



Teste de sensibilidade ao quefir de cepas de *Candida sp.* isoladas de vulvovaginites

Isabela Mendes Baldim^{1*}; Maria Aparecida Pereira¹; Luciana Rosa Alves Rufino²; Nelma de Mello Silva Oliveira²; João Evangelista Fiorini²

¹Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas, MG, Brasil.

²Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos (UNIFENAS), Alfenas, MG, Brasil.

RESUMO

A candidíase vulvovaginal é uma inflamação da mucosa genital que se desenvolve em decorrência de infecção por leveduras do gênero *Candida*, as quais são habitantes normais do canal vaginal. O quefir é um probiótico que se apresenta em grãos ou grumos, formado por diversos microrganismos, como por exemplo, várias espécies de *Lactobacillus* e leveduras, que vivem em um complexo sistema de simbiose adsorvidos em uma matriz de polissacarídeos secretados pelo mesmo. O presente estudo foi realizado com o objetivo de isolar e identificar leveduras de vulvovaginites recorrentes e testar *in vitro* a ação do quefir sobre estes microrganismos. Para o isolamento e identificação utilizou-se CHROMagar-*Candida* e confirmação bioquímica. O antibiograma foi realizado pela técnica de poços. Das 44 amostras coletadas, 40,91% foram positivas para *Candida sp.*, as quais mostraram prevalência das espécies não-albicans (52,63%) sobre as espécies de *C. albicans*. No antibiograma, houve uma sensibilidade de 68,42% de ambas as populações à suspensão de quefir, enquanto para o mesmo, veiculado em base não-iônica, houve redução do espectro de ação. Concluiu-se que a suspensão foi mais eficaz em relação à sua associação com base não iônica, o que torna inviável a veiculação desta formulação.

Palavras-chave: Probiótico. Leveduras. Infecções do trato genital. Antimicrobiano.

INTRODUÇÃO

As comunidades bacterianas que colonizam a vagina são constituídas de uma mistura complexa e multiespecífica de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, com a predominância de espécies anaeróbicas, e algumas espécies de leveduras, como *Candida albicans* e, em menor proporção, outras espécies de *Candida*, como *C. glabrata*

e *C. parapsilosis* (Bauters et al., 2002). Estas comunidades vivem em equilíbrio (comensais), podendo tornar-se patógenos em determinadas situações. O conteúdo desta microbiota está diretamente relacionado à colonização por *Lactobacillus sp.*, espécie bacteriana predominante no meio vaginal, determinando seu pH ácido (entre 3,5 a 4,5) e inibindo o crescimento de outros microrganismos potencialmente patógenos a esta região, graças à produção de substâncias como ácido lático, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (Donders et al., 2000).

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma inflamação da mucosa genital e está entre os principais problemas ginecológicos que afetam mulheres em idade reprodutiva. Desenvolve-se em decorrência de infecção por leveduras do gênero *Candida*, habitantes normais da vagina ou carreadas por meio da autotransmissão da região perianal (Ferrazza et al., 2005). Os sintomas típicos de CVV incluem corrimento vaginal, semelhante a “leite coalhado” e prurido que se exacerba à noite, pelo calor local. Outros mais frequentes são: desconforto vulvar, dispareunia e disúria. Porém, nenhum deles é específico (Bastos et al., 2003).

Na etiologia das vulvovaginites, observa-se que *C. albicans* é o agente mais freqüente, respondendo por 80 a 90% dos casos. Entretanto, tem-se observado um aumento na freqüência das espécies não *C. albicans*, principalmente *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii* (Holanda et al., 2007).

O tratamento convencional se dá com uso de antifúngicos poliênicos, como nistatina e fármacos da classe dos azóis (Farias & Giufrida, 2002), embora sejam relatadas formas de tratamentos alternativos contra CVV, como a ação inibitória dos lactobacilos sobre o crescimento da *C. albicans* (Kingham, 1994).

O quefir é uma suspensão de microrganismos simbiotes formado por um grande número de cepas de bactérias (predominantemente ácido-lácticas - BAL) e de leveduras, ambos encapsulados em uma matriz de polissacarídeos secretados pelas primeiras. Historicamente, o quefir é originário das montanhas do Cáucaso, que segundo citações místicas seria “um presente do profeta Maomé ao seu povo, para a cura de todos os males”. Em eslavo, Kephir significa “bem-estar” (Saloff-Coste, 1998).

