are exclusive to each species and have been used successfully in the identification of intestinal lactobacilli (Song *et al.*, 2000). Then, the objective of the study was to compare the identification of lactobacilli isolated from vaginal samples of healthy women using two different methods, one based on the biochemical profile obtained with the API CH50 carbohydrate fermentation test and the other based on the multiplex PCR technique developed in 2000 by Song *et al* (2000).

MATERIAL AND METHODS

The study was conducted at the Department of Obstetrics and Gynaecology and Women Hospital, School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil. We selected and included in the study 135 women at reproductive age with gynaecologic diseases without complaints of vaginal discharge. The study was approved by the local IRB, approval letter #202/2005 and all women signed an inform consent prior to enter in the study. During gynaecological examination, vaginal samples were collected for the isolation of lactobacilli and for Gram-stained vaginal smears for confirmation of the absence of vaginal infections. In the Gram-stained smears, bacterial morphotypes were quantified in accordance with Nugent's criteria (Nugent,

Krohn and Hillier, 1991). Only women with scores from 0 to 3 were considered normal and included in the study.

The samples were collected in Amies charcoal transport medium and were seeded into two plates of selective medium (MRS Agar - Oxoid, Basingstoke, UK) and incubated at 37°C for 24-48 hours in an anaerobic atmosphere (Forma Anaerobic System, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA) and in 5% CO₂ (Electron Series II Water-Jacketed CO₂ incubator, Thermo Electron Corporation). The isolated colonies were preliminarily identified based on their morphological and staining characteristics (Gram-positive bacilli) and their catalase reaction (negative), and stored at -70°C in MRS broth supplemented with glycerol until being submitted to the carbohydrate fermentation test using the API 50 CH carbohydrate fermentation strips (bioMérieux, Craponne, France). The results were analyzed according to the biochemical profiles registered in the APIweb® database (bioMérieux).

For molecular identification, the DNA of isolated strains was extracted and purified using the MasterPure gram-positive DNA purification kit and Ready-Lyse lysozyme solution (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA). Identification of the species was performed by multiplex polymerase chain reaction (PCR) in two stages in accordance with the method described by Song *et al.* (2000). A set of primers was used to group the lactobacilli. In view of the size of the amplified fragment, another set of primers, was used to identify the species in each one of the four groups. The target species of the Multiplex PCR were: *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. reuteri* and *L. salivarius*.

The reactions were carried out in a Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) with a final volume of 30µl composed of 1.5 U Taq DNA polymerase, 3 µl of reaction buffer, 2.4 µl of MgCl₂ (25mM), 0.24 µl of dCTP, dATP, dGTP and dTTP 25nM (Fermentas, Ontario, Canada), 1 µl of each primer (30 ng/ µl) of the respective groups and 2 µl of DNA extracted as described.

The specific primers were designed based on the DNA sequences that codify the intergenic spacer region between 16S and 23S ribosomal RNA. The amplification reactions were modified from the original publication as follows: reactions of 30 cycles that consisted of 94°C for 1 minute for denaturation; annealing at 60°C for 1 minute for multiplex PCR-G, 56°C for the others; followed by 1 minute at 72°C for extension. At the end of 30 cycles, 5 minutes at 72°C for final extension. The amplicons were analyzed by electrophoresis in 2.5% ethidium bromidestained agarose gel.

To standardise the method, 11 standard strains acquired from the American Type Culture Collection (ATCC) were used: *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 5 53608) and *L. salivarius* (ATCC 29602).

To statistical analisys the kappa index was used to assess the comparison between the two methods and agreements were classified as follows: excellent (1.00- 0.80), good (0.79-0.60), moderate (0.59-0.40), fair (0.39-0.20), poor (0.19- 0.00) or in total disagreement (<0.0) (Siegel and Castellan, 1988).

RESULTS

Ninety-two strains of lactobacilli were isolated from the 135 vaginal samples. The results according to Multiplex PCR and API are shown in Table 1. As identified by Multiplex PCR, *L. crispatus* (32.6%) was the most common species of lactobacilli found in the vagina of healthy women, followed by *L. jensenii* (25%) and *L. gasseri* (20.6%). On the aggregate, according to the biochemical profiles obtained with the API test, the most commonly found species was *L. acidophilus* (34.8%), followed by *L. crispatus* (27.2%) and *L. fermentum* (13%).

Albeit the most frequently species identified by biochemical profile (API) is *L. acidophilus*, we did not identified any case by Multiplex PCR. Although *L. gasseri* and *L. jensenii* were frequently identified by Multiplex PCR, no strains of these species were found using the biochemical method.

The kappa index was low for the majority of species evaluated (Table 2). Although the frequency of identification of *L. crispatus* was similar with both methods (32.6% with PCR and 27.2% with API), the agreement rate was low (kappa = 0.52). Agreement between API and Multiplex PCR for the identification of *L. salivarius* was 100% for the only case of this species of lactobacilli identified among the 92 species isolated in this study.

