

## **Aislamiento de *Lactobacillus spp* de vagina de mujeres sanas en Cuba con fines probiótico.**

Arturo Molina<sup>1</sup>, Marta Laurencio<sup>2</sup>, Gerardo Ascunse<sup>3</sup>, Ana J. Rondon<sup>2</sup>, Grethel Milian<sup>2</sup> y Manuel Pérez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hospital Provincial Docente Gineco-Obstétrico, Matanzas.

E-mail: [amolina.mtz@infomed.sld.cu](mailto:amolina.mtz@infomed.sld.cu)

<sup>2</sup>Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos".

<sup>3</sup>Instituto de Investigaciones la Industria Alimenticia, Matanzas.

### **RESUMEN**

Se aislaron 80 cepas de *Lactobacillus spp* autóctonas del tracto urogenital de 23 mujeres clínicamente sanas, en edad fértil, que asistieron a consulta para diagnóstico de embarazo en el Hospital Gineco-Obstétrico de Matanzas, Cuba. Cada paciente confirmó su consentimiento por escrito. Las muestras fueron tomadas y colocadas en tubos de ensayo con caldo Mann Rogosa Sharper (MRS) estéril. Los aislamientos se realizaron en el Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas. Para ello se hicieron diluciones seriadas y siembra en placas con medio Agar-MRS. La incubación se desarrolló en un tiempo de 48 horas a una temperatura de 37° C. Las cepas aisladas fueron colocadas en medio Agar-MRS semisólido y posteriormente purificadas por agotamiento, en el medio antes señalado. Para la selección del género se realizaron las siguientes pruebas: forma de la célula y de la colonia, tinción de Gram y ensayo de la enzima catalasa. Las cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* fueron conservadas en medio Tioglicolato semisólido en una colección de cultivo perteneciente al Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Matanzas.

**Palabras claves:** *Lactobacillus spp*, probiótico vaginal, aislamiento, mujeres sanas.

### **Abstract**

80 strains of *Lactobacillus spp* autochthonous of the urogenital tract from 23 clinically healthy women in fertile age were isolated. They attended consultation for diagnose of pregnancy and they confirmed their consent in writing. The samples were taken in the Gineco-obstetric Hospital of Matanzas, Cuba and placed in assays tubes with sterile Mann Rogosa Sharper (MRS) broth. The isolations were made in the Center of Biotechnical Studies of the University of Matanzas. After made seriate dilutions and the growth in placas with Agar MRS, the incubation was developed at 48 hours to 37° C. The isolated strains were placed between Agar MRS semisolid and purified by exhaustion, in the medium before signal. For the selection of the genus were development the following tests: forms of the cell, forms of the colony, Gram tincion and test of the catalas. The strains belonging to the *Lactobacillus* genus was conserved in Tioglicolato semisolid in a cultivation collection in the Laboratory of Biotechnology of the University of Matanzas.

**Key words:** *Lactobacillus spp*, vaginal probiotic, isolation, healthy women.

## **INTRODUCCION**

La vagina de mujeres saludables esta colonizada por especies de *Lactobacillus* como microorganismos predominantes, los que juegan un importante papel en la protección del medio vaginal contra infecciones por patógenos urogenitales (Boris et al. 1998, Martin et al. 1999, Malean and Rosenstein 2000; Reid et al. 2003.; Wimpenny and Colasanti, 2004). Se reconoce que *Lactobacillus* controla bacterias uropatógenas, que frecuentemente provocan síndrome de vaginosis (Spiegel, 1991; Cauce et al. 2002). Así, el balance microbiano óptimo, en vagina de mujeres saludables, se define por su contenido en *Lactobacillus spp* (Vázquez et al. 2002; Castro y Rovetto, 2006).

*Lactobacillus acidophilus* constituye la flora dominante en muchas mujeres sanas (Lachlak et al. 1996; Dicks et al. 2000; Reid et al. 2001). Sin embargo, otras especies han sido encontradas en ese balance, entre ellas se citan *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus vaginalis*, and *Lactobacillus salivarius* (Redondo-Lopez et al. 1990, Song et al. 1999, Zhong et al. 1998). El complejo *Lactobacillus acidopphylyus* ha mostrado ser altamente heterogéneo (Lauer et al. 1980), siendo actualmente, dividido en dos grupos (A y B) según el ADN homólogo (Jonson et al. 1980), para formar seis especies de *L. acidophilus*: *L. acidophilus* (A1), *Lactobacillus crispatus* (A2), *Lactobacillus amylovorus* (A3), *Lactobacillus gallinarum* (A4), *Lactobacillus gasseri* (B1) y *Lactobacillus johnsonii* (B2) (Fujisawa et al. 1992, Jonson et al. 1980). Estas especies son homofermentativas obligadas. Recientemente dos nuevas especies han sido incluidas: *Lactobacillus amylolyticus* y *Lactobacillus iners* (Falsen et al. 1999).

