

RUIZ, FRANCISCO O
Efecto terapeutico d



2013

72651

72651

NF..
Ciasif: T. 806

1988

1988



72651



Universidad Nacional de Río Cuarto

Facultad de Ciencias Exactas, Físico - Químicas y Naturales

Departamento de Microbiología e Inmunología

“Efecto terapéutico de las bacteriocinas producidas
por las cepas de
Lactobacillus fermentum y *Lactobacillus rhamnosus*
sobre microorganismos causales
de infecciones genitales”

Tesis Doctoral

Universidad Nacional de Río Cuarto

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

Departamento de Microbiología e Inmunología

Área Bacteriología

“Efecto terapéutico de las bacteriocinas producidas
por las cepas de
Lactobacillus fermentum y *Lactobacillus rhamnosus*
sobre microorganismos causales de infecciones genitales”

Tesis Doctoral para optar al título de
Doctor en Ciencias Biológicas

Mic. Francisco O. Ruíz

Tesista

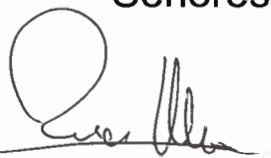
Dra. I. Lucila, Barberis

Director

Dra. Liliana M., Pascual

Co-director

Señores Miembros del Tribunal Evaluador:



Dra. Ines Albesa



Dr. Blas Micalizzi

Dr. Mario Philipp

Río Cuarto, 8 de marzo de 2013.

AGRADECIMIENTOS

Al igual que ocurre en distintas situaciones de nuestras vidas donde se llega al final de una etapa, se conjugan una variedad de sensaciones que vuelven escasas las palabras para explicarlo. La culminación de mi Carrera Doctoral representa hoy, un largo camino por una montaña de desafíos que fue imposible transitar sin el amor, afecto y colaboración incondicional de innumerables personas. Agradecer es un acto humano de humildad que reconoce en los demás el apoyo y solidaridad diaria, y nos hace ver que no estamos tan solos como puede parecernos.

En primer lugar quiero agradecer a mis Directores de Tesis, *Dra. Lucila Barberis* y *Dra. Liliana Pascual*, con quienes compartí mis logros, alegrías y reveses durante todos estos años hasta alcanzar mi doctorado. Gracias por transmitirme sus conocimientos y experiencias académicas que son parte fundamental de mi actual formación. No puedo dejar de reconocer “el estar” permanente y ayuda incondicional para mi crecimiento científico-profesional, lo cual permitió no sólo la concreción de este importante proyecto, sino además descubrir dos maravillosas personas imposibles de olvidar. Asimismo, deseo hacer extensivo el agradecimiento a la *Dra. Cristina Pájaro*, que me acompañó durante mis primeros pasos en esta travesía y al *Dr. Walter Giordano*, quién ha colaborado en numerosas oportunidades con esta carrera de posgrado.

Un especial Muchas Gracias debo decirles a mis padres, Esther Ruíz, María Rosa y Oscar Benavidez, porque en este gran esfuerzo siempre estuvieron a mi lado siguiendo todos mis progresos y obstáculos, alentándome a seguir en cada nuevo emprendimiento. Si hoy he conseguido tan distinguido Título, también ha sido por el amor y los valores de esfuerzo y perseverancia que aprendí desde mi niñez. A los demás miembros de mi familia y amigos de la infancia, Mayra y Mariela, que aún a la distancia, estuvieron continuamente a mi lado, colaborando de distintas maneras para facilitarme la carga.

Otra de las sorprendentes personas que forman parte de mi vida diaria, el Sr. *M.Vet. Claudio Boaglio*, quién me brindó desinteresadamente un gran apoyo durante toda mi carrera universitaria de grado y posgrado, un compañero al que también le debo mucho de mis logros académicos y personales, gracias por tu invaluable presencia. Dios quiera pueda alguna vez retribuirte...

A mis eternas compañeras, Doctoras Carla Barberis, Carina Casero y Vanesa Zachetti, después de tantos días compartiendo escuchas, risas y consuelos, cuando las dificultades cotidianas se volvían cada vez más pesadas en este camino hacia la cima. No puedo dejar de agradecer a los demás amigos y compañeros de laboratorio, Gise, Paula, Jose, al resto de los amigos becarios, investigadores, profesores y personal técnico con quienes compartí diariamente durante años....

Finalmente, agradezco a los Señores miembros del Jurado, Doctores Ines Albesa, Blas Micalizzi y Mario Philipp, que con excelente predisposición me brindaron sus recomendaciones y sugerencias durante este posgrado.

Porque nunca alcanza el tiempo, el papel o la memoria para mencionar y dar los créditos y reconocimientos con justicia, a todos quienes han sido parte de mis días en este Doctorado...

Muchísimas gracias !!!!

A mi mamá

“Para que tu vivir en un mundo de silencios,
se convierta en un nuevo revivir
de música y sonidos”

F.O.R.

En este trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de dos cepas de lactobacilos denominadas *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 aisladas del tracto genital femenino sobre microorganismos patógenos como *Neisseria gonorrhoeae* y *Streptococcus agalactiae*. Ambas especies de lactobacilos fueron identificadas por pruebas bioquímicas, sistema API 50CH y por análisis molecular del ADNr 16S. Se demostró que estas cepas producen una gran variedad de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, entre ellos se destaca la producción de bacteriocinas, las cuales han sido detectadas, caracterizadas y purificadas. Otros metabolitos sintetizados por estas dos bacterias ácido lácticas son los ácidos orgánicos y además el H_2O_2 producido por *L. rhamnosus*. En el presente trabajo de tesis se realizaron los estudios *in vitro* de las actividades antimicrobianas de las cepas de lactobacilos probióticas como así también, de las sustancias antimicrobianas sintetizadas por cada lactobacilo sobre los microorganismos patógenos estudiados. Se demostró que estos metabolitos biológicamente activos presentes en los sobrenadantes de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 sobre 31 cepas de *N. gonorrhoeae* produjeron una inhibición del crecimiento del 100% de estas cepas. Todas las cepas de *N. gonorrhoeae* fueron sensibles a cada una de las bacteriocinas producidas por las cepas de lactobacilos L23 y L60 con halos promedios de inhibición del crecimiento de 15,8 mm y 15 mm respectivamente. Entre el 80-87% de la inhibición de los gonococos correspondió a la acción de las bacteriocinas de ambos lactobacilos. En los ensayos de interacción entre las bacteriocinas se observó que el 100% de las cepas de *N. gonorrhoeae* ensayadas presentaron una actividad sinérgica mediante el ensayo de pozos próximos. Cuando se determinó la CIM de las bacteriocinas producidas por ambas cepas lácticas, se obtuvieron resultados relevantes ya que aun diluidas estas sustancias presentaron una muy buena actividad inhibitoria sobre los gonococos ensayados. En el estudio de la actividad antimicrobiana de los lactobacilos sobre las 57 cepas de *S. agalactiae*, mediante la técnica de estrías cruzadas, se halló que el 100% de las mismas fueron susceptibles a las sustancias inhibitorias producidas y secretadas por estos lactobacilos. Sin embargo, cuando se evaluó la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas L23 y L60 sobre las cepas de estreptococos, se observó que el 91% (52 cepas) de las mismas fueron inhibidas por ambas bacteriocinas, sin mostrar diferencias estadísticas significativas entre estos metabolitos. Al evaluar la CIM de la bacteriocina L23 y L60 mediante la técnica de microdilución en placa se observó que ambas sustancias fueron activas a concentraciones bajas con valores de CIM entre 80 y 160 UA/ml, respectivamente. En el estudio cualitativo de las interacciones de las bacteriocinas L23 y L60 se observó interacción sinérgica en el 100% de las cepas sensibles de *S. agalactiae*, no se encontraron otras interacciones como antagonismo e indiferencia entre las bacteriocinas. Este último resultado, fue luego corroborado mediante dos técnicas, de difusión en pozo y del tablero de ajedrez. En el primer caso los resultados mostraron un 100% de sinergismo de potenciación sobre *S. agalactiae* ($p < 0,05$). En la técnica del tablero de ajedrez, se confirmó el efecto antimicrobiano sinérgico producido por la combinación de las bacteriocinas L23 y L60 con un valor de concentración inhibitoria fraccionaria (CIF) de 0,13 - 0,84, indicando una interacción sinérgica entre ambas sustancias. En este estudio mediante estas técnicas no se observaron interacciones de sinergismo aditivo, antagonismo o indiferencia entre los metabolitos de ambas cepas de lactobacilos. Las bacteriocinas L23 y L60 no presentaron actividad hemolítica sobre las especies de eritrocitos estudiadas. Con respecto a los ensayos *in vivo* no se observaron en la microbiota vaginal de los ratones BALB/c presencia de lactobacilos ni de SGB. En este trabajo de tesis se logró la colonización vaginal de *S. agalactiae*, con valores de \log_{10} entre 5 a (t_1) y 2,08 a (t_8) de bacterias viables/ml de secreción vaginal en el período en que se realizó el ensayo. En las experiencias de colonización vaginal de las cepas de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60, se demostró que ambos fueron capaces de permanecer y colonizar por 8 días la vagina de los ratones, con valores de \log_{10} superiores a 2 ($p < 0,01$), durante el tiempo en que se realizó la experiencia. En el estudio del efecto preventivo de *L. fermentum* L23, *L. rhamnosus* L60, y de una mezcla de L23+L60 sobre *S. agalactiae* en ratones hembras BALB/c, una única dosis de estos lactobacilos fue necesaria para eliminar a SGB del tracto vaginal del modelo animal ($p < 0,05$), (96 h, 120 h, 72 h, respectivamente). En las experiencias de efecto curativo de cada lactobacilo y de la mezcla de L23+L60 sobre SGB en ratones BALB/c, se observó que

la mezcla de lactobacilos resultó más efectiva en comparación con cada cepa de lactobacilo, permaneciendo con un valor logarítmico de 3,10 al final de la experiencia (t_8). De esta manera, se demostró el efecto potencial antimicrobiano que poseen las cepas de lactobacilos L23 y L60, aún siendo inoculadas posteriormente, para desplazar el estreptococo del nicho vaginal. Al estudiar la concentración adecuada de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 necesaria para eliminar a *S. agalactiae* de la vagina de ratones BALB/c se probaron 4 concentraciones diferentes (10^9 , 10^8 , 10^6 y 10^4 UFC/ml) de cada una de las bacterias ácido lácticas en distintos grupos de animales. El efecto curativo realizado con cada lactobacilo empleando concentraciones altas (10^9), medias (10^8) y moderadamente bajas (10^6), demostró la eliminación del SGB de la vagina de los ratones, en 48 h para las concentraciones más altas y en 120 h para las moderadamente bajas. A la concentración 10^4 UFC/ml, las cepas de lactobacilos no eliminaron a *S. agalactiae*. Este trabajo de tesis demostró la efectividad de estas dos cepas de lactobacilos probióticas probadas en los ensayos *in vitro*, correlacionado con los ensayos *in vivo*, aportando resultados relevantes ya que con una única inoculación se logró eliminar al microorganismo patógeno del modelo animal, mostrando además, un sinergismo de potenciación cuando se administraron de manera conjunta, hallazgos no descritos en la bibliografía entre dos cepas productoras de bacteriocinas.

In this work it was tested the antimicrobial activity of two lactobacilli strains, *L. fermentum* L23 and *L. rhamnosus* L60, isolated from the feminine genital tract for pathogen microorganisms, such as *Neisseria gonorrhoeae* and *Streptococcus agalactiae*. Both lactobacilli species were identified by biochemical tests, API 50CH system, and by the sequencing of rDNA 16S. It was shown that each of these strains produce a large variety of secondary metabolites, among those two bacteriocins, both of them have been detected, characterized and purified. Moreover, other metabolites synthesized by these two lactic acid bacteria were organic acid, and H_2O_2 , only produced by *L. rhamnosus*. In this PhD research paper, in vitro studies of both the antimicrobial activities of probiotic lactobacilli strains, and of each antimicrobial substance synthesized by them, for the pathogenic microorganisms isolated were conducted. Hence, the results showed that the biological metabolites contained in the free-cell supernatant of *L. fermentum* L23 and *L. rhamnosus* L60 inhibited to 100% of 31 *N. gonorrhoeae* strains tested. All gonococci strains were susceptible to each bacteriocin produced by the lactobacilli L23 and L60, showing values of inhibition zones of the bacterial growth of 15.8 and 15 mm, respectively. Between 80-87% of the gonococci inhibition were produced by the bacteriocins of both lactobacilli. In the interaction tests between bacteriocins it could be observed that 100% of the *N. gonorrhoeae* strains that were previously tested presented synergistic activity through the two-well test. When the bacteriocins's CIM was determined, the results were significant since these substances, when diluted, showed considerable inhibitory activity for all the gonococci studied. In the study of antimicrobial activity of the lactobacilli on 57 *S. agalactiae* strains, through the streak test, it was found that 100% of them were susceptible to the inhibitory substances produced and secreted by the lactobacilli strains. However, when the antimicrobial activity of each bacteriocin L23 y L60 on the growth of streptococci strains was tested, 91% of them (52 strains) were inhibited by both bacteriocins, without showing any statistically significant difference between these metabolites. By means of the microdilution test in plate, it was determined that the CIM of both the L23 and L60 bacteriocins, were active in low concentrations, ranging between 80-160 AU ml⁻¹ in CIM values, respectively. On a qualitative study, the interaction between the L23 and L60 bacteriocins showed synergistic interaction in 100% of all the susceptible *S. agalactiae* strains tested, while other interactions, such as antagonism or indifference, were not found. This last result was additionally corroborated by two other quantitative techniques, the well-diffusion test and the checkerboard test. In the first case, 100% of the incremented synergism on the *S. agalactiae* growth was found ($p < 0.05$). Furthermore, the antimicrobial synergistic effect produced by the bacteriocins together, L23 and L60, on the SGB growth was confirmed by the checkerboard test, and showed FIC values ranging from 0.13-0.84, which is corresponding to synergistic interaction. By these techniques neither of the following interactions by addition, antagonism and indifference between the bacteriocins from both lactobacilli strains were found. The L23 and L60 bacteriocins did not show hemolytic activity on the erythrocytes studied. In relation to the *in vivo* trials, neither lactobacilli nor GBS in the vaginal microbiota of the studied BALB/c mice were found. In this work, the vaginal colonization of *S. agalactiae* was achieved, with log₁₀ values between 5 at (t_1) to 2.08 at (t_8) of viable bacteria per ml of vaginal fluid, during the time of the experiment. In the *L. fermentum* L23 and *L. rhamnosus* L60 trials of vaginal colonization, it was proven that both strains were able to remain and colonize in the vagina for 8 days, with log₁₀ values bigger than 2 ($p < 0.01$). On the study of preventive effects of *L. fermentum* L23, *L. rhamnosus* L60, and then, with a combination of L23+L60 together, for *S. agalactiae* in BALB/c mice, an only dose of these lactobacilli was necessary to eliminate the GBS of the murine vaginal tract ($p < 0.05$), to 96, 120 and 72 h, respectively. The curative effect produced by each lactobacilli strains and the combination of both on *S. agalactiae* in the BALB/c model, showed that the mix of both L23+L60 was more effective than each lactobacilli strain separately, remaining with a log₁₀ value of 3.10 at the end of that experience (t_8). Thus, it was shown that the antimicrobial potential effects found in the lactobacilli strains, L23 and L60, even when they were inoculated later, were capable of displacing the streptococci from the vaginal tract. In order to find the appropriate concentration of *L. fermentum* L23 and *L. rhamnosus* L60 necessary to eliminate to *S. agalactiae* from the vaginal tract, 4 different concentrations (10^9 , 10^8 , 10^6 , and 10^4 CFU ml⁻¹) of each lactobacilli strain were tested in different animal groups.