The 11 ATCC strains of lactobacilli that were used as standard for the Multiplex PCR were also assessed by the API test and in four cases their identification using this method differed from the original sample. According to the biochemical profile, *L. jensenii* (ATCC-252580) and *L. gasseri* (ATCC 9857) were identified as *L. acidophilus* 1, and *L. reuteri* (ATCC 53608) as *L. fermentum*, while identification of *L. rhamnosus* (ATCC 53103) was found to be inconclusive.

DISCUSSION

Agreement between multiplex PCR and API was poor for the majority of species. Agreement was 100% only in the case of *L. salivarius*, of which only one single strain was found among all the species evaluated, while for *L. crispatus* agreement was 81.5%. According to the biochemical profiles obtained using the API test applied to the APIwebR system, the majority of lactobacilli isolated from the vagina were identified as *L. acidophilus* (32.6%), a species that was not found when Multiplex PCR testing was used for identification. The group of lactobacilli previously classified as *L. acidophilus* was studied genetically and reclassified as six other species of lactobacilli, among them *L. crispatus*, *L. gasseri*, and *L. jensenii*, species frequently isolated in the vagina of healthy women (Song *et al.*, 1999). According to PCR, *L. crispatus* was the most frequently found species in this study sample followed by *L. jensenii* and *L. gasseri*. These findings were in agreement to other studies in which molecular techniques were used to identify lactobacilli isolated from healthy women (Kilic *et al.*, 2001; Pavlova *et al.*, 2002). Neither *L. jensenii* nor *L. gasseri*, which were the second and third most frequently found species in this study, were identified by API, because their biochemical profiles do not exist in the database of the APIwebR system (Boyd, Antonio and Hillier, 2005). Other species (*L. fermentum*, *L. delbrueckii*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* and *L. salivarius*) are rarely found in the vagina of healthy women, suggesting that they have fewer competitive characteristics compared to the most frequent species.

Only two species were found in similar frequencies by the two identification methods. One was *L. crispatus* with a frequency of 32.6% according to Multiplex PCR and 27.2% according to API. Nevertheless, agreement was moderate, since only 19 strains were identified concomitantly by both methods as *L. crispatus*. *L. salivarius* was the only strain that had agreement that was considered excellent ($\kappa=1.00$); however, this result referred to the only strain of this species isolated in this study.

Even the reference species used for the standardization of Multiplex PCR were incorrectly identified by the biochemical method. *L. jensenii* and *L. gasseri* were identified biochemically as *L. acidophilus*, which was in fact to be expected, since the biochemical profiles of these two species are not sufficiently different from the profile of *L. acidophilus* and are not even listed as identifiable species in this system. However, *L. reuteri* was identified as *L. fermentum* and identification of *L. rhamnosus* by APIwebR was inconclusive.

Other studies using molecular biology techniques have reported that, in addition to *L. crispatus*, *L. jensenii*, and *L. gasseri*, other species frequently found are *L. iners* and *L. vaginalis* (Boyd, Antonio and Hillier, 2005). The *L. iners* species was described by Falsen and co-workers (Falsen *et al.*, 1999) as being a Gram-positive, facultative anaerobic rod-shaped bacterium.

However, it has different characteristics from those of the other lactobacilli: cannot be cultivated in MRS medium and its morphological and staining characteristics vary widely. Moreover, the species was described as consisting of a short and relatively Gram-negative bacillus (De Backer *et al.*, 2007). Since Nugent's criteria was applied for the inclusion of women in the present study, the

possible presence of women with a predomination of *L. iners* may have been interpreted instead as indicative of the absence of lactobacilli and may have excluded these women from the study. In addition, MRS medium was used for the cultivation and isolation of the lactobacilli and this medium would not have permitted the growth of *L. iners* that may have been present in our samples.

Among the 12% of strains unidentified by Multiplex PCR, there may be a predominant species (probably *L. vaginalis*) that was not identified because there is no specific group for this species in the set of primers used in this study, which was based on methodology developed to identify species of intestinal lactobacilli. Based on these results, we intend to sequence these strains of *Lactobacillus* sp in order to identify them and use the resulting data to design specific primers for inclusion in the Multiplex PCR identification technique for vaginal lactobacilli.

In conclusion, our results confirms that the use of biochemical methods does not appear to be appropriate for the identification and study of vaginal lactobacilli, since the failure rate with this method was high compared to molecular biology techniques. In addition, our results also confirmed the applicability of Multiplex PCR for the identification of lactobacilli in the vagina, focusing on further necessary improvement of that method, targeting to *L. vaginalis* and *L. iners*.

Acknowledgments

This project was partially funded by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), award # 05/52649-4. The authors gratefully acknowledge Sirlei Moraes for collaborating in the statistical analysis.

REFERENCES

Boskey, E.R., Telsch, K.M., Whaley, K.J., Moench, T.R. and R. A. Cone (1999) Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. *Infect. Immun.* 67, 5170-5175.

Boyd, M.A., Antonio, M.A. and S. L. Hillier (2005) Comparison of 5 API 50 CH strips to wholechromosomal DNA probes for identification of *Lactobacillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5309-5311.

Chan, R.C., Reid, G., Irvin, R.T., Bruce A.W. and Costerton J. W. (1985) Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragments. *Infect Immun.* 47, 84-89.