El objetivo del presente trabajo es aislar cepas de *Lactobacillus spp* de vagina de mujeres sanas en la provincia de Matanzas, Cuba con la finalidad de elaborar un producto probiótico en investigaciones futuras.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Toma de muestras**

Se tomaron muestras de 23 mujeres en estado clínicamente sano, corroborado por estudios bacteriológico. Cada paciente aceptó su consentimiento por escrito en el acta establecida para estos casos.

Para la toma de las muestras fue aseptizada la vulva con hibitane acuoso al 1 %. Se colocó espéculo bivalvo. Se tomaron las muestras del fondo de saco vaginal posterior por raspado con espátula de aire previa eliminación de la secreción normal, que existía en ese momento con hisopo estéril. Las muestras se colocaron en tubos estériles con 9 mL de medio caldo MRS (de Mann, Rogosa y Sharpe, 1960). Fueron trasladadas hasta el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Matanzas antes de las dos horas posteriores. Se incubaron durante 24 horas a 37<sup>0</sup> C. Tres de las muestras de los exudados demostraron la presencia de *Candida spp* por lo que fueron desechadas, quedando 20 muestras para los aislamientos.

## **Aislamiento**

A cada muestra se le realizó diluciones seriadas, en agua de peptona estéril, hasta  $10^{-10}$ . Se sembró 1 mL en medio Agar MRS, vertido en placas de Petri, de las diluciones  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  y  $10^{-10}$  con 3 réplicas por dilución. Se cubrió cada placa con una capa fina de medio Agar MRS para mantener la anaerobiosis facultativa. Seguidamente se incubaron a  $37^{\circ}$  C. Transcurridas 48 horas, de las placas sembradas se seleccionaron las colonias con características de género *Lactobacillus*, tales como: tamaño pequeñas, apariencia transparente, forma redonda y crecimiento en profundidad. Estas fueron transferidas a tubos con medio LAPTg e incubadas a  $37^{\circ}$  C por 48 horas. Se observaron las siguientes características: crecimiento en forma de velo blanco hasta el fondo y crecimiento microaerófilo cerca de la superficie. Posteriormente cada cepa fue purificada en placas con medio Agar MRS por agotamiento e incubadas a  $37^{\circ}$  C por 48 horas para obtener cepas puras. Las cepas puras se conservaron en el medio semisólido LAPTg. Incubadas a  $37^{\circ}$  C con pases a medio fresco cada tres meses. Una réplica de estas se mantienen en tubos a  $4^{\circ}$  C. Adicionalmente, se conservaron réplicas por el método de liofilización y en glicerol al 40% a  $-70^{\circ}$

## **Tinción de Gram**

A las cepas puras se les realizó tinción de Gram, para seleccionar las cepas Gram+ y las formas bacilares (Tabla 1).

**Determinación de la producción de catalasa:** Se sembraron placas (3 por cada cepa) por agotamiento en Agar-MRS que fueron incubadas durante 48 horas a  $37^{\circ}$  C, hasta la aparición de colonias. Para la detección de la producción de catalasa se colocó una gota del reactivo ID color catalasa, de la BioMérieux SA, sobre las colonias bien aisladas y se observó la presencia o no de desprendimiento de burbujas.

## **Fermentación de la glucosa.**

Se adicionó caldo MRS en tubos de ensayo con campana de Dujam invertidos para determinar la producción de  $\text{CO}_2$  por las heterofermentativas y carencia de este gas en homofermentativas, bajo las mismas condiciones usadas para la producción de catalasa.

## **Determinación de pH.**

Se realizó una cinética de determinación del pH a cada cepa.

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

### **Mujeres muestreadas y aislamientos**

Del total de mujeres muestreadas, 13 tenían un pH vaginal de 4, de las que se aislaron 40 cepas; 3 un pH de 4,5 con 20 cepas aisladas; 5 con un pH de 5,0 con 10 cepas aisladas y 2 con un pH de 5,5 con 10 cepas aisladas (tabla 1).