O presente trabalho teve como principais objetivos: isolar leveduras de pacientes que tinham apresentado ao menos um caso de CVV para então agrupá-las como

Autor correspondente: Isabela Mendes Baldim - Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS) - Alfenas/MG - Brasil - Rod. MG 179 - Km0 - CEP:37130-000 - Alfenas/MG - e-mail: baldim_mg@yahoo.com.br microrganismo@unifenas.br

C. albicans e *não-albicans*; avaliar a possível ação antimicrobiana da suspensão láctea do quefir em relação a estas cepas e, por fim, sugerir a associação do quefir a uma base não-iônica de forma a ser usada em casos de candidíase vulvovaginal.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material

Foram coletadas 44 amostras de secreção vaginal, usando *swab* estéril e tubos contendo Caldo Sabouraud Dextrose (DIFCO, USA) suplementado com 100µg. mL⁻¹ de cloranfenicol, de pacientes e enfermeiras da Clínica de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Universitário Alzira Velano – Alfenas/MG, que tiveram ao menos um episódio de candidíase vulvovaginal.

Isolamento e identificação

Do material coletado foram inoculados 10 µL em placas contendo CHROMagar- *Candida* e incubadas a 28°C por 48 a 72 horas.

Confeccionaram-se lâminas coradas pela técnica de Gram de todas as amostras, seguido da observação das mesmas em microscópio óptico, para a detecção de células características de leveduras.

A identificação das espécies foi realizada utilizando meio cromogênico CHROMagar- *Candida*, preparado e estocado de acordo com as instruções do fabricante. A leitura das placas e a interpretação dos resultados realizaram-se pela observação da morfologia e pigmentação das colônias.

As provas do tubo germinativo e da assimilação de carboidratos (sorbitol, manose, ribose, lactose, maltose, rafinose, inositol, sacarose, xilose, galactose, dulcitol e dextrose), foram realizadas de acordo com Sidrim & Moreira (1999).

Cultivo do Quefir

Os grãos de quefir foram recuperados e restabelecidos através de fermentações sucessivas pela adição de leite pasteurizado, na proporção de 1:10 e mantidos em temperatura ambiente. A cada 48 horas, o mesmo era filtrado de maneira estéril e os grãos eram novamente misturados com leite.

Sensibilidade *in vitro*

A técnica de poços foi utilizada (NCCLS, 2002). Para tanto, foram semeados em meio Sabouraud (Difco) 0,1mL de inóculos dos microrganismos, preparados em salina estéril e com culturas em fase log e turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland (10⁸ microrganismos/mL). Com um tubo de Khan, cerca de 6mm de diâmetro, foram feitos 7 poços, equidistantes entre eles e as bordas das placas, onde foram colocados a suspensão do quefir, leite fermentado (Yakult®), creme

não iônico (Tabela 1) (sem a adição de metilparabeno) com 50% da suspensão de quefir e com 50% do leite fermentado, controle positivo (Nistatina 25000 UI/g – Creme vaginal – TEUTO®) e controle negativo (base não iônica com e sem metilparabeno). As placas foram incubadas a 28°C por 48 horas, sendo as leituras do diâmetro dos halos de inibição realizadas com auxílio de um paquímetro.

Tabela 1. Composição do Creme Base Não Iônico

Componentes	Quantidade (%)
Lanette N®	15,00
Oleato de decila	3,00
Óleo Mineral	2,00
Propilenoglicol	5,00
BHT*	0,05
Água destilada	q.s.p. 100mL

*Butilhidroxitolueno

RESULTADOS

Das 44 amostras coletadas, 40,91% foram positivas para *Candida sp.* A microscopia demonstrou que em todas as pacientes havia a presença de bacilos Gram positivos, o que é esperado no canal vaginal. Nos casos positivos, havia ainda a presença maciça de células leveduriformes. Além destes, 25,00% apresentaram cocos Gram positivos, que indica contaminação, por ser o canal vaginal muito próximo ao ânus, onde estes microrganismos são predominantes (Tabela 2).

O isolamento presuntivo realizado em CHROMagar avaliou as características fenotípicas das colônias, que foram confirmadas com testes bioquímicos (Tabela 3).

Observou-se uma prevalência de 47,37% de *C. albicans*, constatando-se uma prevalência maior (52,63%) das espécies não-albicans. Denominou-se a espécie *Candida sp* aquelas não compatíveis com a identidade bioquímica.

Quanto à sensibilidade das cepas isoladas ao quefir, os dados são demonstrados na Tabela 4.

A suspensão de quefir mostrou-se mais eficaz em relação à sua associação a uma base não iônica, visto que esta é a forma de veiculação do controle positivo utilizado (Figura 1).

As cepas não-albicans apresentaram-se mais sensíveis à suspensão de quefir, mostrando também maior porcentagem de sensibilidade à associação quefir + base não iônica.