De Backer, E., Verhelst, R. Verstraelen, H., Alqumber, M.A., Burton J.P., Tagg, J.R., Temmerman, M. and Vaneechoutte M. (2007). 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.* 7, 115.

Dembélé, T., Obdrzalek, V. and M. Votava. (1998) Inhibition of bacterial pathogens by *Lactobacilli*. *Zentralbl. Bakteriologie* 288, 395-401.

Falsen E., Pascual C., Sjoden B., Ohlen M. and Collins M. D. (1999) Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 217-221.

- Kaewsrichan, J., Peeyananjarassri, K. and Kongprasertkit J. (2006) Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 48, 75-83.
- Kilic, A.O., Pavlova, S.I., Alpay, S., Kilic, S.S. and Tao L. (2001) 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.* 8, 31-39.
- Maidak, B., Cole, J.R., Lilburn, T.G., Parker, C.T. Jr., Saxman, P.R., Farris, R.J., Garrity, G.M., Olsen, G.J., Schmidt, T.M. and Tiedje J.M. (2001) The RDP-II (Ribosomal Database Project, release 10; <http://rdp.cme.msu.edu>). *Nucleic Acids Res.* 29, 173-174.
- Nugent, R.P., Krohn M.A. and Hillier S. L. (1991) Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram strain interpretation. *J. Clin. Microbiol.* 29, 297-301.
- Pavlova, S.I., Kilic, A.O., Kilic, S.S., So, J.S., Nader-Macias, M.E., Simões, J.A. and Tao L. (2002) Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. *J. Appl. Microbiol.* 92, 451-459.
- Siegel, S. and Castellan N. (1988) *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences* 2nd ed. pp 284-285. New York: McGraw-Hill.
- Song, Y.L., Kato, N., Matsumiya, Y., Li, C.X., Kato, H. and Watanabe K. (1999) Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal

lactobacilli isolated from Japanese women and newborn infants. J. Clin. Microbiol. 37, 3062-3064.

Song, Y., Kato, N., Liu C., Matsumiya, Y., Kato, H. and Watanabe K (2000). 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. 187, 167-173.

Vasquez, A. Jakobsson, T., Ahrne, S., Forsum, U. and Mollin G. (2002) Vaginal *Lactobacillus* flora of healthy Swedish women. J. Clin. Microbiol. 40, 2746-2749.

Velraeds, M.M., van der Mei, H.C., Reid, G. and Busscher H. J. (1996) Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by bio-surfactants from *Lactobacillus* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1958-1963.

Wilks, M., Wiggins, R., Whiley, A., Hennessy, E., Warwich, S., Porter, H., Corfield, A. and Millar M. (2004) Identification and H₂O₂ production of vaginal lactobacilli 5 from pregnant women at high risk of preterm birth and relation with outcome. J. Clin. Microbiol. 42, 713-717.

Zhou, X., Bent, S.J., Schneider, M.G., Davis, C.C., Islam, M.R. and Forney L. J. (2004) Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. Microbiology 150, 2565-2573.

Table 1: Lactobacillus species identified according to Multiplex PCR and the API identification software database.

Identification based on Multiplex PCR										
API 50 CH	<i>L. crispatus</i>	<i>L. jensenii</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. sp</i>	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. salivarius</i>	Total N (%)
<i>L. crispatus</i>	19	5	1	-	-	-	-	-	-	25 (27.2%)
<i>L. jensenii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. gasseri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. delbrueckii</i>	3	-	6	-	-	-	-	-	-	9 (9.8%)
<i>L. fermentum</i>	-	-	-	7	1	2	2	-	-	12 (13.0%)
<i>L. reuteri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. rhamnosus</i>	-	-	-	-	1	-	-	2	-	3 (3.3%)
<i>L. salivarius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1 (1.1%)
<i>L. acidophilus</i>	6	13	12	1	-	-	-	-	-	32 (34.8%)
<i>L. brevis</i>	-	1	-	2	-	-	-	-	-	3 (3.3%)
<i>L. plantarum</i>	2	4	-	-	-	-	-	-	-	6 (6.5%)
<i>L. paracasei</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1 (1.1%)
Total N (%)	30 (32.6%)	23 (25%)	19 (20.6%)	11 (12%)	2 (2.2%)	2 (2.2%)	2 (2.2%)	2 (2.2%)	1 (1.1%)	

Table 2: Agreement in the diagnosis of lactobacilli by molecular and biochemical methods (n=92).

	In agreement		% of agreement	Kappa (95%CI)	
	negative	positive			
<i>L. crispatus</i>	56	19	(81.5)	0.52	(0.32 - 0.71)
<i>L. delbrueckii</i>	81	0	(88.0)	-0.04	(-0.08 - 0.01)
<i>L. fermentum</i>	80	2	(89.1)	0.26	(-0.03 - 0.55)
<i>L. gasseri</i>	73	0	(80.4)	NP	
<i>L. jensenii</i>	69	0	(78.3)	NP	
<i>L. reuteri</i>	91	0	(98.9)	NP	
<i>L. salivarius</i>	91	1	(100.0)	1.00	(1.00 - 1.00)
<i>L. sp</i>	81	0	(88.0)	-0.04	(-0.08 - 0.01)
<i>L. rhamnosus</i>	89	2	(98.9)	NP	

NP = not possible to calculate

95% CI = 95% confidence interval

3.2. Artigo 2

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

Prevalence and characterization of Lactobacilos vaginais species in women at reproductive age without vulvovaginitis.