El pH vaginal varía durante el ciclo menstrual desde 3,5 hasta 7,0, cuando existe un pH ácido predominan las poblaciones de *Lactobacillus spp.* Cuando el

pH vaginal estuvo en 4,5 fueron aisladas un mayor número de cepas con características de *Lactobacillus* (Spiegel 1983). Según Spiegel et al (1983) cuando el pH está por encima de 5,0 pueden aparecer infecciones vaginales por la presencia de microorganismos uropatógenos. Alfonso y Fernández (2004) revisaron los valores del pH vaginal normal, en los distintos momentos y épocas de la vida de la mujer y en las vaginitis más frecuentes. También evaluaron el mecanismo de depuración biológica de la vagina y destacaron el beneficio que supone que el ginecólogo determine el valor del pH vaginal en sus exploraciones, para corregirlo, aumentando o disminuyendo la acidez, si fuese necesario, pues su alteración favorece las infecciones vaginales y sus recidivas. Según estos autores la corrección del pH vaginal resulta beneficiosa, tanto en la prevención como coadyuvante en el tratamiento de las vaginitis.

El pH vaginal es distinto en cada momento y etapa de la vida de la mujer, si no se conocen la época de la vida, el momento del ciclo, de poco podrá valer la determinación del pH vaginal. Pero si, contrariamente, se une su valor al momento y circunstancia concretos, el interés clínico será muy importante. El pH vaginal alterado, por exceso o por defecto, puede favorecer la infestación y la colonización vaginal por uropatógenos (Alfonso y Fernández 2004).

**Tabla 1.** pH vaginal de las mujeres muestreadas y número de cepas aisladas en cada uno de ellos.

<b>pH vaginal</b>	<b>No. Mujeres</b>	<b>No. Cepas aisladas</b>
<b>4,0</b>	13	40
<b>4,5</b>	3	20
<b>5,0</b>	5	10
<b>5,5</b>	2	10
<b>total</b>	20	80

### **Tinción de Gram**

A las cepas aisladas se les desarrolló la tinción de Gram para determinar características celulares. Se observaron 30 cepas de forma bacilar y 20 en forma de cocos (tabla 2). Las restantes tenían características morfológicas y celulares similares a levaduras, por lo que fueron eliminadas.

### **Producción de catalasa**

Las 50 cepas seleccionadas por sus características morfológicas y celulares fueron catalasa negativa (tabla 2).

La catalasa es la responsable de la degradación del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua y oxígeno, la cual no es encontrada en microorganismos anaerobios e inclusive en los microaerófilos. Aparentemente la carencia de catalasa en microorganismos anaerobios, explica en parte la toxicidad del oxígeno para estos microorganismos.

*Lactobacillus spp*, principalmente aquellas cepas que producen altas concentraciones de peróxido de hidrógeno pueden tener un efecto protector de

la vagina por la inhibición de especies patógenas, que son la causa principal de vaginosis. Wilks et al (2004) identificaron cepas de *Lactobacillus* productoras de peróxido de hidrógeno de vagina de 20 mujeres gestantes y encontraron una correlación entre las cepas de *Lactobacillus*, la producción de peróxido y la protección a la vagina con una disminución en las vaginosis.

### Fermentación de la glucosa

De las 20 cepas en forma de cocos, 18 fueron negativa en producción de gas, o sea son homofermentativas y 2 fueron positivas a esta prueba, siendo heterofermentativas. Las 30 cepas bacilares fueron negativas en relación con la producción de gas (homofermentativas) (tabla 2).

**Tabla 2.** Características bioquímicas e identificación de las cepas ácido lácticas.

Cepa	Número de cepas	Catalasa	Producción de gas	pH inicial Medio MRS	pH final 24 horas
<b>Cocos</b>	20	-	18 – 2 +	6,2	4,0-5,0
<b>Bacilos</b>	30	-	-	6,2	3,7-4,3

### Dimámica de pH y crecimiento de las 8 cepas de mejor comportamiento

Cepa (código)	pH inicial	pH final (24 horas)	Crecimiento inicial (UFC/ml)	Crecimiento final (UFC/ml)
<b>A20</b>	6,20	3,85	$1,0 \times 10^2$	$2,70 \times 10^{10}$
<b>A59</b>	6,20	3,88	$1,0 \times 10^2$	$2,65 \times 10^{10}$
<b>A63</b>	6,20	4,01	$1,0 \times 10^2$	$2,71 \times 10^9$
<b>A42</b>	6,20	4,02	$1,0 \times 10^2$	$2,56 \times 10^9$
<b>A7</b>	6,20	4,16	$1,0 \times 10^2$	$2,45 \times 10^9$
<b>A51</b>	6,20	4,20	$1,0 \times 10^2$	$2,50 \times 10^8$
<b>A35</b>	6,20	4,48	$1,0 \times 10^2$	$2,00 \times 10^8$
<b>A8</b>	6,20	3,73	$1,0 \times 10^2$	$2,93 \times 10^{10}$

### CONCLUSIONES

Fueron aisladas 30 cepas con forma de bacilos y 20 de cocos de vagina de mujeres sanas en la provincia de Matanzas, Cuba con la finalidad de elaborar un producto probiótico en investigaciones futuras.