Todas as *C. albicans* foram resistentes à associação quefir + base não iônica, entretanto observou-se relativa sensibilidade à suspensão de quefir. Este fato, possivelmente, poderia ser explicado pela menor concentração do quefir em função de sua diluição com base não iônica.

A resistência à suspensão de quefir foi equivalente entre as populações.

O quefir apresentou uma eficácia de 68,48% na inibição das leveduras analisadas.

A determinação da CIM e CMM não foi possível, devido a inadequação da suspensão de quefir à metodologia padronizada pelo NCCLS (2002).

Tabela 2. Prevalência de leveduras, isoladas de candidíase vulvovaginal, nas lâminas coradas pelo método de Gram.

AMOSTRAS	GRAM
1	BGP ⁽¹⁾ ; Leveduras
2	BGP; Leveduras
3	BGP
4	BGP; Leveduras
5	BGP; Leveduras
6	BGP; Leveduras
7	BGP; Leveduras
8	BGP; Leveduras
9	BGP
10	BGP
11	BGP; CGP ⁽²⁾ ; CGN ⁽³⁾
12	BGP; CGP; CGN; Leveduras
13	BGP; CGP; Leveduras
14	BGP; CGP; BGN ⁽⁴⁾ ; Leveduras
15	BGP
16	BGP
17	BGP
18	BGP; Leveduras
19	BGP
20	BGP
21	BGP; Leveduras
22	BGP; Leveduras
23	BGP; Leveduras
24	BGP
25	BGP; CGP; Leveduras
26	BGP; CGP
27	BGP
28	BGP
29	BGP
30	BGP; CGP
31	BGP; CGP
32	BGP
33	BGP; CGP
34	BGP
35	BGP
36	BGP
37	BGP; CGP
38	BGP
39	BGP
40	BGP
41	BGP; Leveduras
42	BGP
43	BGP; CGP; Leveduras
44	BGP; Leveduras

⁽¹⁾BGP: Bacilos Gram Positivos; ⁽²⁾CGP: Cocos Gram Positivos ; ⁽³⁾CGN: Cocos Gram Negativos; ⁽⁴⁾BGN: Bacilos Gram Negativos

Tabela 3. Distribuição das amostras obtidas de acordo com a morfologia e pigmentação das colônias em CHROMagar

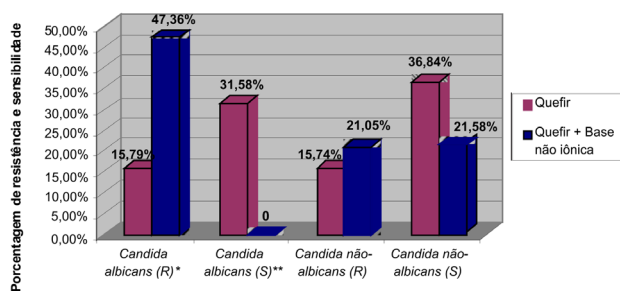
AMOSTRAS	COLÔNIAS CHROMagar	CONFIRMAÇÃO BIOQUÍMICA
1	Verdes, Lisas	<i>Candida albicans</i>
2	Branças, Lisas	<i>Candida sp</i>
3	- *	
4	Verdes, Lisas	<i>Candida albicans</i>
5	Verdes, Lisas	<i>Candida albicans</i>
6	Branças, Lisas	<i>Candida sp</i>
7	Branças, Lisas	<i>Candida sp</i>
8	Branças, Lisas	<i>Candida sp</i>
9	-	
10	-	
11	-	
12	Roxas, Lisas	<i>Candida sp</i>
13	Roxas, Lisas	<i>Candida sp</i>
14	Verdes, Lisas	<i>Candida albicans</i>
15	-	
16	-	
17	-	
18	Azuis, Rugosas Roxas, Lisas	<i>Candida sp</i>
19	-	<i>Candida sp</i>
20	-	
21	Verdes, Lisas	<i>Candida albicans</i>
22	Verdes, Lisas	<i>Candida albicans</i>
23	Roxas, Lisas	<i>Candida sp</i>
24	-	
25	Verdes, Lisas	<i>Candida albicans</i>
26	-	
27	-	
28	-	
29	-	
30	-	
31	-	
32	-	
33	-	
34	-	
35	-	
36	-	
37	-	
38	-	
39	-	
40	-	
41	Verdes, Lisas	<i>Candida albicans</i>
42	-	
43	Roxas, Lisas	<i>Candida sp</i>
44	Verdes, Lisas	<i>Candida albicans</i>
Controle positivo	Verdes	<i>Candida albicans</i>

* Ausência de crescimento

Tabela 4. Sensibilidade de cepas de *Candida*, isoladas de candidíase vulvovaginal, ao quefir.