After using different concentrations of each lactobacilli - high (10^9), middle (10^8) and moderately low (10^6) - the curative effect was demonstrated since the GBS from the vaginal tract was eliminated, at 48 h for the highest concentration and at 120 h for the moderately low concentrations. When 10^4 CFU ml⁻¹ concentrations were employed, the lactobacilli strains did not eliminate the *S. agalactiae*. As a conclusion, the results obtained in all these experiments show the efficiency of these two probiotic lactobacilli strains not only tested through *in vitro* trials, but afterwards correlated through *in vivo* experiments, providing relevant results since only one inoculation was sufficient to eliminate the pathogenic microorganism from the animal model, and when the lactobacilli were administered together a potentiated synergism was observed. These promising findings have not yet been described in the literature about two bacteriocin-producing strains.

ÍNDICE DE CONTENIDOS	Pág
INTRODUCCIÓN	I
1. Tracto genital femenino.....	1
1.1. Composición de la secreción vaginal.....	1
2. Ecosistema vaginal y microorganismos protectores.....	2
2.1. Factores que influyen el balance de la microbiota vaginal.....	3
2.2. Mecanismos protectores de lactobacilos en el tracto genitourinario	4
3. Evolución del concepto probiótico, definición y microorganismos reconocidos.....	11
3.1. Efectos benéficos en la salud por el uso de probióticos.....	13
3.2. Bacteriocinas, síntesis, clasificación y modo de acción.....	20
3.3. Modo de acción de bacteriocinas de bacterias Gram positivas.....	25
3.4. Bioensayos para bacteriocinas, interacciones antimicrobianas.....	28
3.5. Actividad hemolítica de las bacteriocinas.....	30
4. Las herramientas moleculares en microbiología como complemento para filogenia.....	31
4.1. Estructura del gen ARNr 16S.....	32
4.2. Metodología para la identificación bacteriana mediante la secuenciación del ADNr/ARNr 16S.....	33
5. Filogenia molecular, métodos de análisis para la elaboración del árbol filogénico.....	34
5.1. Aplicaciones de la secuenciación de genes conservados para la identificación y evaluación de las relaciones filogenéticas bacterianas....	35
6. Enfermedades de transmisión sexual. Infecciones genitourinarias.....	36
6.1. Infecciones por <i>Neisseria gonorrhoeae</i>.....	37
6.2. Mecanismo de patogenia.....	39
7. Infecciones por <i>Streptococcus agalactiae</i>.....	40
7.1. Estado actual de las infecciones por <i>Streptococcus agalactiae</i>.....	42
7.1.2. Infección en mujeres embarazadas.....	42
7.1.3. Infección en el recién nacido.....	44
8. Resistencia antibiótica en <i>Streptococcus agalactiae</i>.....	47
9. Resistencia antimicrobiana de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>.....	48

10. Terapias biológicas para el control de procesos infecciosos.....	50
10.1. Regulación y categorización de probióticos como agentes bioterapéuticos.....	52
11. Modelo animal.....	53
HIPÓTESIS	II
Hipótesis.....	55
OBJETIVOS	III
Objetivo general.....	56
Objetivos específicos.....	57
MATERIALES Y MÉTODOS	IV
Ensayos <i>In Vitro</i>	IV
1. Pacientes femeninos, obtención de muestras y aislamiento de cepas bacterianas.....	58
2. Identificación por pruebas bioquímicas de bacterias patógenas del tracto genital.....	58
3. Conservación de las cepas bacterianas.....	60
4. Susceptibilidad antibiótica de los microorganismos patógenos.....	60
5. Actividad antimicrobiana de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre <i>Streptococcus agalactiae</i>.....	61
6. Actividad inhibitoria de los sobrenadantes libres de células de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre las cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> y <i>Streptococcus agalactiae</i>.....	61
6.1. Obtención de los sobrenadantes libres de células (SLCs).....	61
6.2. Inhibición del crecimiento bacteriano de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> y <i>Streptococcus agalactiae</i> por acción de las sustancias antimicrobianas producidas por las cepas de lactobacilos.....	62
6.2.1. Inhibición del crecimiento bacteriano de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> por acción de las bacteriocinas	

producidas por ambos lactobacilos y el peróxido de hidrógeno...	62
6.2.2. Inhibición del crecimiento bacteriano de <i>Streptococcus agalactiae</i> por acción de las bacteriocinas producidas por los lactobacilos y el peróxido de hidrógeno.....	62
7. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de las bacteriocinas de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre las cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> y <i>Streptococcus agalactiae</i>	63
8. Ensayo cualitativo de interacción de las bacteriocinas de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre cepas <i>Neisseria gonorrhoeae</i> y <i>Streptococcus agalactiae</i>	64
9. Ensayos de interacción de las bacteriocinas de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i>	64
10. Estudio de la actividad hemolítica de los sobrenadantes libres de células sobre glóbulos rojos.....	67
10.1. Preparación de la suspensión de glóbulos rojos humanos (GRH) y de carnero (GRC).....	67
10.2. Obtención del sobrenadante libre de células (SLC).....	67
10.3. Ensayo de hemólisis.....	67
11. Estudios genotípicos sobre cepas de <i>S. agalactiae</i>	68
11.1. Aislamiento de ADN genómico.....	68
11.2. Secuenciación del gen <i>ARNr 16S</i>	68
11.3. Análisis filogenético.....	69
Ensayos <i>In Vivo</i>	IV
12. Modelo animal.....	70
12.1. Microorganismos con características benéficas.....	70
12.2. Bacterias patógenas.....	70
12.3. Estudio de la microbiota vaginal de ratones BALB/c.....	70
13. Estudio de la colonización vaginal de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 en ratones BALB/c.....	71
14. Estudio de colonización vaginal de <i>Streptococcus agalactiae</i> en ratones BALB/c.....	71

15. Efecto preventivo de la administración vaginal de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre <i>Streptococcus agalactiae</i> en ratones BALB/c.....	72
16. Estudio del efecto curativo de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre <i>Streptococcus agalactiae</i> en vagina de ratones BALB/c.....	73
17. Efecto preventivo de la inoculación conjunta de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre la colonización de <i>Streptococcus agalactiae</i> en vagina de ratones BALB/c.....	74
18. Efecto curativo de una mezcla de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre la colonización de <i>Streptococcus agalactiae</i> en vagina de ratones BALB/c.....	75
19. Ensayos para determinar la dosis efectiva <i>in vivo</i> de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre <i>Streptococcus agalactiae</i>	75
19.1. Modelo animal y protocolo de experimentación.....	75
19.2. Cepas de lactobacilos.....	75
19.3. Bacterias patógenas.....	75
19.4. Valoración de la dosis efectiva de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre <i>Streptococcus agalactiae</i> en vagina de ratones BALB/c.....	76
20. Análisis estadístico.....	77
 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	V
Ensayos <i>In Vitro</i>	V
1. Antecedentes de las cepas de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 con características bacteriocinogénicas y antimicrobianas	78
2. Aislamiento y caracterización bioquímica de cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	80
2.1. Resistencia antibiótica de las cepas gonocócicas.....	81
3. Aislamiento y caracterización bioquímica de las cepas de	81

<i>Streptococcus agalactiae</i>	
3.1. Resistencia antibiótica de las cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i>	83
4. Actividad inhibitoria de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas producidos por <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> sobre <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	83
5. Concentración inhibitoria mínima de las bacteriocinas producidas por <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> sobre <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	90
6. Estudio de interacción entre las bacteriocinas L23 y L60 sobre <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	95
7. Actividad antimicrobiana de las cepas <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 y de las bacteriocinas L23 y L60 sobre <i>Streptococcus agalactiae</i>	97
8. Estudio de las interacciones entre las bacteriocinas L23 y L60 de <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> sobre <i>Streptococcus agalactiae</i>	101
8.1. Técnica de pozos próximos para la interacción de bacteriocinas.....	101
8.2. Técnica de interacción de bacteriocinas por pozo único.....	102
9. Concentración inhibitoria mínima (CIM) de las bacteriocinas L23 y L60 producidas por <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> sobre <i>Streptococcus agalactiae</i>	106
10. Estudio de las interacciones entre las bacteriocinas L23 y L60 mediante la técnica del tablero de ajedrez.....	108
11. Análisis de la secuencia del gen <i>ARNr 16S</i>	109
11.1. Análisis filogenético molecular.....	110
12. Estudio de la actividad hemolítica de las diferentes sustancias activas de los SLCs de <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	113
Ensayos <i>In Vivo</i>	V
13. Microbiota vaginal de los animales de experimentación.....	122
14. Colonización vaginal de las bacterias ácidos lácticas, <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 en ratones	

BALB/c.....	122
14.1 Colonización vaginal de <i>Streptococcus agalactiae</i> en ratones BALB/c.....	125
15. Efecto preventivo de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 y de una mezcla de L23+L60 sobre <i>Streptococcus agalactiae</i> en ratones hembras BALB/c.....	126
16. Efecto curativo de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 y de la mezcla de L23+L60 sobre <i>Streptococcus agalactiae</i> en vagina de ratones hembras BALB/c.....	130
17. Ensayos de diferentes concentraciones de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre <i>Streptococcus agalactiae</i> en la vagina de ratones BALB/c.....	134
17.1. Ensayo de efecto curativo de <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> sobre <i>Streptococcus agalactiae</i> a una concentración inicial 10^9 UFC/ml de cada cepa de lactobacilo.....	135
17.2. Efecto curativo de las dos cepas de lactobacilos sobre <i>Streptococcus agalactiae</i> a una concentración de 10^8 UFC/ml.....	138
17.3. Ensayo curativo de las cepas de lactobacilos sobre <i>Streptococcus agalactiae</i> a una concentración de 10^6 y 10^4 UFC/ml.....	141
 CONCLUSIÓN	 VI
Conclusiones.....	153
Conclusión Final.....	154
PERSPECTIVAS FUTURAS	VII
Perspectivas Futuras.....	155
BIBLIOGRAFÍA	VIII
ANEXO	IX

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág

Figura 1.	Órganos y áreas de colonización microbiana en el tracto genital femenino	1
Figura 2.	Mecanismos antimicrobianos de lactobacilos para restaurar la microbiota	10
Figura 3.	Nuevo esquema de clasificación de bacteriocinas de bacterias Gram positivas	22
Figura 4.	Mecanismos de formación de poro para péptidos antimicrobianos	27
Figura 5.	Operón ribosómico (rrn)	32
Figura 6.	Etapas en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S	34
Figura 7.	Mecanismo de patogénesis en <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	40
Figura 8.	Esquema de la determinación de la CIM las bacteriocinas L23 y L60	64
Figura 9.	Diagrama de las diluciones de las bacteriocinas L23 y L60 por la técnica de tablero de ajedrez	66
Figura 10.	Porcentajes de las interacciones entre las bacteriocinas sintetizadas por <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60	79
Figura 11.	Efecto inhibitorio producido por los sobrenadantes libres de células de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 sobre el desarrollo microbiano de distintas cepas gonocócicas (A, B)	85
Figura 12.	Efecto inhibitorio de los sobrenadantes libres de células de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre el desarrollo microbiano de distintas cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (A, B)	87
Figura 13.	Valor porcentual de la actividad inhibitoria de los ácidos orgánicos y la bacteriocina L23 de <i>Lactobacillus fermentum</i> sobre cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	89
Figura 14.	Valores porcentuales de la acción de los ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y la bacteriocina L60 de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> sobre la inhibición del crecimiento de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	90