## REFERENCIAS

- Amsel, R., P. A. Totten, C. A. Spiegel, K. C. Chen, D. Eschenbach, and K. K. Holmes. 1983. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am. J. Med.* 74:14–22.
- Boris, S., J. E. Suárez, F. Vázquez, and C. Barbes. 1998. Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infect. Immun.* 66:1985–1989.
- Castro, L. A.; Rovetto, C. 2006. Probióticos: Utilidad clínica. *Colombia Med.* 37 (4): 308-314
- Cauci, S.; Driussi, S.; De Santo, D. ; Penacchioni, P.; Lannicelli, T.; Lanzafame, P.; De Seta, F.; Quadrifoglio, F.; De Aloysio, D.; and Guaschino, S. 2002. Prevalence of Bacterial Vaginosis and Vaginal Flora Changes in Peri- and Postmenopausal Women. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (6) 2147-2152
- Dicks, L. M. T.; Silvester, M.; Lawson, P.; and Collins, M. 2000. *Lactobacillus fornicalis* sp. nov., isolated from the posterior fornix of the human vagina. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1253–1258
- Falsen, E., C. Pascual, B. Sjöden, M. Ohlén, and M. D. Collins. 1999. Phenotypic and phylogenetic characterisation of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:217–221.
- Fujisawa, T., Y. Benno, T. Yaeshima, and T. Mitsuoka. 1992. Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3 (Johnson et al. 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura 1981). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:487–491.
- Johnson, J. L., C. F. Phelps, C. S. Cummins, J. London, and F. Gasser. 1980. Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* group. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30:53–68.
- Klein, G., A. Pack, C. Bonaparte, and G. Reuter. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 41:103–125.
- Lachlak, N., E. Ageron, O. Zampatti, G. Michel, and P. A. D. Grimont. 1996. Composition of the *Lactobacillus acidophilus* complex isolated from vaginal flora. *Microbiologica* 19:123–132.
- Lauer, E., C. Helming, and O. Kandler. 1980. Heterogeneity of the species *Lactobacillus acidophilus* (Moro) Hansen and Møcquot as revealed by

biochemical characteristics and DNA-DNA hybridization. Zentbl. Bakteriol. Microbiol. Hyg. Abt. 1 Orig. C 1:150–168.

- Martin, H. L., B. A. Richardson, P. M. Nyange, L. Lavreys, S. L. Hillier, B. Chohan, K. Mandaliya, J. O. Ndinya-Achola, J. Bwayo, and J. Kreiss. 1999. Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J. Infect. Dis.* 180:1863–1868.
- McLean, N. W., and I. J. Rosenstein. 2000. Characterisation and selection of a *Lactobacillus* species to re-colonise the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. *J. Med. Microbiol.* 49:543–552.
- Nugent, R. P., M. A. Krohn, and S. L. Hillier. 1991. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. *J. Clin. Microbiol.* 29:297–301.
- Redondo-Lopez, V., R. L. Cook, and J. D. Sobel. 1990. Emerging role of Lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev. Infect. Dis.* 12:856–872.
- Reid G, Bruce A. W.; Fraser N.; Heinemann C.; Owen J.; Henning B. 2001. Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 30: 49-52.
- Reid G. ; Charbonneau D.; Erb J.; Kochanowski B. ; Beuerman D, Poehner D, Bruce A. 2003. Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 35: 131-134
- Spiegel, C. A. 1991. Bacterial vaginosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:485–502.
- SPIEGEL, C.; AMSEL, R. AND HOLMES, K. 1983. Diagnosis of Bacterial Vaginosis by Direct Gram Stain of Vaginal Fluid. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 18 (1): 170-177.
- Song, Y.-L., N. Kato, Y. Matsumiya, C.-X. Liu, H. Kato, and K. Watanabe. 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.
- Vázquez, Alejandra, Tell Jakobsson, Siv Ahrne, Urban Forsum and Goran Molin. 2002. Vaginal *Lactobacillus* Flora of Healthy Swedish Women. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, (8): 2746–2749.
- Wilks, M.; Wiggins, R.; Whiley, A.; Hennessy, E.; Warwick, S. Porter, H.; Corfield, A. and Millar, M. 2004. Identification and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production of Vaginal Lactobacilli from Pregnant Women at High Risk of Preterm Birth and Relation with Outcome. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (2): 2713–2717

Wimpenny J. and Colasanti, R. 2004. A simple cellular automaton model for coaggregation. *Biofilms* 1, 369–375.

Zhong, W., K. Millsap, H. Bialkowska-Hobrzanska, and G. Reid. 1998. Differentiation of *Lactobacillus* species by molecular typing. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2418–2423.