Cepa	Controle Positivo	Controle Negativo	Quefir + Base não iônica ³	Base não iônica mais conservante ⁴	Quefir	Yakult + Base não iônica	Yakult
1. <i>C. albicans</i>	12,00 ¹	— ²	—	7,50	9,50	—	—
2. <i>Candida sp</i>	9,33	—	9,33	9,33	10,33	—	7,67
4. <i>C. albicans</i>	11,00	—	—	8,00	7,00	—	—
5. <i>C. albicans</i>	11,00	—	—	8,00	—	—	—
6. <i>Candida sp</i>	3,67	—	8,00	2,00	17,67	8,67	—
7. <i>Candida sp</i>	11,33	—	—	7,00	8,67	—	—
8. <i>Candida sp</i>	11,33	—	3,00	5,00	8,67	—	—
12. <i>Candida sp</i>	15,00	15,33	19,00	18,33	26,00	—	15,00
13. <i>Candida sp</i>	15,67	12,67	13,00	15,00	14,67	4,67	6,67
14. <i>C. albicans</i>	12,00	—	—	6,00	9,67	—	—
18 a. <i>Candida sp</i>	11,00	—	—	10,00	—	—	—
18 b. <i>Candida sp</i>	10,67	—	8,00	9,33	11,33	—	—
21. <i>C. albicans</i>	11,33	—	—	—	8,67	—	—
22. <i>C. albicans</i>	11,00	—	—	—	—	—	—
23. <i>Candida sp</i>	12,00	9,67	—	9,67	—	—	—
25. <i>C. albicans</i>	10,33	—	—	7,67	6,33	—	—
41. <i>C. albicans</i>	13,33	—	—	—	5,67	—	—
43. <i>Candida sp</i>	8,00	—	—	—	—	—	—
44. <i>C. albicans</i>	12,00	—	—	—	—	—	—

¹ Halos de inibição de crescimento (mm); ² Resistência; ³ Ver tabela 1; ⁴ Metilparabeno



*Resistente ** Sensível

Figura 1. Relação entre sensibilidade e resistência ao quefir das populações de Candida isoladas de CVV.

DISCUSSÃO

Aflora vaginal, em mulheres saudáveis ou na ausência de infecções extensas, 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 microbianas, principalmente patogênicas e constitui o principal mecanismo de defesa local (Brolazo et al., 2009). Este fato explica o achado de bacilos Gram positivos nas amostras analisadas.

Rosa & Rumel (2004), em estudo com trabalhadoras em Santa Catarina, observaram a frequência de candidíase vulvovaginal em 19,3% das amostras analisadas. A literatura relata que esta prevalência em pacientes sintomáticas encontra-se entre 25 e 37%, e em assintomáticas 10% (Ribeiro et al., 2001). Entretanto, não foram encontrados dados referentes a pacientes que apresentaram pelo menos um episódio de CVV, o que não oferece parâmetro de comparação com os resultados obtidos no presente estudo, justificando uma prevalência superior (40,91%) de isolamento.

Em um estudo conduzido por Silva et al. (2009) foram avaliadas 51 pacientes assintomáticas, das quais 26,7% apresentaram *C. albicans*, sendo *C. tropicalis* a segunda espécie mais isolada (11,1%).

Confrontando com estes resultados, o presente trabalho demonstrou uma prevalência maior das espécies não-albicans em casos de CVV, de acordo com a tabela 3.

A ação antimicrobiana do quefir é demonstrada na literatura por diversos autores. Rodrigues et al. (2005), avaliaram a suspensão de quefir em cepas padronizadas da ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Candida albicans*, verificando a efetividade do quefir na inibição do crescimento destes microrganismos.

A produção de bacteriocinas pelo quefir é um dos fatores já estudados que estão relacionados à sua ação antimicrobiana, conforme estudo realizado por Powell et al. (2007), com cepas de *Lactobacillus plantarum* isoladas do quefir.

Neste trabalho, a ação do quefir em leveduras foi de 68,42%, comprovando que além da ação já descrita na

literatura em cepas de *C. albicans*, o mesmo acontece em cepas não-albicans. Entretanto, a associação do quefir a uma base não iônica diminui seu espectro de ação para 31,58%, possivelmente pela diluição promovida pela mistura, o que torna inviável sua veiculação nesta formulação na concentração usada.

Seguindo os critérios propostos, este estudo revelou que o quefir é eficaz na inibição das leveduras analisadas, bem como em várias espécies de microrganismos analisadas. Neste caso, a suspensão mostrou-se mais eficaz em relação à sua associação com base não iônica, o que torna inviável a veiculação desta formulação na concentração testada, possivelmente pela redução da concentração do probiótico.

ABSTRACT

Test of sensitivity to kefir of Candida spp. strains isolated from vulvovaginitis

Vulvovaginal candidiasis is an inflammation of the genital mucosa that develops as a result of infection by Candida yeast species, which are normal inhabitants of the vagina. Kefir is a fermented-milk probiotic produced in the form of grains or flakes, by a symbiotic complex of microorganisms, among them several species of lactic-acid bacteria and yeasts, which live encapsulated in a matrix of polysaccharides secreted by the former. This study was conducted to isolate and identify yeasts from recurrent vulvovaginitis and test *in vitro* the action of kefir on these microorganisms. For the isolation and identification of Candida organisms, CHROMagar-Candida and biochemical confirmation were employed. Overall antimicrobial susceptibility was determined by the agar well diffusion technique. Of the 44 samples, 40.91% were positive for Candida spp., which showed a prevalence of non-albicans species (52.63%) over the species C. albicans. In the antibiogram (*in vitro* susceptibility test), there was a sensitivity of 68.42% of both populations to the suspension of kefir alone, while for kefir carried in a non-ionic cream base, the spectrum of action was reduced. It was concluded that the suspension was more effective alone than when combined with a non-ionic base, making it impractical to use this formulation.

Keywords: Probiotic. Yeasts. Genital tract infections. Antimicrobial.

REFERÊNCIAS

Bastos AMC, Bravo RS, Goulart Filho RA, Isalan TB, Barreto NA. Perfil das Mulheres com processo inflamatório por Candida em resultados de colpocitologia oncológica numa clínica de DST. DST J Bras Doenças Sex Transm. 2003;15(2):26-38.

Bauters TG, Dhont MA, Temmerman MI, Nelis HJ. Prevalence of vulvovaginal candidiasis and susceptibility to fluconazole in women. Am J Obstet Gynecol. 2002;187(3):568-74.

Brolazo EM, Simões JA, Nader MEF, Tomás MSJ, Gregoracci GB, Marconi C. Prevalência e caracterização

- de espécies de lactobacilos vaginais em mulheres em idade reprodutiva sem vulvovaginites. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2009;31(4):189-95.
- Donders GG, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Vereecken A, Van Bulck B, Spitz B. Pathogenesis of abnormal vaginal bacterial flora. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182(4):872-8.
- Farias MR, Giuffrida R. Antifúngicos. In: Andrade SF. Manual de terapêutica veterinária. São Paulo: Rocca; 2002. p. 59-70.
- Ferraza MHS, Maluf MLF, Consolaro MEL, Shinobu CS, Svidzinski TIE, Batista MR. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2005;27(2):58-63.
- Holanda AAR, Fernandes ACS, Bezerra CM, Ferreira MAF, Holanda MRR, Holanda JCP, Milan EP. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2007;29(1):3-9.
- Kinghorn GR. Candidíase Vulvovaginal. Sheffield: Royal Hallamshire Hospital; 1994. v. 1.
- NCCLS, Comitê Nacional para Padrões de Laboratórios Clínicos. Padrões de desempenho para testes de suscetibilidade antimicrobiana: padrão M2-A6. 6. ed. Wayne: NCCLS; 2002.
- Powell JE, Witthuhn RC, Todorov SD, Dicks LMT. Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *Int Dairy J.* 2007;17(3):190-8.
- Ribeiro MA, Dietze R, Paula CR, Da Matta DA, Colombo AL. Susceptibility profile of vaginal yeast isolates from Brazil. *Mycopathologia.* 2001;151(1):5-10.
- Rodrigues KL, Caputo LRG, Carvalho JCT, Evangelista J, Schneedorf JM. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *Int J Antimicrob Agents.* 2005;25(5):404-8.
- Rosa MI, Rumel D. Fatores associados à Candidíase vulvovaginal: estudo exploratório. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2004;26(1):65-70.
- Saloff-Coste CJ. Kefir. Yogurt as a calcium source. *Danone World Newsletter.* 1998:11.
- Sidrim JJC, Moreira JLB. Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica. Rio de Janeiro: Guanagara Koogan; 1999.
- Silva KR, Rodrigues SA, Filho LX, Lima AS. Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. *Appl Biochem Biotechnol.* 2009;152(2):315-25.

Recebido em 10 de novembro de 2011.

Aceito para publicação em 13 de abril de 2012.