Figura 15. CIM de la bacteriocina de <i>Lactobacillus fermentum</i> sobre <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	90
Figura 16. CIM de la bacteriocina L23 de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 sobre diferentes cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (A, B, C)	92
Figura 17. CIM de la bacteriocina L60 de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> sobre <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	93
Figura 18. CIM de la bacteriocina L60 producida por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> sobre cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (A, B)	95
Figura 19. Interacción sinérgica entre las bacteriocinas L23 y L60 sobre el desarrollo microbiano diferentes cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (A, B)	96
Figura 20 A. Actividad antimicrobiana producida por <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 sobre diferentes cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i> (a, b, c)	97
Figura 20 B. Actividad antimicrobiana producida por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre <i>Streptococcus agalactiae</i> (a, b, c, d)	98
Figura 21. Efecto inhibitorio de las bacteriocinas L23, L60 sobre el desarrollo microbiano de cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i> (A, B)	101
Figura 22. Efecto sinérgico entre las bacteriocinas L23 y L60 inhibiendo el desarrollo bacteriano de diferentes cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i> (A, B, C)	102
Figura 23. Inhibición del desarrollo microbiano de <i>Streptococcus agalactiae</i> producido por efecto del sinergismo de potenciación de las bacteriocinas L23 y L60 mediante la técnica de difusión en pozo único	103
Figura 24. Actividad inhibitoria de las bacteriocinas L23, L60 y de una mezcla de ambas sobre el crecimiento de <i>Streptococcus agalactiae</i>	106
Figura 25. CIM de las bacteriocinas L23 y L60 sobre diferentes cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i>	107
Figura 26. Concentración inhibitoria fraccionaria de la combinación de bacteriocinas sobre una cepa de <i>Streptococcus agalactiae</i>	109
Figura 27. Dendograma de las relaciones entre cepas de	

	<i>Streptococcus agalactiae</i> sensibles a bacteriocinas y otras cepas de la Familia <i>Streptococcaceae</i> de diversos orígenes	111
Figura 28.	Curva de regresión lineal para los datos de hemólisis total de GRH	114
Figura 29.	Curva de regresión lineal para los datos de hemólisis total de GRC	115
Figura 30.	Porcentaje de actividad hemolítica de las distintas fracciones sobre GRH	117
Figura 31.	Porcentaje de actividad hemolítica de las distintas fracciones sobre GRC	117
Figura 32.	Porcentaje de actividad hemolítica de las bacteriocinas, ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno en GRH	119
Figura 33.	Porcentaje de actividad hemolítica de las bacteriocinas, ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno en GRC	120
Figura 34.	Colonización de la cepa <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 en la vagina de ratones BALB/c	124
Figura 35.	Colonización de la cepa <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 en la vagina de ratones BALB/c	124
Figura 36.	Colonización de la cepa <i>Streptococcus agalactiae</i> en la vagina de ratones BALB/c	126
Figura 37.	Efecto preventivo de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 sobre <i>Streptococcus agalactiae</i> en la vagina de ratones BALB/c	127
Figura 38.	Efecto preventivo de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre <i>Streptococcus agalactiae</i> en la vagina de ratones BALB/c	128
Figura 39.	Efecto preventivo de la mezcla de lactobacilos L23+L60 sobre SGB en vagina de ratones BALB/c	129
Figura 40.	Efecto curativo de la cepa <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 sobre <i>Streptococcus agalactiae</i> en el modelo animal	131
Figura 41.	Efecto curativo de la cepa <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre <i>Streptococcus agalactiae</i> en ratones hembras	132
Figura 42.	Efecto curativo de la mezcla de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 + <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 (vol/vol) sobre <i>Streptococcus agalactiae</i> en vagina de ratones BALB/c	133
Figura 43.	Colonización de <i>Streptococcus agalactiae</i> en vagina de ratones	

	BALB/c	135
Figura 44.	Efecto curativo de <i>Lactobacillus fermentum</i> con concentración inicial del orden 10^9 UFC/ml sobre la colonización de <i>Streptococcus agalactiae</i> en vagina de ratones BALB/c	137
Figura 45.	Efecto curativo de la administración vaginal de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> en una concentración inicial del orden 10^9 UFC/ml sobre la colonización de <i>Streptococcus agalactiae</i> en ratones BALB/c	137
Figura 46.	Efecto curativo de <i>Lactobacillus fermentum</i> con concentración inicial del orden 10^8 UFC/ml sobre la colonización de <i>Streptococcus agalactiae</i> en vagina de ratones BALB/c	140
Figura 47.	Efecto curativo de la administración vaginal de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> a una concentración inicial del orden 10^8 UFC/ml sobre la colonización de <i>Streptococcus agalactiae</i> en ratones BALB/c	140
Figura 48.	Efecto curativo de <i>Lactobacillus fermentum</i> con concentración inicial del orden 10^6 UFC/ml sobre la colonización de <i>Streptococcus agalactiae</i> en vagina de ratones BALB/c	142
Figura 49.	Efecto curativo de la administración vaginal de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> en una concentración inicial del orden 10^6 UFC/ml sobre la colonización de <i>Streptococcus agalactiae</i> en ratones BALB/c	143
Figura 50.	Efecto de <i>Lactobacillus fermentum</i> a una concentración inicial de 10^4 UFC/ml sobre la colonización de <i>Streptococcus agalactiae</i> en vagina de ratones BALB/c	144
Figura 51.	Inoculación vaginal de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> a una concentración inicial del orden 10^4 UFC/ml sobre la colonización de <i>Streptococcus agalactiae</i> en ratones BALB/c	144
Figura 52.	Valor curativo de las concentraciones 10^9 UFC/ml (A) y 10^8 UFC/ml (B) de las cepas de lactobacilos sobre la población de <i>Streptococcus agalactiae</i> en la vagina de los ratones BALB/c	147
Figura 53.	Valoración de la concentración 10^6 UFC/ml de ambos lactobacilos	

	sobre <i>Streptococcus agalactiae</i> en la vagina de los ratones BALB/c	148
Figura 54.	Valoración de la concentración 10^4 UFC/ml de ambos lactobacilos sobre la colonización de <i>Streptococcus agalactiae</i> en la vagina de los ratones BALB/c	149
Figura 55.	Persistencia de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 en el modelo murino de infección vaginal en las concentraciones 10^9 (A) y 10^8 (B) UFC/ml	150
Figura 56.	Comportamiento de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 colonizando la vagina del modelo murino en la concentración del orden 10^6 UFC/ml	151
Figura 57.	Comportamiento de <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> inoculados en concentraciones del orden 10^4 UFC/ml en la vagina del modelo murino	151

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Microorganismos reconocidos como probióticos	12
Tabla 2. Actividad inhibitoria de <i>L. fermentum</i> L23 y <i>L. rhamnosus</i> L60 sobre el crecimiento bacteriano de distintos patógenos genitourinarios	78
Tabla 3. Interacciones entre las bacteriocinas de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60	80
Tabla 4. Pruebas bioquímicas para la identificación de especies de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	81
Tabla 5. Características bioquímicas para la diferenciación e identificación de <i>Streptococcus agalactiae</i>	82
Tabla 6. Actividad antimicrobiana de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas producidas por <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> sobre <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	86
Tabla 7. Porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano correspondientes a cada sustancia antimicrobiana producida por <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	88
Tabla 8. Concentración inhibitoria mínima de la bacteriocina de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 sobre gonococos	91
Tabla 9. Concentración inhibitoria mínima de la bacteriocina de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre gonococos	94
Tabla 10. Actividad antimicrobiana de <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> sobre <i>S. agalactiae</i>	99
Tabla 11. Valor promedio de los halos de inhibición del crecimiento de <i>Streptococcus agalactiae</i> por la acción de las bacteriocinas L23, L60 y de una mezcla de ambas	104
Tabla 12. Valores de absorbancia para la realización de la curva de hemólisis total	113
Tabla 13. Porcentaje de hemólisis de las distintas fracciones de los sobrenadantes libre de células tratados de <i>L. fermentum</i> L23 y <i>L. rhamnosus</i> L60	116

Tabla 14. Valores promedios de los recuentos de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 en la vagina de ratones BALB/c	123
Tabla 15. Valores promedios de los recuentos de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 en la vagina de ratones BALB/c	123
Tabla 16. Media de los recuentos de <i>Streptococcus agalactiae</i> y su expresión logarítmica en la vagina de ratones BALB/c	125
Tabla 17. Promedio de los recuentos de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y de <i>Streptococcus agalactiae</i> en la vagina de ratones BALB/c	127
Tabla 18. Recuentos promedios de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 y de <i>Streptococcus agalactiae</i> en la vagina de ratones BALB/c en la experiencia de prevención	128
Tabla 19. Valores promedios de los recuentos de la mezcla L23+L60 y <i>Streptococcus agalactiae</i> en vagina de ratones BALB/c en la experiencia de prevención	129
Tabla 20. Recuento de <i>Streptococcus agalactiae</i> y <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 en la experiencia de efecto curativo	130
Tabla 21. Valores promedios de la experiencia de efecto curativo de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre <i>Streptococcus agalactiae</i>	132
Tabla 22. Valores promedios de los recuentos de <i>Streptococcus agalactiae</i> y mezcla de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 + <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 (vol/vol) recuperados de vagina de ratones BALB/c	133
Tabla 23. Valores medios de la colonización de <i>Streptococcus agalactiae</i> en la vagina de ratones BALB/c	135
Tabla 24. Promedio de los recuentos de <i>Streptococcus agalactiae</i> y <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 a una concentración de 10^9 UFC/ml en la vagina de ratones BALB/c	136
Tabla 25. Promedio de los recuentos de <i>Streptococcus agalactiae</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 a una concentración de 10^9 UFC/ml en la vagina de ratones BALB/c	136
Tabla 26. Recuentos promedios de <i>Streptococcus agalactiae</i> y <i>L. fermentum</i> L23 a una concentración de 10^8 UFC/ml recuperados de vagina de ratones BALB/c	139

Tabla 27. Media de los recuentos bacterianos de <i>Streptococcus agalactiae</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 a una concentración de 10^8 UFC/ml aislados de la vagina de los ratones BALB/c	139
Tabla 28. Valores medios de los recuentos de <i>Streptococcus agalactiae</i> y <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 a una concentración de 10^6 UFC/ml aislados en la vagina de los ratones BALB/c	141
Tabla 29. Promedio de los recuentos y valores de logaritmos decimales de <i>Streptococcus agalactiae</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 a una concentración de 10^6 UFC/ml en la vagina de ratones BALB/c	142
Tabla 30. Recuentos medios de <i>Streptococcus agalactiae</i> y <i>Lactobacillus fermentum</i> a una concentración de 10^4 UFC/ml y valores de logaritmo decimal recuperados de la vagina de los ratones BALB/c	145
Tabla 31. Promedios de los recuentos de <i>Streptococcus agalactiae</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 a una concentración de 10^4 UFC/ml aislados de la vagina del modelo murino utilizado	145

LISTA DE ABREVIACIONES

Abrev.

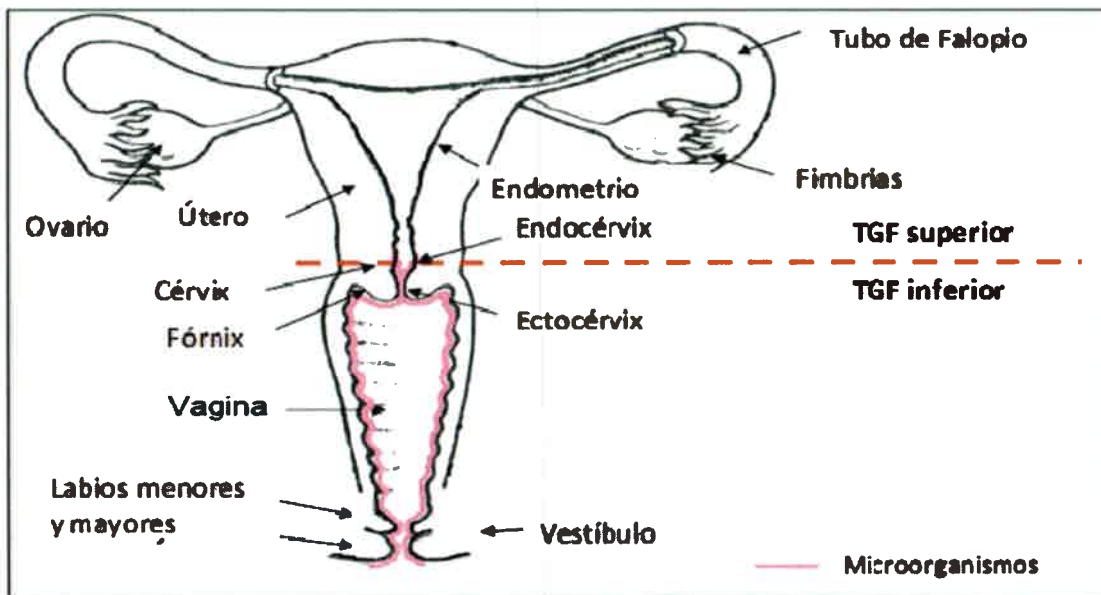
TGF	Tracto genital femenino
MUC	Mucinas
VB	Vaginosis bacteriana
VVC	Vulvovaginitis candidiásica
ETS	Enfermedad de transmisión sexual
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
UFC	Unidad formadora de colonia
PSE	Proteína de superficie externa
ALT	Ácido lipoteicoico
ECUP	<i>Escherichia coli</i> uropatógena
NF- κ B	Factor nuclear kappa beta
TLR	Receptores tipo Toll
FAO	Organización de Agricultura y Alimentos
OMS	Organización Mundial de la Salud
DAA	Diarreas asociadas a antibióticos
CN	Colitis necrotizante
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
ECN	Enterocolitis necrotizante
CU	Colitis ulcerosa
HSB	Hidrolasa de sales biliares
NK	Células natural killer
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
Ne	Neutrófilos
ITUr	Infecciones del tracto urinario recurrentes
MDG	Diabetes mellitus gestacional
EPI	Enfermedad pélvica inflamatoria
SAMR	<i>S. aureus</i> metilino resistentes
VISA	<i>S. aureus</i> con resistencia intermedia a vancomicina
KDa	Kilo dalton
FPM	Fuerza protón motriz
ATP	Adenosin trifosfato
NADH	Nicotidamina Adenina Dinucleótido reducido
man-PTS	Sistema manosa fosfotransferasa
LPS	Lipopolisacárido
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CIF	Concentración fraccionaria mínima
ADNr	Acido desorribonucleico ribosomal
ARNr	Acido ribonucleico ribosomal
ARNP	Enzima ARN polimerasa
UTO	Unidad taxonómica operacional
ITS	Infección de transmisión sexual
SNVS	Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud
ENO	Enfermedad de notificación obligatoria
PMN	Células polimorfonucleares
TNF	Factor de necrosis tumoral
NG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
SGB	<i>Streptococcus agalactiae</i>
CDC	Centro de Control y Prevención de Enfermedades
RNv	Recién nacidos vivos
MLS _B	Fenotipos de resistencia macrólido-lincosamida-estreptogramina B
CEE	Cefalosporinas de espectro extendido

CRO	Ceftriaxona
CFM	Cefixima
PBV	Producto bioterapéutico vivo
CAA	Código Alimentario Argentino
ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
TLC	Cromatografía en capa delgada
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
SLCs	Sobrenadante libre de células
SLCN	Sobrenadante libre de célula neutralizado
SLCNP	Sobrenadante libre de célula neutralizado y tratado con peroxidasa
L23	Bacteriocina L23
L60	Bacteriocina L60
CTS	Caldo tripteína soya
MRS+A	MRS caldo + agar adicionado
UA/ml	Unidades de actividad de bacteriocinas por mililitro
TTC	2,3,5 trifenil tetrazolio
TM	Thayer Martin agar
PBS	Buffer fosfato de sodio
rpm	Revoluciones por minuto
nm	Nanómetros
ACC	Agar cerebro corazón
EBM	Agar eosina-azul de metileno
ASC	Agar sangre de carnero
v/v	Volumen en volumen
LSD	Test de la menor diferencia significativa
log ₁₀	Logaritmo decimal
ANOVA	Análisis de la varianza
GRH	Glóbulo rojo humano
GRC	Globulo rojo carnero
SDS	Sodio duodecil sulfato
SCN	Estafilococo coagulasa negativo
Th1	Células T helper 1
Th2	Células T helper 2

Introducción

1. Tracto genital femenino

El tracto genital femenino (TGF) se divide anatómicamente en genitales internos, localizados en la cavidad pélvica y formados por los ovarios, tubos uterinos o trompas de Falopio, útero y vagina; y genitales externos o vulva. Asimismo, los genitales internos se pueden subdividir en tres compartimentos: el tracto genital bajo (vagina y ectocérvix), el endocérvix y el tracto genital superior (endometrio y trompas de Falopio) (Cole, 2006). En la figura 1 se observa una línea imaginaria que subdivide a los órganos que conforman el TGF.



Nikolaitchouk, 2009

Figura 1. Órganos y áreas de colonización microbiana en el tracto genital femenino. Referencia. TGF: Tracto Genital Femenino

La vagina es un tubo de 8-10 cm de longitud, formada por una delgada pared fibromuscular, que se extiende desde el vestíbulo hasta el cérvix, ubicada entre la vejiga y el recto. La vagina y el cérvix forman un complejo y dinámico ecosistema constituido por la microbiota, secreciones epiteliales y los factores de la inmunidad innata que dependerán de los niveles de hormonas esteroidales presentes. La cavidad del cérvix o canal cervical forma una conexión entre la vagina y la cavidad uterina (Stevens y Lowe, 2005, Nikolaitchouk, 2009).

1.1. Composición de la secreción vaginal

La superficie vaginal se mantiene humedecida por el fluido que exuda a través del epitelio vaginal, moco cervical y en menor medida del endometrio, tubos uterinos y glándulas

vestibulares. La secreción vaginal es una mezcla de diferentes componentes, incluyendo células exfoliadas del epitelio vaginal, componentes antimicrobianos del sistema inmune, leucocitos, iones sodio, calcio y cloro (Na^+ , Ca^{2+} , Cl^-), proteínas, péptidos, glucoproteínas, ácido láctico, ácido acético, glicerol, urea y glucógeno, los cuales varían en su concentración de acuerdo a factores como: niveles de estrógenos/progesterona, estimulación sexual y a la presencia de ciertos microorganismos (microbiocenosis) (Llewellyn-Jones y col., 2004, Cole, 2006, Nikolaitchouk, 2009).

El moco cervical es el principal componente de la secreción vaginal y está constituido por agua (92-98%), glicoproteínas (mucinas), iones, proteínas antimicrobianas y polipéptidos tales como lactoferrina, lisozima, inmunoglobulinas y defensinas. Entre ellos, las mucinas MUC5B, MUC5A, MUC6 y MUC16 y MUC1 son algunos ejemplos presentes en la secreción endocervical que forman una estructura polimérica tipo gel, cuya viscosidad se encuentra influenciada por las hormonas durante el ciclo menstrual. Esta secreción vaginal tiene por función la de impedir la adherencia de microorganismos patógenos a la superficie de la mucosa (Wiggins y col, 2001, Andersch-Bjorkman y col., 2007).

2. Ecosistema vaginal y microorganismos protectores

La vagina humana esta colonizada por una comunidad diversa de microorganismos que constituyen la microbiota vaginal, la cual tiene profundo impacto en la salud de las mujeres y niños recién nacidos (Li y col., 2012). El ecosistema vaginal alberga una microbiota lactobacilar que protege contra la invasión de microorganismos patógenos incluyendo aquellos que causan infecciones urinarias, vaginosis bacteriana (VB), vulvovaginosis candidiásica (VVC), enfermedades de transmisión sexual (ETS) bacterianas, parasitarias e incluidas aquellas producidas por VIH (Falagas y col, 2006, Torok y col., 2007, Baeten y col., 2009, Reid y col, 2009).

Los lactobacilos son parte de la microbiota habitual saludable de la vagina desde la menarca hasta la menopausia. Los estudios más representativos se realizan sobre mujeres en edad reproductiva dado que las recién nacidas y las mujeres posmenopáusicas presentan variaciones en su biota normal. Estos microorganismos son dominantes en este hábitat, en una concentración aproximada entre 10^7 y 10^8 UFC/g de fluido vaginal en mujeres premenopáusicas sanas y su predominancia está en relación a factores endógenos y exógenos del huésped (Witkin y col., 2007, Pascual y col., 2008b, Gustafsson y col., 2011).

Los miembros del género *Lactobacillus* son bacilos Gram positivos no esporulados, pueden ser anaerobios facultativos o anaerobios estrictos, poseen morfología variada (células largas, delgadas, bacilos cortos, cocobacilos tipo corineformes), algunas cepas muestran cuerpos bipolares y granulaciones internas. Desde el punto de vista metabólico

presentan requerimientos nutricionales para su crecimiento, son sacarolíticos obligados y producen varios ácidos orgánicos, entre ellos ácido láctico, raramente reducen el nitrógeno, son catalasa, citocromo y gelatinasa negativos, no producen indol ni ácido sulfhídrico, generalmente no presentan movilidad. Raramente producen pigmentos, son acidúricos y el rango de pH óptimo para su desarrollo es entre 5,5 y 6,2 (Claesson y col. 2007, 2008, Bergey, 2009a, O'Sullivan y col., 2009, Kleerebezem y col., 2010). En los humanos además de su presencia en la vagina, forman parte de la microbiota de la boca y tracto digestivo. En general, los lactobacilos no han sido asociados con enfermedades en individuos inmunocompetentes y por más de 100 años han sido considerados como miembros no patógenos de los tractos que colonizan (Reid y col., 2001, 2003, Martin y col., 2008). Entre los lactobacilos más frecuentemente aislados del tracto genital femenino, encontramos a los del complejo *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. amylophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. johnsoni*, *L. iners* y *L. gallinarum*) junto a otros como *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. brevis*, *L. jensenii*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. vaginalis*, *L. salivarius* (Anukam y col., 2005, Zou y col., 2007, Barrons y Tassone, 2008, Cribby y col., 2008, Martin y col., 2008, Lamont y col., 2011). Hoy se encuentran casi todas las especies de lactobacilos, presentes como miembros de la biota, en la mayoría de las mujeres sanas, aunque las diferentes especies y la combinación entre ellas varían a través del tiempo (Diminitova y col., 2008, Oakley y col., 2008, Zhou y col., 2010).

2.1. Factores que influyen en el balance de la microbiota vaginal

El tracto genitourinario femenino (vagina, uretra, periuuretra, cérvix) es un lugar potencialmente propicio para el desarrollo de muchas especies bacterianas patógenas (Reid y col., 2006). Por ello, el balance entre el mantenimiento de un estado saludable y la emergencia de una infección genitourinaria está controlada por la presencia y la acción protectora de los lactobacilos (Pascual y col., 2008b, Ravel y col., 2011, Ma y col., 2012). Aún así, dicha estabilidad también puede estar sujeta a los cambios que se producen en ese medio y a las condiciones fisiológicas del huésped. Por ejemplo, en las mujeres adultas premenopáusicas, una serie de factores endógenos y exógenos tales como: cambios en las estructuras epiteliales de la vagina de acuerdo a la edad, menstruación, desequilibrios hormonales, duchas vaginales, uso de anticonceptivos, medicación vaginal, diferente número de parejas sexuales, elevada frecuencia de relaciones sexuales y el empleo de diferentes métodos de protección vaginal durante el ciclo menstrual, son algunas causas responsables de desequilibrios en la microbiota vaginal (Farage y Maibach, 2006, Brotman y col., 2008, Nikolaitchouk, 2009, Brotman y col., 2010).

El comportamiento de la biota vaginal en las mujeres sexualmente activas está influenciado por varios mecanismos de regulación. Dentro de dicho ecosistema dinámico,

podríamos mencionar entre los más importantes al proceso de acidogénesis. Distintas especies de *Lactobacillus* metabólicamente homofermentativas o heterofermentativas, producen ácido láctico como metabolito final a partir de la glucosa-6-fosfato del glucógeno (única fuente de carbono), liberado de la citólisis y posterior descamación de las células intermedias. De esta manera el pH normal de las mujeres sexualmente activas en edad reproductiva oscila entre 3,5-4,5 restringiendo la microbiota a especies ácido tolerantes como lo son los lactobacilos (Wilson y col., 2005, Guaschino y col., 2008, Martín y col., 2008, Tibaldi y col., 2009). En algunos estudios del nicho vaginal se vio que en las secreciones de mujeres sanas predominaba el ácido láctico, mientras que en las infectadas predominaban compuestos orgánicos volátiles y otros ácidos como succínico, butírico, acético, provenientes del metabolismo de bacterias anaerobias, *Gardnerella vaginalis* y otros microorganismos (Martínez y col., 2008, Srinivasan y col., 2010, Lamont y col., 2011, Thorn and Greenman, 2012). Además, la regulación hormonal por acción de la relación estrógeno/progesterona favorece el incremento de *Lactobacillus* spp. y el descenso de los microorganismos anaerobios (Farage y Maibach 2006, Galhardo y col., 2006, Wilson y col., 2007, Farage y col., 2010).

2.2. Mecanismos protectores de lactobacilos en el tracto genitourinario

Los lactobacilos pueden interferir con los microorganismos patógenos por diferentes mecanismos. Uno de ellos es la exclusión competitiva, por medio de la cual los lactobacilos pueden proteger el tracto genital compitiendo con los microorganismos patógenos por los receptores celulares del huésped. Así la adherencia de los lactobacilos a los receptores de los epitelios inhibe la unión de los microorganismos patógenos por exclusión, en algunos casos mediante obstrucción estérica o directamente bloqueando los sitios de unión de los receptores (Chen y col., 2005, Pascual y Barberis, 2011). Por ejemplo, en cultivo celular se ha visto cómo diferentes especies de lactobacilos aislados del tracto vaginal excluyen la adherencia de microorganismos patógenos como *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* de las células del epitelio (Atassi y col., 2006, Zárate y Nader Macías, 2006, Pascual y col., 2008b). En algunos trabajos se comprobó que cuando los lactobacilos tienen mayor afinidad por los receptores celulares que los microorganismos patógenos, ellos desplazan a estos últimos ya adheridos, siendo esta capacidad de utilidad potencial para el tratamiento de infecciones vaginales utilizando determinados lactobacilos (Mastromarino y col., 2002, Spurbeck y Arvidson, 2008). En esta propiedad benéfica, presente en algunas especies del género *Lactobacillus*, intervienen un conjunto de estructuras bacterianas conocidas genéricamente con el nombre de adhesinas (fimbrias, pili, material extracelular o slime, etc). Sin embargo aún no está claro, qué factores de los lactobacilos son utilizados para excluir o desplazar a los microorganismos patógenos del

epitelio vaginal del huésped. Existen varios estudios sobre los factores de adherencia de lactobacilos intestinales describiendo estructuras tipo proteicas como las proteínas de superficie externa (PSE) de la pared celular, componentes de carbohidratos y/o de ácido lipoteicoico (ALT) entre sus adhesinas, pero son escasas las investigaciones para dilucidar cuales son los factores de adherencia de lactobacilos vaginales que intervienen en estos mecanismos. Uno de los trabajos al respecto es el de Boris y col., (1998), donde se demostró *in vitro* que la adherencia de *L. acidophilus* y *L. gasseri* en cultivo celular, involucraba a proteínas y carbohidratos, posiblemente una glicoproteína, mientras que en el caso de *L. jensenii* dependía solamente de carbohidratos y de cationes bivalentes como el calcio (Ca^{+2}). En cambio los receptores de las células vaginales de los cultivos eran glucolípidos, de esta manera se puede observar la gran heterogeneidad de las estructuras que interactúan entre ambas células.

En segundo lugar, los lactobacilos pueden proteger el tracto urogenital de infecciones con microorganismos patógenos mediante un mecanismo conocido como coagregación, en el cual ellos secuestran las bacterias uropatógenas impidiendo su adhesión al epitelio del huésped. De esta manera, los microorganismos patógenos serían más fácilmente removidos por acción del flujo vaginal y/o directamente eliminados por los productos antimicrobianos secretados por los lactobacilos (Pascual, 2004, Spurbeck y Arvidson, 2011). El primer trabajo que postuló este mecanismo fue realizado por Reid y colaboradores en 1988, quienes probando una cepa de *L. rhamnosus* GR-1 observaron que coagregaba fuertemente especies de *E. coli* uropatógenas (ECUP), lo cual aumentaría su habilidad para inhibir a estos microorganismos patógenos. Luego se sucedieron algunos estudios sobre propiedades benéficas de cepas de lactobacilos con potencial probiótico, donde se consideró la coagregación como otro factor importante para el mantenimiento de un nicho vaginal saludable (Collado y col., 2007, Pascual y col., 2008b, Ekmekci y col., 2009, Kotikalapudi, 2009). Esta propiedad co-agregativa en asociación a sustancias antimicrobianas liberadas por los lactobacilos sobre los microorganismo patógenos, conduce a la muerte directa de los mismos, previniendo infecciones genitourinarias y constituyendo así, un mecanismo relevante de defensa para el huésped (Mastromarino y col., 2002, Taheri, 2009, Pascual y Barberis, 2011).

La inhibición directa de microorganismos patógenos por medio de compuestos antimicrobianos sintetizados por lactobacilos es uno de los mecanismos más estudiados. Los principales metabolitos sintetizados por miembros del género *Lactobacillus* son: ácidos orgánicos, principalmente el ácido láctico; peróxido de hidrógeno (H_2O_2); bacteriocinas y biosurfactantes; que resultarían antagónicos con el desarrollo de los microorganismos patógenos (Lepargneur y Rousseau, 2002, Collado y col., 2005, Pascual y col., 2006, Leeber y col., 2008, Reid y col., 2009, Ruíz y col., 2009, Daniele y col., 2011, Pascual y

Barberis, 2011). El bajo pH del tracto vaginal es uno de los principales mecanismos de prevención de la colonización de microorganismos patógenos. La mezcla de ácidos orgánicos producidos por los lactobacilos genera un microambiente vaginal suficientemente ácido que inhibe el desarrollo de microorganismos sensibles. Las especies de lactobacilos vaginales homofermentadoras producen ácido láctico, mientras las heterofermentadoras sintetizan entre sus metabolitos cantidades equimolares de ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico, etanol y anhídrido carbónico (CO₂). El ácido láctico como principal producto entre los ácidos orgánicos, además de contribuir con la disminución del pH vaginal, también permeabiliza las membranas bacterianas aumentando la actividad antimicrobiana de esta sustancia y la de otros compuestos inhibitorios que pueden actuar sinérgicamente para prevenir el desarrollo de microorganismos patógenos (Alakomi y col., 2000, Lebeer y col., 2008). Si bien, es conocido el efecto antimicrobiano producido por el ácido láctico, el modo de acción de este producto microbiano aún no ha sido completamente dilucidado. Algunos trabajos han sugerido que la difusión del ácido hacia el citoplasma bacteriano y su disociación genera una acumulación de aniones en el interior celular que reduce la síntesis de macromoléculas y afecta el transporte de sustancias hacia la membrana y por ello se produce la inhibición sobre los microorganismos patógenos (Ouwehand y Vesterlund, 2004). Un estudio reciente sobre el efecto antimicrobiano del sobrenadante de cultivo de una cepa de *L. rhamnosus* GG demostró que la fuerte inhibición sobre cepas de *Salmonella typhimurium* se debió a una gran acumulación citoplasmática de ácido láctico (De Keersmaecker y col., 2006). Asimismo en el trabajo realizado por Cadieux y colaboradores (2009) utilizando los sobrenadantes de cultivo de *L. rhamnosus* GR-1 y *L. reuteri* RC-14 sobre cepas de *E. coli* uropatógenas (ECUP) se halló que el ácido láctico produjo no sólo la inhibición del desarrollo microbiano de las bacterias uropatógenas, sino también afectó la expresión de factores de virulencia tales como fimbrias tipo 1 y P necesarias para la adhesión de que estos microorganismos al epitelio del huésped.

La producción de H₂O₂ por algunas especies de lactobacilos es considerado un mecanismo antimicrobiano importante en la vagina de mujeres sanas ya que inhibe el desarrollo de microorganismos patógenos (Servin, 2004, Pascual y col., 2006, Martínez y col., 2008). En presencia de oxígeno (O₂), especies de lactobacilos son capaces de producir H₂O₂ a través de enzimas como: oxidasas conteniendo flavoproteínas, oxidasas de NADH y superóxido dismutasa. El efecto inhibitorio del H₂O₂ sobre el desarrollo microbiano se debe al fuerte poder oxidativo sobre los grupos sulfhídricos de proteínas y lípidos de las membranas impidiendo el transporte de nutrientes como así también, inhibiendo la actividad de enzimas que contienen azufre (hexoquinasas, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasas) que afectarían procesos esenciales del metabolismo de los microorganismos (Ouwehand y Vesterlund, 2004, Antikainen y col., 2007). Otras especies reactivas del O₂, oxígeno

singlete, radicales superóxidos y oxidrilos también son sintetizadas originando daños irreversibles similares al H_2O_2 sobre las membranas, enzimas y ADN de los microorganismos patógenos (Martinez y col., 2008, Dalié y col., 2010). En algunos estudios desarrollados en distintos grupos de mujeres, la presencia de lactobacilos productores de H_2O_2 se ha correlacionado con un menor riesgo de vaginosis bacteriana (VB), partos prematuros, corioaminionitis, y de adquirir infecciones por microorganismos patógenos de transmisión sexual, tales como *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* y VIH (Wilks y col., 2004, Knezević y col., 2005, Atassi y col., 2006, Kim y col., 2006, Mijac y col., 2006).

Las bacteriocinas son sustancias activas sintetizadas por las bacterias Gram positivas, con un núcleo de naturaleza peptídica o proteica, espectro variable de actividad antimicrobiana, cuyo mecanismo de acción interfiere con las estructuras y/o biosíntesis de componentes celulares, formando poros que permeabilizan las membranas de la bacteria blanco (Asaduzzaman y Sonomoto, 2009). Los microorganismos productores de bacteriocinas regulan su biosíntesis censando cambios poblaciones de microorganismos en los nichos ecológicos que comparten y así aseguran su posición competitiva. Por ejemplo, *L. acidophilus* La-5 es una cepa productora de bacteriocina que aumenta su síntesis mediante un mecanismo de autoinducción que involucra la secreción de un péptido censor que registra cambios en los microorganismos del medio. Todas las bacterias productoras de bacteriocinas llevan un gen de autoinmunidad. En un trabajo reciente, se ha demostrado cómo una cepa de *L. sakei* productora de bacteriocina sintetiza proteínas de autoinmunidad para proteger al microorganismo productor de la acción antimicrobiana de su propia bacteriocina (Tabasco y col., 2009, Kjos y col., 2010). Existen algunos estudios que sugieren a las bacteriocinas y/o a los microorganismos productores de estas sustancias como fuertes candidatos para la restauración de la homeostasis (Corr y col., 2007, Ruíz y col., 2009, Reid y col., 2010).

Otros mecanismos de inhibición de microorganismos patógenos producidos por lactobacilos en el tracto vaginal son: la producción de biosurfactantes y mucinas, la inmunomodulación, los efectos de señalización y modulación de uniones intercelulares (Reid y col., 2010). Los biosurfactantes son moléculas anfipáticas, con dominios hidrofóbicos e hidrofílicos y de una variada naturaleza química, entre ellos: proteínas, carbohidratos, glucoproteínas, glucolípidos, lipopéptidos, fosfolípidos, ácidos grasos y lípidos neutros. Estas sustancias son utilizadas por los microorganismos como emulsificadores de membranas, reguladores de la producción de biofilm y de mecanismos de adhesión y desplazamiento de patógenos (Singh y col., 2004, Rodrigues y col., 2006). Así, los biosurfactantes exhiben una amplia actividad inhibitoria sobre bacterias, hongos y virus (Gudiña y col., 2010 a,b). Hasta el momento se conocen más de 15 especies de lactobacilos que producen biosurfactantes activos, algunos de ellos secretados al medio, mientras otros

son asociados con las superficies bacterianas (Mukherjee y col., 2006, Fracchia y col., 2010, Gudiña y col., 2011). Por ejemplo, Spurbeck y col., 2010 utilizaron un extracto de componentes asociados a la superficie de una cepa de referencia, *L. jensenii* ATCC 25258, y demostraron en cultivo celular que poseía actividad biosurfactante, la cual inhibió la adhesión de *N. gonorrhoeae* a células epiteliales. En otros estudios *in vitro* evaluando el efecto del biosurfactante surlactina, producido por *L. fermentum* RC-14 sobre bacterias uropatógenas, se observó una marcada inhibición de la adhesión de *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* y *S. epidermidis* a superficies inertes tales como tapones de siliconas y vidrio. Walencka y col., 2008 estudiaron el efecto de un biosurfactante producido por *L. acidophilus* sobre el biofilm de cepas de *S. aureus* y demostraron una fuerte reducción de la formación de estas biopelículas, siendo un hallazgo significativo (Spurbeck y Arvidson, 2011).

El tracto vaginal está recubierto por una capa mucosa que sirve de barrera contra la colonización de microorganismos patógenos. El principal componente del moco cervical, la mucina, es una glucoproteína que forma una red de tipo gel que recubre las células epiteliales de la mucosa y contiene moléculas como: lactoferrina, lisozima e inmunoglobulinas cuya acción antibacteriana es inespecífica. Esta matriz si se mantiene íntegra es difícil de penetrar por los microorganismos (Wiggins y col., 2001, Juárez Tomas y Nader Macías, 2007, Amit y col., 2009, Spurbeck y Arvidson 2011). Domino y col., 2009 demostraron en un ensayo experimental de candidiasis vaginal que la presencia de lactobacilos indujo una mayor producción de la matriz glucoproteica inhibiendo la adherencia de *C. albicans* a las células epiteliales.

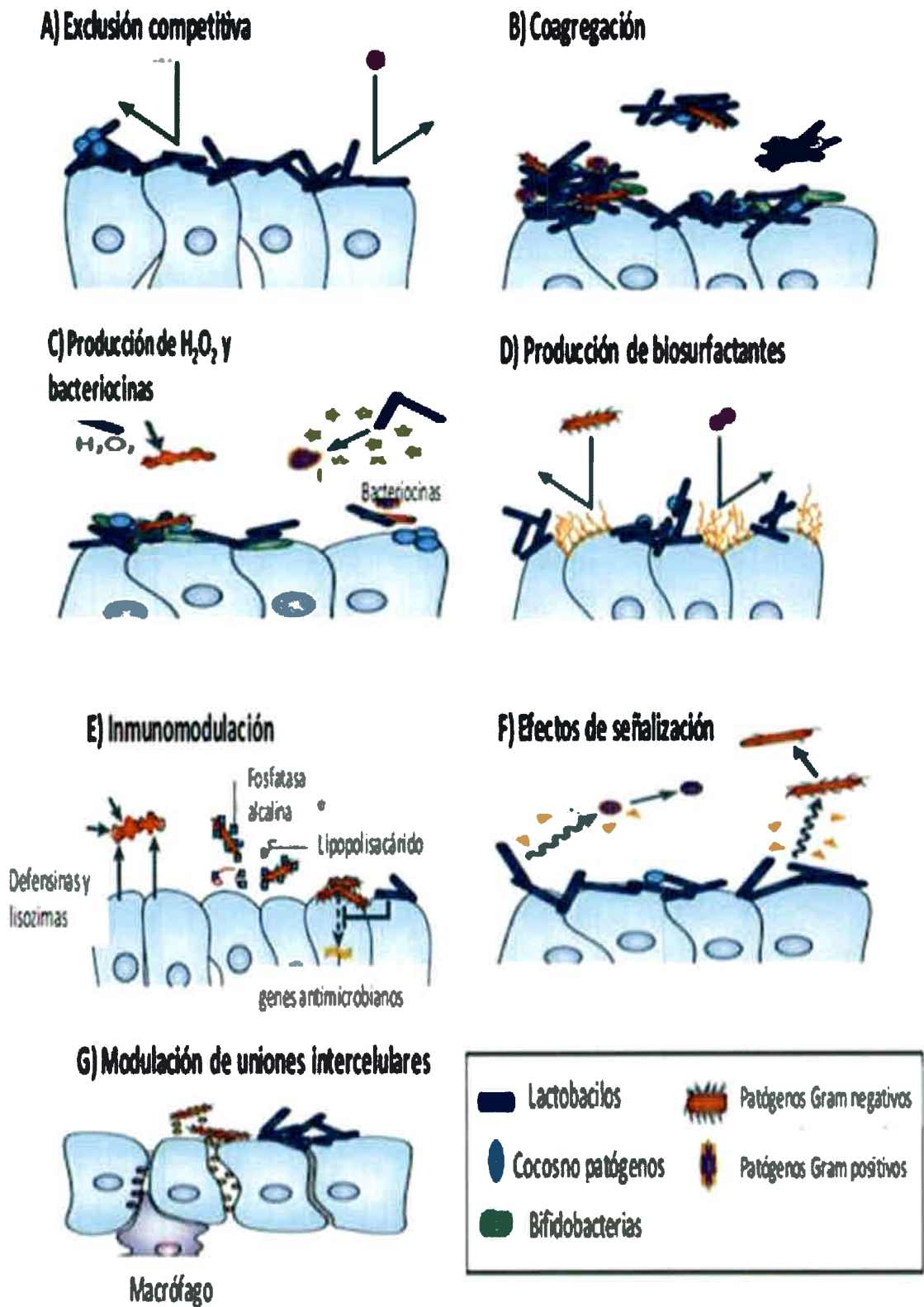
De manera similar, en el tracto gastrointestinal se ha visto cómo la adherencia de lactobacilos en dichos epitelios incrementa de 2-3 veces la producción de mucinas y disminuye la adherencia de bacterias enteropatógenas (Mattar y col., 2002, Mack y col., 2003, Kim y col., 2008).

El sistema inmune del huésped debe adecuar correctamente las respuestas hacia los microorganismos patógenos y a su vez, diferenciar entre las bacterias indígenas y las exógenas no patógenas. Para ello, los patrones de reconocimiento que median la detección de antígenos bacterianos, activan cascadas de señalización internas e intercelulares que regulan la respuesta inmune innata y adaptativa (Wells, 2011). La inmunoregulación por lactobacilos puede resultar en la producción de factores del huésped tales como: péptidos antimicrobianos (defensinas), lactoferrinas y lisozimas, los cuales pueden inhibir a los microorganismos patógenos; la producción de fosfatasa alcalina que se une al lipopolisacárido e impide su toxicidad y la desregulación de la señalización intracelular dependiente del factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) en el epitelio del huésped. En este último caso,

ciertas proteínas regulan la interacción entre la microbiota y el huésped reprimiendo genes dependientes del factor nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), los cuales codifican para péptidos antimicrobianos y así logran mantener la homeostasis. En la actualidad se sabe que existe un efecto de señalización entre lactobacilos indígenas y microorganismos patógenos, en el cual ocurre una desregulación de la producción de toxinas por estos últimos. Esto ilustra el hecho de que la regulación inmune está controlada por los microorganismos y apunta a los patógenos mientras ayuda a reemerger a las bacterias indígenas (Pamer, 2007, Ryu y col., 2008, Reid y col., 2010). En un estudio reciente utilizando un modelo *in vitro* de epitelio vaginal y distintas cepas de lactobacilos vaginales se demostró una disminución de citoquinas proinflamatorias mediante la activación de las vías de señalización de receptores tipo Toll (TLR), en comparación a la inducción producida por microorganismos de infecciones genitales y en ausencia de lactobacilos. De esta manera se promueve un efecto preventivo de los lactobacilos frente a las infecciones del tracto vaginal (Rose y col., 2012).

La integridad del epitelio de la boca, el intestino y la vagina es crucial para mantenimiento de la salud del huésped. Cuando se produce la disrupción de esta capa, los microorganismos que colonizaron estas superficies, ganan acceso a los tejidos y la sangre propiciando algunas enfermedades. La activación de las proteínas de uniones intercelulares estrechas por los lactobacilos, ayuda a limitar el daño causado directamente por acción de microorganismos patógenos o en los procesos inflamatorios. El daño en los epitelios conduce a la ruptura de las uniones intercelulares e induce a la respuesta inmune, permitiendo la llegada de polimorfonucleares, los cuales intensificarán el daño local. De esta manera los lactobacilos que recubren las superficies epiteliales mantienen intactas las uniones estrechas. Por ejemplo, se ha propuesto en ensayos *in vitro* de infecciones por HIV que determinadas especies de lactobacilos podrían impedir la penetración del virus en las células del huésped, mediante la regulación de la síntesis de proteínas de unión intercelulares de oclusión, denominadas ZO-1 y ocludinas (Iqbal y col, 2009, Reid y col., 2010). La figura 2 muestra diferentes mecanismos que llevan a cabo los lactobacilos para inhibir a microorganismos patógenos.

Aunque los lactobacilos pueden utilizar diferentes mecanismos para inhibir la colonización de microorganismos patógenos en la vagina, es necesario señalar que esa capacidad antimicrobiana es específica de especie y/o de cepa, ya que no todas las cepas de una especie de lactobacilo tienen el mismo potencial inhibitorio. Asimismo, estos mecanismos de antibiosis de lactobacilos actúan junto a factores del huésped tales como: continuo recambio de la capa externa del epitelio escamoso, síntesis de péptidos antimicrobianos derivados de las células epiteliales y de inmunoglobulinas, para proteger al huésped de las infecciones (Wilson y col., 2005, Spurbeck y Arvidson, 2011).



Reid, 2010

Figura 2. Mecanismos antimicrobianos de lactobacilos para restaurar la microbiota.

3. Evolución del concepto probiótico, definición y microorganismos reconocidos

La dieta consumida hace un millón de años por nuestros antecesores contenía un 50% menos de proteínas, un 75% menos de grasas saturadas y un 90% menos de sodio. El hombre del Paleolítico consumía entre 4 y 10 veces más vitaminas y antioxidantes. Pero la más llamativa diferencia entre nuestros ancestros es que en su dieta, ingerían diariamente más de 10^9 bacterias beneficiosas para la salud, entre ellas diferentes especies de *Lactobacillus*. Este aporte de microorganismo para la salud era debido a que los alimentos vegetales eran almacenados durante mucho tiempo y estos fermentaban (fermentación láctica) (Leach, 2007, Reid y col., 2008). En cambio hoy, mientras el consumo de alimentos vegetales fermentados se reduce a pocos países, el consumo de alimentos lácteos fermentados aumenta considerablemente, siendo históricamente los países del este de Europa los mayores consumidores mundiales, promovidos por los beneficios en la salud que genera la ingesta de estos productos (Oozeer y col., 2006, Hickson y col, 2007, Saxelin, 2008, Granato y col., 2010).

Inicialmente la concepción del efecto benéfico de algunos microorganismos fue enunciado en el trabajo de Elie Metchnikoff titulado "Sobre la prolongación de la vida" en 1908, donde se aseguraba que no todos los microorganismos en el mundo microbiano debían ser considerados patógenos, dado que algunos de ellos podrían ser realmente útiles y dentro de los cuales, las bacterias ácido lácticas poseían un lugar destacado, aportando así, un precedente importante en lo que más tarde se conoció como concepto probiótico (Metchnikoff, 1907, Lilly y Stillwell, 1965, Senock y col, 2005). Sin embargo la práctica de este concepto permaneció esencialmente latente durante gran parte del siglo XX y a través de la era de oro de los antibióticos y las vacunas. De hecho el término "microbio" es el que se ha exaltado como agente perjudicial y se ha minimizado el potencial benéfico de algunas bacterias.

Hacia 1970 un microorganismo probiótico se definía como "un microorganismo que se utiliza como suplemento en la alimentación animal, para aumentar el crecimiento y reducir el estrés". Más tarde se consideró como "un microorganismo vivo que se introduce en la dieta, y que tras ser ingerido en cantidad suficiente, ejerce un efecto positivo en la salud, más allá de los efectos nutricionales tradicionales" (Roberfroid, 2000; Marquina, 2001). En la actualidad los probióticos son microorganismos vivos no patógenos, que administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio saludable sobre el huésped (FAO/WHO, 2001, 2002, WHO, 2005, Sander, 2008).

Los términos antibiótico y probiótico, traducidos literalmente del griego "biotikos" son el opuesto perfecto, el primero resulta "contra la vida" y el segundo significa "a favor de la vida" (Conly y Johnston, 2004). Si bien los antibióticos son agentes terapéuticos para tratar

las infecciones causadas por bacterias patógenas, los probióticos por definición, si fueran cuidadosamente seleccionados para su uso contra determinadas infecciones en humanos y animales, tendrían similar actividad antimicrobiana que los antibióticos y además ofrecerían efectos benéficos para la salud del huésped (Koning y col., 2008, Kaur y col., 2009).

En los últimos años, expertos representantes de organismos internacionales, tales como la Organización de Agricultura y Alimentos (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), han elaborado documentos con recomendaciones sobre los criterios y metodologías necesarios para identificar y definir probióticos y establecer los mínimos requerimientos para probar con mayor precisión, los beneficios en la salud (FAO/WHO, 2001, 2002, WHO, 2005, Dobrogosz y col., 2010). Estos organismos definieron que los dos principales géneros de bacterias Gram positivas usadas extensivamente como probióticos son miembros de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Aún así, algunas especies de los géneros *Escherichia*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Saccharomyces* también son consideradas entre los probióticos (Tabla 1).

Tabla 1. Microorganismos reconocidos como probióticos.

<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	Otros
<i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. crispatus</i> <i>L. delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> ^a <i>L. fermentum</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. paracasei</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i>	<i>B. bifidum</i> <i>B. breve</i> <i>B. infantis</i> <i>B. longum</i> <i>B. lactis</i> <i>B. adolescentis</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle <i>Saccharomyces boulardii</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> ^a <i>Enterococcus faecium</i> ^b

Gupta y Garg, 2009

Referencias. **a**, aún hay debate sobre su actividad probiótica; **b**, preocupa su seguridad debido a su potencial patogenicidad y resistencia a vancomicina.

Además de la correcta identificación de las especies y la caracterización funcional de las mismas mediante técnicas *in vitro* y en modelos animales, deben ensayarse distintas fases de estudios clínicos en humanos para asegurar la inocuidad de estos microorganismos (Reid y col, 2003, 2008, Hibberd y Davidson, 2008, Vanderhoof y Young, 2008, Sanders 2010).

En un huésped humano o animal los probióticos pueden provenir de la microbiota autóctona (indígena) o alóctona (transitorias) de diferentes mucosas. Asimismo, la microbiota indígena es la principal fuente de microorganismos benéficos, los cuales parecen

poseer mayores habilidades para persistir y proliferar, como ocurre con algunas especies y cepas del género *Lactobacillus*. Un ejemplo de ellos lo puede constituir el tratamiento de la vaginosis bacteriana (VB) mediante la administración de lactobacilos en vagina. Los lactobacilos urogenitales con potencial probiótico han demostrado muy buenos efectos cuando son administrados ya sea por vía oral o vaginal (Mikelsaar y col., 2004, Hsieh y Versalovic, 2008, Kumar y col., 2011).

Con el incremento del número de microorganismos patógenos resistentes a multidrogas y el reconocimiento de la importancia del control de la microbiota humana en la salud y en la enfermedad, es cada vez mayor el interés generado en la utilización de los probióticos. Este fenómeno es evidente ya sea en el número de productos probióticos disponibles en el mercado, como así también, en la cantidad de investigaciones científicas realizadas en este campo. Por ejemplo, desde hace ya varios años en distintos países del mundo (Dinamarca, Finlandia, Netherlands, Suiza, Alemania, USA, Canadá, Japón, China) existe un creciente interés en los alimentos probióticos o funcionales (Senok y col., 2005, Saxelin, 2008). De manera similar, en los últimos 20 años se pueden encontrar publicaciones de estudios explorando las aplicaciones biomédicas de probióticos (Czaja y col., 2007, Versalovic y Wilson, 2008, Borchers y col., 2009, Ohashi y Ushida, 2009, Sleator, 2010, Li y col., 2012). Aún así, mientras la mayoría de las investigaciones con probióticos se han focalizado para su aplicación en el tracto gastrointestinal, proporcionalmente un menor número de estudios se han realizado utilizando probióticos vaginales para infecciones del tracto genitourinario (Huffnagle and Wernick, 2007, Spurbeck y Arvidson, 2011).

3.1. Efectos benéficos en la salud por el uso de probióticos

Hasta el momento son numerosas las evidencias científicas sobre los efectos benéficos para la salud por el uso de probióticos (Vasile y col., 2011) Las enfermedades gastrointestinales, incluidas las diarreas del viajero, diarreas asociadas a antibióticos (DAA), colitis necrotizante (CN), enfermedad intestinal inflamatoria (EII), síndrome de intestino irritable y las infecciones por *Helicobacter pylori* son algunas de las más estudiadas valorando los efectos producidos por distintos probióticos mediante ensayos con humanos (Goldin y Gorbach, 2008, Lin y col., 2009, WGO, 2010, Williams, 2010, Ojetti y col., 2012, Sunanliganon y col., 2012). Por ejemplo, la diarrea infecciosa en los niños y ancianos es un problema sanitario que promueve como alternativa terapéutica el uso de probióticos. En estudios clínicos sobre niños con diarrea aguda a rotavirus, la utilización de *L. reuteri* ATCC 55730, *L. rhamnosus* GG, *L. casei* DN-114001 y *Sacharomyces boulardii* con una adecuada terapia de rehidratación, lograron reducir la duración de la diarrea de 3-4 días a sólo 30 h y además no se observaron efectos adversos atribuidos a la administración oral de estos probióticos (Szajewska y col., 2007a, b, Pham y col., 2008, Lahtinen y col., 2012). Similares resultados fueron obtenidos por Narayan y colaboradores (2010) en una población de

infantes de Hong Kong empleando otras especies de lactobacilos. En los procesos de DAA, se demostró que la coadministración de *L. rhamnosus* y *S. boulardii* resultó más efectiva previniendo las diarreas recurrentes a *Clostridium difficile* y produjo un mayor alivio en los dolores estomacales de los pacientes, en comparación con el empleo de antibióticos como única terapia (Segarra-Newnham, 2007). Un estudio clínico en 139 pacientes ancianos hospitalizados, halló que la administración de una mezcla de probióticos (*L. casei*, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*) dos veces al día redujo considerablemente la incidencia de la DAA en adultos mayores (Hickson y col., 2007). Similares resultados fueron hallados por Johnston y col., 2011 quienes evaluando distintas preparaciones con probióticos en ensayos clínicos se ha visto una menor incidencia de DAA denotando un efecto preventivo del uso de estos microorganismos. Otra causa importante de morbilidad y mortalidad (20-50%) en los recién nacidos a pretérmino (<34 semanas de gestación) y de bajo peso (<1,5 kg) es la enterocolitis necrotizante (ECN). Varios estudios proveen evidencia sobre los efectos benéficos a corto plazo de la administración profiláctica de ciertos *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. y *S. thermophilus*, los cuales administrados dos veces al día en concentraciones de 10^9 ufc/ml, durante los primeros días de vida (10-17 días y luego por 6 semanas), reducen significativamente la incidencia y severidad de la ECN como así también, la mortalidad de estos neonatos (Deshpande y col., 2007, Lin y col., 2008, Deshpande y col., 2010, Sanders y col., 2010, Wang y col., 2012a). La enfermedad intestinal inflamatoria (EII) es una condición crónica, que incluye la enfermedad de Crohn (EC), la colitis ulcerosa (CU) y la inflamación del íleon. En algunos ensayos clínicos comparando el beneficio de la aplicación de una mezcla de 8 especies probióticas (VSL#3), conteniendo *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis* and *S. salivarius* subespecies *thermophilus* y *L. rhamnosus* GG para mejorar las condiciones en la EII, se demostró que la mezcla resultaba mejor para el tratamiento y el alivio de la CU que para la EC, mientras que el uso de *L. rhamnosus* GG no disminuía los dolores de esta última condición (EC) (Heilpern y Szilagy, 2008, Kajander y col., 2008, Moayyedi y col., 2010, Tursi y col., 2010).

Otros efectos benéficos de los probióticos se vienen explorando en diversos problemas de salud tales como: obesidad, hipercolesterolemia, inflamación, cáncer, procesos alérgicos, intolerancia a lactosa y otros oligosacáridos, infecciones respiratorias, efectos moduladores de la respuesta inmune e infecciones genitourinarias (Maldonado Galdeano y col., 2007, Kukkonen y col., 2007, Boyle y col., 2008a,b, EFSA, 2010, Gratz y col., 2010, Azcárate-Peril y col., 2011, Hao y col., 2011, Hakansson y Molin, 2011, Zhu y col., 2011, Kumar y col., 2012, Reid, 2012).

La reducción de los niveles de colesterol por algunas cepas probióticas es un hecho notablemente beneficioso para la salud humana que ha sido documentado mediante



ensayos *in vitro* e *in vivo* (Lye y col., 2010, Kumar y col., 2010). Esto se debe a la desconjugación enzimática de las sales biliares producida por una hidrolasa durante el circuito enterohepático, la cual está presente en las bacterias ácido lácticas del tracto gastrointestinal. Esta actividad hidrolasa (HSB), vuelve menos solubles a dichas sales y por ello, son difíciles de reabsorber desde el lumen intestinal. Así se produce la excreción de grandes cantidades de ácidos biliares en las heces. De este modo, las sales biliares serían menos eficientes en la solubilización y absorción de los lípidos en el intestino (Begley y col., 2006, Nagpal y col. 2007). A modo de ejemplo, Jones y colaboradores (2011), demostraron que la incorporación de una cepa con actividad hidrolasa de *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 en el yogurt consumido diariamente por pacientes adultos, disminuyó considerablemente los niveles séricos de colesterol. Existen lactobacilos que hidrolizan el colesterol y lo utilizan para su metabolismo.

En los últimos años las investigaciones sobre probióticos con propiedades anticancerosas han reunido una creciente evidencia científica (Liong, 2008). Los modelos *in vivo* de ratones (APC^{min} ratones), modificados genéticamente para formar espontáneamente tumores han servido para demostrar que ciertos microorganismos probióticos pueden reducir la incidencia de tumores. Un ejemplo lo constituye el estudio de O'Mahony y colaboradores (2001), quienes utilizando ratones *knockout* para IL-10, administraron vía oral una cepa de *L. salivarius* UCC118 durante 6 semanas y observaron una reducción del crecimiento tumoral como así también, una menor inflamación gastrointestinal en el grupo de ratones tratados con el probiótico, en comparación al grupo control. Otros dos estudios clínicos independientes evaluaron los efectos del uso de dos cepas probióticas, *L. rhamnosus* LGG y *B. lactis* Bb12, junto a oligofruktosa o inulina en pacientes con riesgo de cáncer de colon. En estos ensayos, se determinó que la combinación disminuyó la expresión de marcadores característicos de cáncer colonrectal (Loo y col., 2005, Rafter y col, 2007). El trabajo de Ohara y colaboradores (2010) en pacientes con cáncer colonrectal demostró que una sola administración diaria de cepas de *L. gasseri* OLL2716 y LG21 durante 12 semanas, restauró la microbiota intestinal inhibiendo el desarrollo de *C. perfringens* y la síntesis de aminas volátiles en las heces, contribuyendo con un efecto paliativo en estos pacientes. También se ha visto en pacientes con cáncer que han iniciado su quimioterapia, un efecto colateral denominado mucositis o inflamación de la mucosa intestinal. Este proceso inflamatorio está caracterizado por un síndrome de mala absorción, decaimiento y fiebre continua. Yamashiro y Nagata, (2010) realizaron un ensayo clínico controlado en un grupo de niños con cáncer y bajo tratamiento quimioterápico (n=42), dividiéndolos en un grupo placebo y un grupo tratado con altas concentraciones de 10⁹ UFC/ml de *B. breve* BBG-01, diariamente durante 3 meses. Estos investigadores demostraron que la administración de BBG-01 disminuyó la frecuencia de fiebre, el uso de

antibióticos, y atenuó la mucositis inducida por la quimioterapia en el grupo tratado, a diferencia de los niños del grupo placebo quienes sufrían infecciones oportunistas por desequilibrios en la microbiota intestinal y necesitaron de terapia antibiótica.

Determinados procesos alérgicos tales como, eczema atópico, rinoconjuntivitis alérgica, asma alérgica y dermatitis atópica, se volvieron muy frecuentes en el mundo occidental durante las últimas décadas, principalmente en niños y adultos (Ozdemir, 2010). Una posible causa que favorece estas reacciones de hipersensibilidad en el huésped, se ha asociado con un bajo número de especies de lactobacilos y bifidobacterias colonizando el intestino durante los primeros días de vida (Penders y col., 2007, Roessler y col., 2008). En el caso de la rinitis y el asma alérgico, algunos estudios clínicos utilizando cepas probióticas tales como: *B. longum* BB536, *L. paracasei* Lp33 y *L. acidophilus* L92, demostraron un marcado alivio de los síntomas en los pacientes y consecuentemente una mejoría en su calidad de vida (Xiao y col., 2006, Kalliomaki y col., 2010). Un resultado similar observaron Ivory y colaboradores, (2008), quienes administraron por vía oral una cepa probiótica de *L. casei* Shirota, en individuos alérgicos al polen consiguiendo además, un efecto antiinflamatorio nasal. En niños de edad pre-escolar, la ingesta de leche suplementada con *L. casei* DN-114001 por un periodo de 6 meses, disminuyó el número de episodios de rinitis y asma alérgico (Giovannini y col, 2007).

Algunos trabajos sobre la influencia de ciertos probióticos en el sistema inmune indican un aumento de la actividad fagocitaria de monocitos, granulocitos y células natural killer (NK) (Hajela y col., 2012). Otros efectos de inmunomodulación en la que intervienen probióticos, incluyen la inducción sobre la producción de mucus, estimulación de la secreción de IgA, activación de neutrófilos (Ne), inhibición de la síntesis de citoquinas inflamatorias, rápida estimulación de la síntesis de inmunoglobulinas en circulación (IgM/ IgG), aumento de la expresión de receptores toll like receptors (TLR) (Delcenserie y col., 2008, Kitasawa y col., 2008, Shida y Nanno, 2008, Borchers y col., 2009, Ohashi y Ushida, 2009, Sherman y col, 2009, Rose y col., 2012).

El uso de probióticos en la prevención o tratamiento de infecciones vaginales ha sido motivo de varios estudios. Muchas infecciones vaginales resultan de la desaparición o disminución cuantitativa y cualitativa de especies de lactobacilos naturalmente presentes en la vagina (Bohbot y Cardot, 2012). La ausencia de lactobacilos vaginales predispone a las mujeres a una amplia variedad de infecciones, tales como vaginosis bacteriana (VB), infecciones genitourinarias y de transmisión sexual producidas por *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma* spp., infecciones virales (HIV, virus herpes simplex-2 (HSV-2)), riesgo de enfermedad inflamatoria pélvica y partos prematuros (Denney y Culhane, 2009, Donders y col., 2009, 2010, Brotman y col., 2010, Brotman,

2011). Muchas mujeres con infecciones genitourinarias pueden ser asintomáticas y aún así, estar en riesgo de complicaciones severas, especialmente durante los embarazos. La gestación en las mujeres se asocia con bacteriuria asintomática entre el 4-7% de los casos y con pielonefritis entre el 0.5-2% de las embarazadas (Hill y col., 2005, Minardi y col., 2011). La utilización de probióticos para prevenir las infecciones urinarias en las mujeres sexualmente activas y posmenopáusicas, como así también en las embarazadas, se ha informado en distintos trabajos científicos. Un estudio preclínico de infección urinaria en un modelo animal, demostró que la administración intravaginal de la cepa probiótica *L. fermentum* L23 en una concentración de 10^8 UFC/ml, inhibió el crecimiento de *E. coli* y redujo la severidad y el riesgo de infección urinaria (Pascual y col., 2010). En un ensayo clínico sobre un grupo de mujeres premenopáusicas con infecciones urinarias recurrentes (ITUr) quienes recibieron tratamiento con antibióticos, se evaluó el efecto benéfico de un probiótico intravaginal. Estas mujeres fueron divididas en un grupo control y un grupo tratado con probiótico durante 3 meses. En dicho estudio se demostró que las mujeres bajo terapia probiótica tuvieron una reducción significativa en la recurrencia de las ITUs (21%), respecto al grupo control placebo con una tasa de ITUr del 47% (Minardi y col., 2011). Similares resultados fueron hallados por Stapleton y colaboradores (2011), quienes probaron la aplicación vaginal del probiótico *L. crispatus* en mujeres con antecedentes de ITUr por el término de 10 semanas y luego compararon con un grupo placebo. Estos investigadores hallaron que las mujeres tratadas con el probiótico presentaron una recurrencia de infección del 15% comparado con casi el doble en el grupo placebo y además demostraron que la elevada colonización vaginal por *L. crispatus* (10^6 UFC/ml de flujo) se correlacionó con una menor recurrencia de las ITUr. Beerepoot y colaboradores (2009), realizaron un ensayo clínico sobre 252 mujeres posmenopáusicas con ITUr evaluando el efecto preventivo de dos cepas probióticas, *L. rhamnosus* GR-1 y *L. reuteri* RC-14, respecto del tratamiento antibiótico con trimetoprima- sulfometoxazol (TMP/SMX) durante un período de 12 meses. Las mujeres que recibieron cápsulas orales conteniendo 10^9 UFC/mg de los probióticos, presentaron una reducción de la ITUr mayor al 50%, retrasando los episodios de ITU en comparación al grupo tratado con TMP/SMX donde aumentaron los niveles de resistencia antibiótica. En los últimos años, una serie de investigaciones clínicas se han desarrollado valorando el uso de probióticos en distintos periodos de la gestación y lactancia (Boyle y col., 2008b, Kukkonen y col., 2008, Kuitunen y col., 2009, Elías y col., 2011). La mayoría de las mujeres embarazadas comienzan el tratamiento con probióticos entre la semana 32 y 36 de gestación y continúan hasta el parto con la intención de producir un beneficio en la salud. Allen y colaboradores (2010), evaluaron la seguridad de suplementar con probióticos las dietas de embarazadas y niños recién nacidos para evitar posibles efectos adversos durante la gestación como así también, el desarrollo de enfermedades atópicas en los neonatos.

Una concentración de 10^{10} UFC/ml de *L. salivarius* CUL61, *L. paracasei* CUL08, *B. animalis subsp. lactis* CUL34 y *B. bifidum* CUL20 se administró diariamente a mujeres embarazadas durante el último mes de gestación y a los neonatos durante los primeros seis meses de vida. En dicho periodo se evaluaron los efectos adversos de acuerdo a la clasificación internacional de criterios de enfermedad elaborado por la OMS y se demostró que los probióticos administrados no presentaron riesgo para la salud de las embarazadas ni para el desarrollo temprano del niño. Recientemente en Finlandia, se llevó a cabo un estudio clínico controlado sobre 256 mujeres embarazadas, donde se investigó la eficacia y seguridad de la combinación probiótica de *L. rhamnosus* GG y *B. lactis* Bb12 desde el primer trimestre de gestación y en el crecimiento de los neonatos durante 24 meses, en comparación a un grupo control. El grupo tratado con los probióticos tuvo una menor frecuencia de diabetes mellitus gestacional (MDG) (13%), respecto al grupo control que presentó un 34%. La seguridad del uso de estos probióticos se confirmó por la ausencia de efectos adversos, tales como: obesidad, enfermedades cardiovasculares, hipertensión, síndromes metabólicos y alergias, tanto en las madres gestantes como en el crecimiento (peso y tamaño) de los recién nacidos (Luoto y col., 2010). La prevención de partos prematuros espontáneos mediante el uso de distintas formulaciones con probióticos es una nueva área de exploración científica dada la alta mortalidad (>70%) y morbilidad (>50%) de esta problemática en el mundo. En un estudio de cohorte realizado en Noruega sobre 950 mujeres embarazadas, evaluando el efecto preventivo de una mezcla de probióticos, se demostró que la ingestión de leches enriquecidas con *L. acidophilus* LA-5, *B. lactis* Bb-12, *L. rhamnosus* LGG durante los meses de gestación redujo significativamente el riesgo de aparición de partos prematuros en estas mujeres en comparación al grupo control (Myhre y col., 2011).

La VB es una infección muy frecuente en las mujeres premenopáusicas y sexualmente activas con una incidencia del 30%, donde el 40-50% de los casos presentan síntomas, mientras que en las mujeres embarazadas su prevalencia ronda entre el 12-55% (Sharami y col., 2007). Otros problemas asociados con la VB son un alto riesgo de adquirir infecciones de transmisión sexual, EPI y de partos prematuros (Cribby y col., 2008, Gallo y col., 2008, Donders y col., 2009). La recurrencia de VB (>4 episodios por año) es también un hecho bastante común, que experimentan entre el 30-60% de las mujeres después del tratamiento oral con antibióticos. De hecho, ya que existen pocas opciones terapéuticas para el tratamiento de VB en el mundo, los médicos ginecólogos están abiertos a emplear nuevas estrategias que varían desde el uso de drogas sintéticas hasta la aplicación de probióticos (Kumar y col., 2011). Larsson y colaboradores (2008) realizaron un ensayo controlado sobre 100 mujeres con VB recurrente tratadas con clindamicina como terapia primaria, y en las que se administró cápsulas vaginales conteniendo 10^9 UFC/mg de dos cepas de lactobacilos

probióticas durante tres ciclos de menstruación para determinar si este procedimiento incrementaba la tasa de curación y el tiempo entre las recaídas, en comparación a un grupo placebo control. Estos investigadores determinaron que las mujeres tratadas con probióticos, postratamiento antibiótico, presentaron una tasa de curación mayor (77%) que el grupo placebo (46%) y además, actuarían como adyuvantes de la antibióticoterapia, prolongando los tiempos entre los episodios de recaídas. En un ensayo clínico similar, se comprobó que la co-administración de tinidazole, un nuevo antibiótico para el tratamiento de VB alternativo al metronidazole y 10^8 UFC/ml de *L. rhamnosus* GR-1 y *L. reuteri* RC-14 durante 28 días en mujeres con VB, tuvo un 87% de curación respecto al grupo control (50%), siendo una alternativa terapéutica valiosa para los episodios refractarios de VB (Martinez y col., 2009). El trabajo realizado por Ehrstrom y col., (2010) evaluando la aplicación de *L. gasseri* LN40, *L. fermentum* LN99, *L. casei* subsp. *rhamnosus* LN113 and *P. acidilactici* LN23 en 95 mujeres postratamiento convencional para VB y vulvocandidiasis vaginal (VCV) recurrentes, no solo demostró una reducción significativa de los episodios de recurrencias de estas infecciones sino también, una elevada colonización de estos microorganismos en el grupo tratado con probióticos. Aunque son varios los antecedentes que muestran un efecto positivo sobre el tratamiento de la VB producto del efecto combinado entre probióticos y antibióticos, o administrados como adyuvantes postratamiento antibiótico, se ha visto en la última reunión de expertos desarrollada en Mumbai, que la sola administración de 10^9 UFC/ml de *L. brevis*, *L. salivarius* subsp. *salicinus* y *L. plantarum* a 67 mujeres con VB durante 8 días fue efectiva para curar un 80% de las mujeres con estas infecciones, en relación a un valor significativamente menor en el grupo control, evidenciando la importancia de una correcta selección de cepas probióticas para combatir estas infecciones (Hajela y col., 2012).

Los tratamientos y estrategias preventivas para las infecciones del tracto genitourinario, han transcurrido sin cambios durante casi 50 años. Las tasas de prevalencia para vaginosis bacteriana en más de 29%, dependiendo de la población y así mismo la alta incidencia de candidiasis vulvovaginal e infecciones del tracto urinario, además de VIH, necesitan con urgencia nuevas terapias para mejorar la salud de las mujeres alrededor del mundo (MacPhee y col., 2010, Reid, 2012). Estos antecedentes junto a muchos otros, se deberían tener en cuenta al seleccionar las mejores cepas bacterianas para su uso como probióticos y en la búsqueda de una resistencia biológica y natural contra microorganismos patógenos exógenos.

3.2. Bacteriocinas, síntesis, clasificación y modo de acción

Las bacteriocinas son sustancias con actividad antimicrobiana producidas por microorganismos, cuya constitución química está formada por un núcleo de naturaleza proteica al que pueden unirse otros compuestos tales como hidratos de carbono, aminoácidos, lípidos, ADN y/o ARN. Estos compuestos antimicrobianos inhiben el desarrollo de otros microorganismos relacionados o no filogenéticamente. La síntesis de estos metabolitos secundarios biológicamente activos ocurre hacia finales de la fase exponencial de desarrollo o en el inicio de la fase estacionaria. En la actualidad se sabe que las bacteriocinas son sintetizadas por bacterias de diferentes linajes, incluidas las arqueobacterias (Shand y Leyva, 2008). En las eubacterias, esta diversidad se divide en bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas y Gram negativas (Gordon y col., 2007, Heng y col., 2007). Estos compuestos antimicrobianos son de síntesis ribosomal, aunque algunos de ellos requieren de modificaciones post-traduccionales para adquirir actividad, el gen estructural de la bacteriocina y los genes que codifican para las proteínas implicadas en el procesamiento y transporte de la misma, a menudo se encuentran en un plásmido o un transposón, como también los genes que codifican para su autoinmunidad, protegiendo al microorganismo productor de su propia bacteriocina (Jon y col., 2006, Kjos y col., 2010). Tienen propiedades bactericidas o bacteriostáticas contra especies estrechamente relacionadas con las cepas productoras y también con aquellas distanciadas filogenéticamente (interespecifica). Se las denomina de acuerdo a la especie que la produce. Poseen sensibilidad al tratamiento con enzimas proteolíticas, siendo esta una propiedad para caracterizarlas (Todokoro y col., 2006). Presentan una amplia tolerancia al calor (hasta 121°C), peso molecular (PM), propiedades bioquímicas, rango de huéspedes sensibles, modo de acción y localización de sus determinantes antigénicos. Generalmente son estables al pH ácido o neutro y soportan los tratamientos de pasteurización a 63°C durante 30 minutos o a 72°C por 15 segundos (Pascual y col., 2008a, Rajaram y col., 2010, Mohankumar y Murugalatha, 2011, Abo-Amer y Shobrak, 2012).

La producción de bacteriocinas en algunas bacterias está regulada por el mecanismo de "*quorum sensing*" o autoinducción, por medio del cual se monitorean cambios en densidad de la población bacteriana en un ambiente dado y así, se regulan diferentes propiedades fisiológicas (incorporación de ADN exógeno, tolerancia a ácidos, formación de biofilm) que favorecen la supervivencia del microorganismo productor en un determinado nicho. Desde su descubrimiento en 1925, casi 300 bacteriocinas han sido identificadas y algunas de ellas han sido utilizadas satisfactoriamente para la inhibición de microorganismos patógenos en el tracto gastrointestinal y urogenital de animales y humanos (Hammami y col., 2007, Gillor, 2007a, Pascual y col., 2008a, Ruíz y col., 2009, 2012).

Diversos investigadores han intentado clasificar a las bacteriocinas de acuerdo a sus características bioquímicas, estructurales y genéticas. Con el tiempo estos criterios de clasificación han ido sufriendo algunas modificaciones. Por ejemplo, las primeras investigaciones científicas en este campo describieron 4 clases de bacteriocinas (Clase I: modificadas postraduccionalmente, cuyo ejemplo son los lantibióticos tipo lineal (Tipo AI) y globular (Tipo B), Clase II: pequeñas bacteriocinas estables al calor (<10kDa) y dentro de este grupo algunas subclases, Clase III: sensibles al calor (>30 KDa) y Clase IV: bacteriocinas complejas constituidas por un núcleo proteico unido a lípidos esenciales y/o carbohidratos) (Klaenhammer, 1993, Nes, 1996). Más tarde, Kemperman y col., 2003 recomendaron el reconocimiento de un nuevo grupo o clase, clase V, formada por péptidos antimicrobianos cíclicos no modificados, de acuerdo a su estructura primaria, peso molecular, estabilidad al calor y organización molecular (Kemperman y col., 2003). Sin embargo, Cotter y colaboradores, (2005), propusieron una modificación de la clasificación de Klaenhammer reorganizando las bacteriocinas en dos categorías principales: lantibióticos (Clase I) y bacteriocinas sin lantionina (Clase II). La clase III (péptidos grandes con función hidrolasa de mureína y lábiles al calor) son renombradas como bacteriolisinas, y la clase IV (bacteriocinas complejas conteniendo lípidos y carbohidratos) es retirada. Siendo mantenidas las bacteriocinas de la clase II subgrupo IIa, IIb y IIc, mientras la clase V fue reasignada a la clase IIc. Aún así, algunos investigadores no coincidieron completamente con el esquema de Cotter y col. 2005, y modificaron esta última clasificación para incluir la mayoría de las bacteriocinas de bacterias Gram positivas conocidas hasta el momento (Heng y col., 2007). Para muchos investigadores en este campo, no resulta fácil formular un esquema eficiente, coherente y adecuado de clasificación que abarque la totalidad de las bacteriocinas (Zouhir y col., 2010). En la figura 3 se esquematiza un diagrama que intenta abarcar a todas las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas.

Las bacteriocinas Clase I o lantibióticos, son péptidos pequeños (19-38 aminoácidos) activos a nivel de membrana que contienen algunos aminoácidos pocos comunes como lantionina, 3-metil-lantionina y dihidroalanina, los cuales se forman debido a modificaciones postraduccionales, tales como la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, con la consiguiente adición de los átomos de azufre de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos. Dentro de esta clase se encuentran los lantibióticos lineales (tipo A), globulares (tipo B) y las multicompuestas o complejas (tipo C). El ejemplo clásico lo constituye la nisina, producida por *Lactococcus lactis*, que por su estructura lineal pertenece al subtipo AI. Otro ejemplo dentro del subtipo AII es la bacteriocina SA-FF22 sintetizada por *S. pyogenes* (Lee y Kim, 2011). Los lantibióticos tipo B son estructuras más globulares y compactas que las de tipo A y a pH neutro pueden no poseer carga o presentar carga negativa. El prototipo en este grupo es la mersacidina, un péptido de 20 aminoácidos sintetizado por *Bacillus* spp. cepa HIL Y-85,54728, con una fuerte actividad antimicrobiana

sobre especies de *S. aureus* meticilino resistentes (SAMR), interfiriendo con la síntesis del peptidoglicano a través de una interacción específica con el precursor lípido II, de la síntesis de pared celular (Sass y col., 2008). Los lantibióticos de componentes múltiples son un grupo de sustancias formadas por dos péptidos modificados postraduccion, que presentan actividad sinérgicamente pero no de manera individual. Un ejemplo de ello es lacticina 3147 producida por *Lactococcus lactis* DPC3147, conformada por dos péptidos (LtnA1 y LtnA2) con actividad antimicrobiana sobre cepas de *C. difficile*, *S. aureus* meticilino resistentes (SAMR) y con resistencia intermedia a vancomicina (VISA) (Rea y col., 2007, Piper y col., 2012).

Las bacteriocinas Clase II o no lantibióticos, son péptidos pequeños cuyo peso molecular es < 10 KDa, formados por una secuencia de aminoácidos regulares y sin modificaciones postraduccionales (no lantibióticos). Esta clase se subdivide 3 tipos: Clase IIa o péptidos tipo pediocina con similar secuencia de aminoácidos, son activos contra *L. monocytogenes*. La pediocina PA-1 (44 aminoácidos), producida por *Pediococcus acidilactici*, es el miembro mejor caracterizado de esta familia, comercialmente utilizado en productos de preservación alimentaria contra *Listeria* en alimentos (Fimland y col., 2005, Devi y Halami, 2011, Mlalazi y col., 2011).

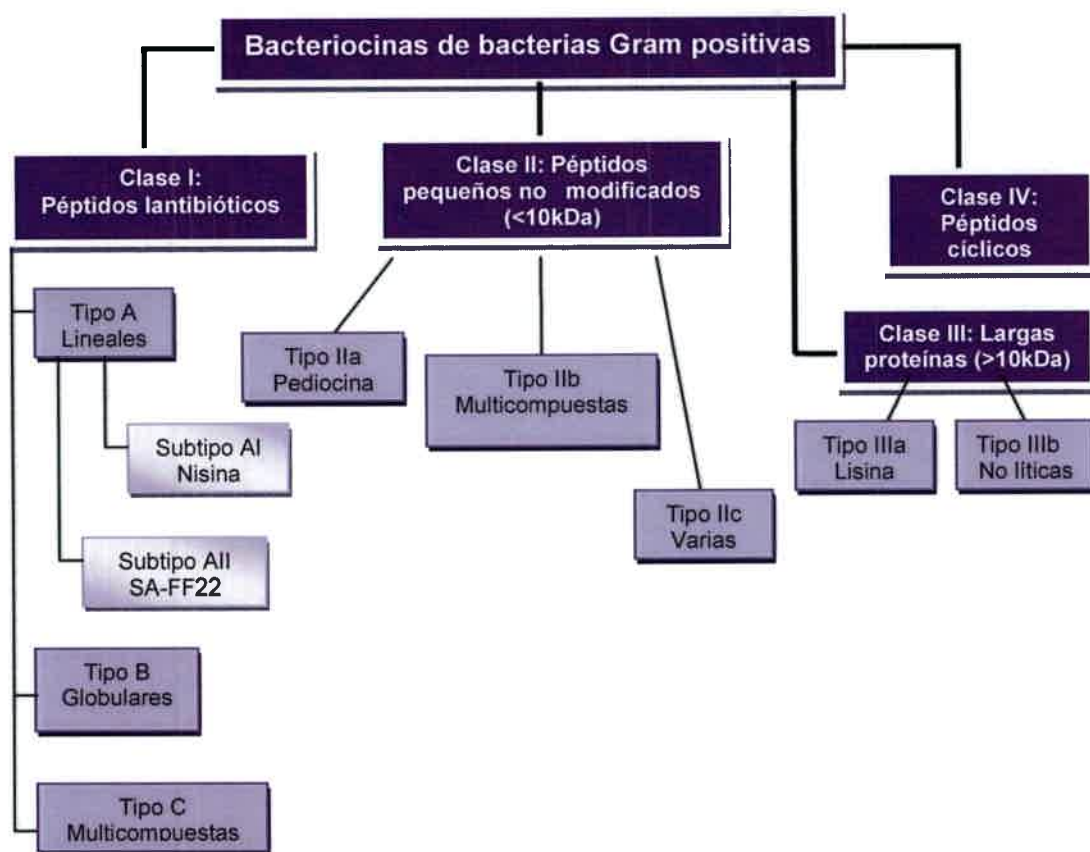


Figura 3. Nuevo esquema de clasificación de bacteriocinas de bacterias Gram positivas propuesto por Heng y col., 2007.

La clase IIb o de componentes múltiples, está formada por bacteriocinas de dos péptidos diferentes (como mínimo) que cuando están presentes en cantidades iguales, se complementan para ejercer su actividad antimicrobiana como una unidad. La bacteriocina lactococina G sintetizada por varias cepas de *Lactococcus lactis*, se sintetiza como dos péptidos precursores con puentes doble glicina que son clivados por un sistema de proteínas de transporte ABC que transporta los péptidos a través de la membrana de la bacteria productora. Esta bacteriocina permeabiliza las membranas mediante la formación de complejos de poración en las células sensibles ricas en una variedad de cationes monovalentes tales como Na⁺, K⁺, