



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

Isabela Mendes Baldim<sup>1\*</sup>; Maria Aparecida Pereira<sup>1</sup>; Luciana Rosa Alves Rufino<sup>2</sup>; Nelma de Mello Silva Oliveira<sup>2</sup>; João Evangelista Fiorini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas, MG, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório 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 frequente, respondendo por 80 a 90% dos casos. Entretanto, tem-se observado um aumento na frequência 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-láticas - 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<sup>-1</sup> 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 (10<sup>8</sup> 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 <sup>(1)</sup> ; 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 <sup>(2)</sup> ; CGN <sup>(3)</sup>
12	BGP; CGP; CGN; Leveduras
13	BGP; CGP; Leveduras
14	BGP; CGP; BGN <sup>(4)</sup> ; 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

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

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

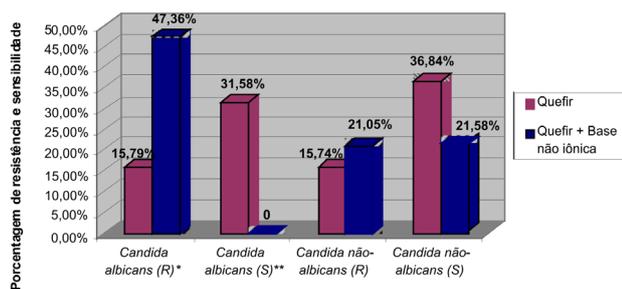
AMOSTRAS	COLÔNIAS CHROMagar	CONFIRMAÇÃO BIOQUÍMICA
1	Verdes, Lisas	<i>Candida albicans</i>
2	Branças, Lisas	<i>Candida sp</i>
3	- *	
4	Verdes, Lisas	<i>Candida albicans</i>
5	Verdes, Lisas	<i>Candida albicans</i>
6	Branças, Lisas	<i>Candida sp</i>
7	Branças, Lisas	<i>Candida sp</i>
8	Branças, Lisas	<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 <sup>3</sup>	Base não iônica mais conservante <sup>4</sup>	Quefir	Yakult + Base não iônica	Yakult
1. <i>C. albicans</i>	12,00 <sup>1</sup>	— <sup>2</sup>	—	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	—	—	—	—	—	—

<sup>1</sup> Halos de inibição de crescimento (mm); <sup>2</sup> Resistência; <sup>3</sup> Ver tabela 1; <sup>4</sup> 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 MSH, 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.