Eliane Melo Brolazo¹, José Antonio Simões², Maria Elena Fátima Nader³, Maria Silvina Juárez Tomás⁴, Gustavo Bueno Gregoracci⁵, Camila Marconi⁶

Titulação e afiliação institucional dos autores

1 Doutoranda em Microbiologia - Departamento de Tocoginecologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brasil.

2 Prof. Dr. Departamento de Tocoginecologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brasil.

3 Dra. em Microbiologia, pesquisadora responsável pelo Laboratório de Microbiologia Preventiva, Centro de Referência para Lactobacilos (CERELA), Tucumán, Argentina.

4 Dra. em Microbiologia - pesquisadora do Laboratório de Microbiologia Preventiva, Centro de Referência para Lactobacilos (CERELA), Tucumán, Argentina.

5 Doutorando em Microbiologia (Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Biologia - IB - UNICAMP

6 Doutoranda - Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brasil.

Endereço para correspondência:

Eliane Melo Brolazo

Caixa Postal 6181

13.084-971, Campinas, São Paulo, Brasil.

Telefone: +55-19-3289-2856 / Fax: +55-19-3289-2440

E-mail: elianeb@unicamp.br

Financiamento:

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).

Resumo

Objetivos: 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 no ambulatório de Planejamento Familiar da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP. 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 H_2O_2 , 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 H_2O_2 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 H_2O_2 e atingiram menores valores de pH em meio de cultura.

Palavras-chave: lactobacilos vaginais, multiplex PCR, ecossistema vaginal, identificação molecular, mulheres saudáveis.

Abstract

Objectives: Identify lactobacilli species isolated from the vaginal contents of healthy asymptomatic women, determine the most prevalent species and characterize them phenotypically. **Methods:** Lactobacilli were isolated in selective media from the vaginal contents of 135 women, with no complaints of vaginal discharge and negative laboratory diagnosis for vaginal infection, who were being followed up at the gynecological Family Planning departments of Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp. The isolates were identified using multiplex polymerase chain reaction (PCR) and, when necessary, *16S rRNA* gene sequencing. They were also evaluated with respect to the production of lactic acid, H_2O_2 , bacteriocins and their capacity to adhere to epithelial cells. **Results:** Eighty three lactobacilli strains were isolated and identified, and the predominant species were *L. crispatus* (30,1%), *L. jensenii* (26.5%), *L. gasseri* (22.9%) and *L. vaginalis* (8.4%). Only 20 out of 83 strains were found to be non-producers of H_2O_2 . Of the thirty-seven lineages selected and tested for their capacity to adhere to epithelial cells, 12 presented adhesion between 50% and 69%, 10 presented 70% or more and the remainder had little to no capacity to adhere to epithelial cells. None of the strains tested produced bacteriocins. **Conclusions:** *L. crispatus*, *L. jensenii* and *L. gasseri* were the most prevalent species isolated in selective culture media and identified through molecular techniques. Besides their frequencies, they also presented best H_2O_2 production and lowest pH in culture media.

Key-words: vaginal lactobacilli, multiplex PCR, vaginal ecosystem, molecular identification, healthy women.

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

Prevalence and characterization of Lactobacilos vaginais species in women at reproductive age without vulvovaginitis.

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, onde predominam os lactobacilos, por uma proliferação acentuada de *Gardnerella vaginalis* e outros microrganismos 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 6,0-6,5 ⁵. Além disto, 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 pH ⁷.

Além dos ácidos orgânicos, os lactobacilos produzem outras substâncias antimicrobianas como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e bacteriocinas. A inibição de espécies bacterianas pela presença de H_2O_2 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 H_2O_2 e este, na ausência de peroxidase, se acumula. O excesso desse metabólito pode inibir ou matar outros microrganismos, principalmente os grupos com carência ou baixa produção de peroxidase, como os anaeróbios. Por isso, a ausência de lactobacilos produtores de H_2O_2 permite o crescimento dos microrganismos catalase-negativos, sendo considerado um importante fator na fisiopatologia da VB.

O tratamento preconizado para VB é o metronidazol, efetivo contra a maioria dos microrganismos anaeróbios envolvidos nesta vulvovaginite. A taxa de cura de 7 a 10 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 prazo.

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^{1, 1}. Assim, os objetivos deste estudo foram 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.

Materiais e 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 - 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 Nugent¹. Apenas as pontuações de 0 a 3 foram consideradas como ausência de infecções genitais. Amostras endocervicais foram coletadas em UCM (*Universal Collection Médium*, Digene, São Paulo, Brasil), para posterior detecção de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhea*, 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 24-48 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 morfotintoriais (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*, 2000¹³. 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 Song¹³, com base nas sequências do gene 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 ATCC (American Type Culture Collection, 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 1400bp 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 anteriormente¹. As reações foram

realizadas segundo instruções do fabricante (*GE Healthcare*, Chalfont St. Giles, Reino Unido) e a incubação foi realizada 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 ressuspensa 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 1100bp 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 as 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 H_2O_2 : Os lactobacilos foram cultivados a 37°C em condições anaeróbias por 48 horas, em agar MRS contendo 0,25mg/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 microrganismo indicador (*Gardnerella vaginalis* ATCC 14018) para detecção de bacteriocinas através da formação de halos de inibição do crescimento do microrganismo indicador nestas placas. Visando descartar a ação de ácidos provenientes do metabolismo e de H₂O₂, 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 10⁵ células/ml. Os lactobacilos provenientes de subcultivos em meio seletivo foram lavados e ressuspensos em *Advanced* MEM, com concentração ajustada a 10⁷ lactobacilos/ml. Volumes iguais

das duas suspensões foram misturados e incubados por 1 hora a 37°C em estufa de CO₂. 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 calculou-se o índice de adesão (nº de bactérias aderidas/ nº de células com bactérias aderidas) e a porcentagem de adesão (nº de células com bactérias aderidas/ nº total de células contadas).

Resultados

A idade média das 135 mulheres foi de 31,6 ± 6,1 anos. O pH vaginal aferido em média foi de 4,2 ± 0,4 e o escore de Nugent 1,4 ± 0,9 (Média ± DP). Das 135 amostras coletadas, 11 foram excluídas por infecções (8 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 oncótica 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*, e 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 apresentou alta produção de ácido láctico. Das 83 cepas de lactobacilos analisadas, apenas 20 não apresentaram produção de H₂O₂ detectável pela técnica de cultivo em ágar MRS com TMB. 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 10 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 H₂O₂ pelo sistema *Meckoquant strip test* foi menos sensível, com 40 linhagens consideradas negativas para produção de H₂O₂ (dados não apresentados). Quanto à produção de bacteriocinas, em todos os sobrenadantes testados observou-se uma diminuição na concentração de colônias ao redor dos orifícios, ou seja, ocorreu uma redução do crescimento do microrganismo 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 H₂O₂, foram selecionadas 37 linhagens para o estudo de adesão ao epitélio vaginal. Destas, 12 apresentaram porcentagem de adesão entre 50% e 69% e 10 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 EUA, 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, 21, 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, que 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 influencia 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. rhamnosus* 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 frequentes ²⁴.

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* (1999), que comparou o pH inicial do meio de cultura e a concentração de bactérias, e observou que os lactobacilos vaginais param de crescer e acidificar quando atingem o pHs na faixa de 3,2 a 4,8, valores estes comparáveis com o pH observado *in vivo* ²⁷.

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 2250 mg/ml ⁵. 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 o ácido láctico pode não ser o único responsável pela redução do pH do meio⁵. Já foi reportado que o ácido láctico e o ácido acético produzidos por bactérias lácticas podem agir sinergicamente para inibir o crescimento de patógenos ²⁶.

Quanto à produção de H₂O₂, das 83 linhagens de lactobacilos analisadas, apenas 20 não apresentaram produção de H₂O₂ detectável pela técnica de crescimento em ágar MRS com TMB. Contudo, a técnica de detecção de H₂O₂ pelo sistema *Meckoquant strip test* apresentou menor sensibilidade, com 40 linhagens consideradas negativas para produção de H₂O₂. As melhores produtoras de H₂O₂ 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 H₂O₂ ²⁸ Alguns autores acreditam que deve haver relação entre a espécie e a capacidade de produção de H₂O₂ e que não há relação entre a origem da linhagem (proveniente de mulheres com ou sem VB) e a produção de H₂O₂ 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 H₂O₂ 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 H₂O₂. 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 genitourinárias. 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 vaginal ²⁹.

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 humanos ²⁹.

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 H₂O₂, características sugeridas como importantes para proteção contra várias infecções, principalmente a vaginose bacteriana.

Agradecimentos

À Sirlei Morais pela colaboração nas análises estatísticas.

Referências

- 1) Reddy G, Altaf M, Naveena BJ, Venkateshwar E , Kumar V. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - a review. *Biotechnol Adv.* 2008;26(1):22–34.
- 2) Dembélé T, Obdržálek V, Votava M. Inhibition of bacterial pathogens by lactobacilli. *Zentralbl Bakteriol.* 1998;228(3):395-401.
- 3) Darwish A, Elnshar 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.
- 4) 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.
- 5) Aroutcheva A, Gariti D, Simon M, Shott S, Faro JB, Simões JA, et al. Defense factors of vaginal lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;185(2):375-9.
- 6) Vitali B, Pugliese C, Biagi E, Candela M, Turrone S, Bellen G. 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.
- 7) French JI, McGregor JA. Bacterial vaginosis infections diseases in women. In: Faro S, Soper, DE. *Gynecologic Infections.* Philadelphia: Saunders; 2001. p. 221-39.
- 8) 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.

9) Livengood CH, 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 treatment of bacterial vaginosis. Sex Trans Dis. 1999;26(3):137-42.

10) Hillier S, Holmes KK. Sexually Transmitted Pathogens. In: Holmes K.K. et al, editores. Sexually Transmitted Diseases. 3rd ed. Washington, DC: McGraw-Hill; 2001. p. 563-604.

11) Ocaña VS, Bru E, Ruiz Holgado AAP, Nader-Macías ME. Surface characteristics of lactobacilli isolated from human vagina. J Gen Appl Microbiol. 1999;45(5):203-12.

12) Nugent RP, Krohn M, Hillier S. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standandized method of gram strain interpretation. J Clin Microbiol. 1991;29(2):297-301.

13) Song YL, Kato N, Liu CX, Matsumiya Y, Kato H, Watanabe K. Rapid identification of 11 human intestinal Lactobacillus species by PCR multiplex assays using group and species-specifc primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. FEMS Microbiology Letters. 2000;187(2):167-73.

14) Wilks M, Wiggins R, Whiley A, Hennessy E, Warwich 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(12):1117-24.

17) Ocaña VS, Nader-Macías ME. Adhesion ability of lactobacillus to vaginal epithelia. In Spencer JFT, Spencer ALR, editores. Public health microbiology - Methods and protocols. Clifton: Humana Press;2004. p. 441-5.

18) Pavlova SI, Kiliç AO, Kiliç SS, So JS, Nader-Macías ME, Simões JA, et al. Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries base don 16S rRna gene sequences. J Appl Microbiol. 2002;92(3):451-9.

19) Kiliç AO, Pavlova SI, Alapay 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. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 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(12):115.
- 22) Song YL, Kato N, Matsumiya Y, Li 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) Vasquez A, Jakobsson T, Ahrné S, Forsum U, Mollin 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(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) 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):287-93.
- 27) 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.

28) Juárez Tomás MS, Zonenschain D, Morelli L, Nader-Macías ME. Characterisation of potentially probiotic vaginal lactobacilli isolated from Argentinean women. *Br J Biomed Sc.* 2005;62(4):170-4.

29) Kaewsrirchan J, Peeyananjarassri K, Kongprasertkit J. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006;48(1):75-83.

Tabela 1 - Espécies de lactobacilos mais prevalentes e caracterização quanto à produção de ácido láctico, H₂O₂ 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>		
	<i>n</i>	Média	Desvio padrão	<i>n</i>	Média	Desvio padrão	<i>n</i>	Média	Desvio padrão	<i>n</i>	Média	Desvio padrão
Acidificação meio cultura	25	4,132	0,565	22	3,652	0,840	19	3,762	0,228	7	5,260	0,645
Produção ác. láctico (mg/mL)	25	0,059	0,041	22	0,051	0,047	19	0,061	0,054	7	0,040	0,047
Produção de H ₂ O ₂	25	1,480	1,046	22	2,500	1,058	19	1,789	1,032	7	0,429	0,787
Índice de adesão	6	2,167	0,906	13	3,610	3,399	10	3,622	2,886	1	1,000	-
Percentual de adesão	6	56,250	14,470	13	53,654	22,273	10	48,210	18,180	1	47,500	-

Tabela 2- Espécies de lactobacilos menos prevalentes e caracterização quanto à produção de ácido láctico, H₂O₂ 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>	
	<i>n</i>	Média	Desvio padrão	<i>n</i>	Média	Desvio padrão	<i>n</i>	Média	Desvio padrão	<i>n</i>	Média	Desvio padrão	<i>n</i>	Média	<i>n</i>	Média
Acidificação meio cultura	2	4,425	0,516	2	5,290	0,099	2	4,925	0,106	2	4,010	0,014	1	5,440	1	4,150
Produção ác. láctico (mg/mL)	2	0,053	0,052	2	0,069	0,081	2	0,028	0,039	2	0,037	0,003	1	0,058	1	0,042
Produção de H ₂ O ₂	2	0,500	0,707	2	0,000	0,000	2	0,000	0,000	2	1,000	1,414	1	2,000	1	1,0
Índice de adesão	2	2,235	1,393	2	6,875	7,672	1	2,750	-	1	11,150	-	0	-	1	60,8
Percentual de adesão	2	52,500	24,749	2	70,000	24,749	1	70,000	-	1	85,000	-	0	-	1	85%

4. Discussão

De acordo com os perfis bioquímicos obtidos com teste API aplicado ao sistema APIweb[®], a maioria dos lactobacilos isolados foi identificada como *L. acidophilus* (32,6%), espécie que não foi encontrada no ambiente vaginal através da identificação por PCR multiplex. O grupo de lactobacilos anteriormente classificado como *L. acidophilus* foi estudado geneticamente e reclassificado em outras 6 espécies de lactobacilos, entre elas *L. crispatus*, *L. gasseri* e *L. jensenii*, espécies frequentemente isoladas de conteúdo vaginal de mulheres saudáveis (20). A concordância entre a identificação taxonômica realizada pela técnica do PCR multiplex e o perfil bioquímico pelo API foi muito baixa para a maioria das espécies.

Como o método de identificação taxonômica por PCR multiplex foi desenvolvido inicialmente para lactobacilos intestinais, o conjunto de *primers* utilizados mostrou-se insuficiente para a identificação de todas as espécies de origem vaginal. As linhagens não identificadas por este método (10%) foram então submetidas ao sequenciamento do gene *RNAr 16S*. Das oito linhagens sequenciadas, sete se alinharam com a espécie *Lactobacillus vaginalis* e uma com a espécie *Lactobacillus mucosae*.

Em razão da necessidade do desenvolvimento de métodos mais reprodutíveis e rápidos para determinar geneticamente a distribuição das espécies de lactobacilos vaginais (23) e do número de linhagens não identificadas pelo método de PCR multiplex, principalmente de *L. vaginalis*, seria interessante aprofundar o estudo genético desta espécie, de forma a possibilitar o desenho de *primers* específicos para incluí-la no grupo de lactobacilos passíveis de identificação por este método.

A espécie predominante no grupo de mulheres estudadas foi *L. crispatus* presente em 30,1% das amostras, seguida de *L. jensenii* (26,5%), *L. gasseri* (22,9%) e *L. vaginalis* (8,4%), resultados coerentes com dados da literatura (17, 27). Outras espécies (*L. fermentum*, *L. delbrueckii*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. mucosae* 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 frequentes (22).

Estudos mais recentes realizados, utilizando técnicas de biologia molecular, têm mostrado que além de *L. crispatus*, *L. jensenii* e *L. gasseri* e *L. vaginalis* outra espécie frequente no ambiente vaginal é *L. iners* (26). Esta espécie 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 vaginal por métodos moleculares, que independem de cultivo e isolamento prévio (19,26). 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.

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 (22).

Em relação às características consideradas potencialmente benéficas em lactobacilos, as espécies de *L. jensenii* e *L. gasseri* estudadas foram as 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. (16).

Quanto à capacidade de adesão ao epitélio vaginal, das linhagens que atingiram índice de adesão igual ou maior que 70%, e concomitantemente a boa ou ótima produção de peróxido, uma é da espécie *L. crispatus*, duas *L. jensenii* e uma *L. gasseri*.

Para o desenvolvimento de um produto para a reconstituição da microbiota vaginal, estas linhagens com características mais promissoras devem ser estudadas mais profundamente quanto à ausência de infectividade ou efeitos colaterais e propriedades biotecnológicas, a fim de serem testadas e aplicadas em humanos (6)

5. Conclusões

- As espécies de lactobacilos 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%).
- Em média, as linhagens pertencentes às espécies *L. crispatus*, *L. jensenii* e *L. gasseri* foram as que atingiram menores valores de pH (próximos a 4,0) e apresentaram melhor produção de H₂O₂.
- Nenhuma das linhagens analisadas demonstrou capacidade de produção de bacteriocina contra a espécie indicadora (*Gardnerella vaginalis* ATCC 14018).
- Quanto à adesão ao epitélio vaginal, linhagens das espécies *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii*, *L. salivarius*, *L. gasseri*, *L. crispatus*, *L. jensenii* e uma das *L. fermentum* testadas apresentaram índice de adesão maior que 70%.
- Das linhagens com índice de adesão igual ou maior que 70%, uma linhagem da espécie *L. crispatus*, duas *L. jensenii* e uma *L. gasseri*, apresentaram também boa ou ótima produção de peróxido.

6. Referências Bibliográficas

1. Wilks M, Wiggins R, Whiley A, Hennessy E, Warwick S, Porter H, Corfield A, 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 Feb;42(2):713-7.
2. Reddy G, Altaf M, Naveena BJ, Venkateshwar M, Kumar EV. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - a review. *Biotechnol Adv.* 2008 Jan-Feb;26(1):22–34.
3. Dembélé T, Obdržálek V, Votava M. Inhibition of bacterial pathogens by lactobacilli. *Zentralbl Bakteriол.* 1998 Nov;228(3):395-401.
4. Chan RC, 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 Jan;47(1):84-9.
5. Velraeds MM, van der Mei HC, Reid G, Busscher HJ. Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by bio-surfactants from *Lactobacillus* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996 Jun;62(6):1958-63.
6. Kaewsrichan J, Peeyananjarassri K, Kongprasertkit J. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006 Oct;48(1):75-83.

7. French JI, McGregor JA. Bacterial vaginosis infections diseases in women. In: Faro S, Soper DE. Gynecologic Infections. Philadelphia: WB Saunders; 2001. p. 221-39.
8. Darwish A, Elnshar 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 Dec;33(6):781–7.
9. Atashili J, Poole C, Ndumbe PM, Adimora AA, Smith JS. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. AIDS. 2008 Jul;22(12):1493-501.
10. Centers for Disease Control and Prevention. 1998 Guidelines for treatment of sexually transmitted diseases. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1998 Jan;47(RR-1):70-9.
11. Simões JA, Aroucheva AA, Shott S, Faro S. Effect of metronidazole on the growth of vaginal lactobacilli in vitro. Infect Dis Obstet Gynecol. 2001;9(1) :41-5.
12. Aroucheva A, Gariti D, Simon M, Shott S, Faro J, Simoes JA, Gurguis A, et al. Defense factors of vaginal lactobacilli. Am J Obstet Gynecol. 2001 Aug;185(2):375-9.
13. Eschenbach DA, Davick PR, Williams BL, Klebanoff SJ, Young-Smith K, Critchlow CM, Holmes KK. Prevalence of hydrogen peroxide-producing Lactobacillus species in normal women and women with bacterial vaginosis. J Clin Microbiol. 1989 Feb;27(2):251-6.
14. Hillier S, Holmes KK. Sexually Transmitted Pathogens. In: Holmes K.K. et al, editores. Sexually Transmitted Diseases. 3rd ed. Washington, DC: McGraw-Hill; 2001. p. 563-604.

15. Ocaña VS, Bru E, Ruiz Holgado AAP, Nader-Macías ME. Surface characteristics of lactobacilli isolated from human vagina. *J Gen Appl Microbiol.* 1999 Oct;45(5):203-12.
16. 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 Oct;67(10):5170-5.
17. Pavlova SI, Kilic AO, Kilic SS, So JS, Nader-Macias ME, Simões JA, Tao L. Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. *J. Appl. Microbiol.* 2002;92(3):451-9.
18. McGroarty JA, Tomeczek L, Pond DG, Reid G, Bruce AW. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus* species: correlation with susceptibility to the spermicidal compound nonoxynol-9. *J Infect Dis.* 1992 Jun; 165(6):1142-4.
19. Vásquez A, Jakobsson T, Ahmé S, Forsum U, Mollin G. Vaginal lactobacillus flora of healthy Swedish women. *J Clin Microbiol.* 2002 Aug; 40(8):2746-9.
20. Song YL, Kato N, Matsumiya Y, Li 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 Sep; 37(9):3062-4.
21. Maidak BL, Cole JR, Lilburn TG, Parker CT Jr, Saxman PR, Farris RJ, Garrity GM, .et al. The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* 2001 Jan;29(1):173-4.
22. 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 Aug ;150(8) :2565-73.

23. 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 Jun;187(2): 167-73.
24. 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 Oct;43(10):5309-11.
25. McLean NW, Rosenstein IJ. Characterisation and selection of a *Lactobacillus* species to re-colonise the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. *J Med Microbiol.* 2000 Jun;49(6):543-52.
26. De Backer E, Verhelst R, Verstraelen H, Alqumber MA, Burton JP, Tagg JR, Temmerman M, 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 Dec;7:115.
27. Kiliç AO, Pavlova SI, Alapay 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 Jan;8(1):31-9.

7. Anexos

7.1. Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prevalência de espécies de lactobacilos vaginais e produção de fatores de proteção contra patógenos locais

Eu, _____

anos, RG _____, endereço _____,
telefone _____, Nº prontuário _____, aceito colaborar como voluntária de uma
pesquisa para estudo das bactérias (micróbios) presentes na vagina saudável que
protegem de infecções. O objetivo deste projeto é isolar e estudar as características dos
lactobacilos vaginais, que funcionam como protetores da vagina.

Sei que minha colaboração com o estudo consiste em deixar coletar material do
interior de minha vagina. Fui informada que este procedimento não será doloroso e nem
prejudicial à minha saúde e não tomará muito de meu tempo, pois é o mesmo realizado
durante uma consulta ginecológica de rotina. Sei que serão feitos exames laboratoriais
para detecção de infecções vaginais e se alguma infecção for descoberta, serei avisada e

receberei a indicação para o tratamento. Todos os resultados destes exames laboratoriais serão anexados ao meu prontuário.

Fui também informada que, caso eu não aceite participar do estudo, isto não prejudicará o meu atendimento no CAISM. Fui esclarecida que quando os resultados forem divulgados, o meu nome não será mencionado. Posso tirar as minhas dúvidas todos os dias com a pesquisadora Eliane Melo Brolazo, no telefone (19) 3788 9228 . Posso também fazer denúncias ou queixas ligando para a Comissão de Ética em Pesquisa, no telefone (19) 3788 8936. Sei que não serei paga para participar deste estudo. Informo que compreendo este termo de consentimento e que a minha assinatura abaixo significa que aceito participar deste estudo.

Paciente: _____

RG: _____

Responsável pelo atendimento clínico: _____

Pesquisador Responsável: _____

CAISM / UNICAMP _____, de _____, de 20 _____

7.2. Anexo 2 – Ficha de Admissão

Prevalência de espécies de lactobacilos vaginais e produção de fatores de proteção contra patógenos locais

Iniciais: _____

Caso: _____

Data: _____

Exame ginecológico:

PH vaginal: _____

Whiff: () positivo

() negativo

Aspecto Clínico do corrimento:

	Ausente (0)	Pouco (1)	Moderado (2)	Intenso (3)	Muito Intenso (4)
Volume corrimento					
Mau cheiro					
Eritema vaginal					
Outros (quais)					

Bacterioscopia :

1. a fresco:

Células epiteliais	
Leucócitos	
Fungos	
<i>T. vaginalis</i>	
Clue cells	
Outros: _____	

2. Gram

	0	1+	2+	3+	4+
Lactobacilos vaginais					
Difteróides					
Bacilos Gram negativos					
Cocos Gram positivos					
<i>Gardnerella vaginalis</i>					
<i>Mobiluncus</i> sp					
Fungos (hifas /leveduras)					

Pontuação (Nugent): _____

Conclusão Diagnóstica: Vaginose bacteriana (Amsel) - [] sim [] não
Vaginose bacteriana (Nugent) - [] sim [] não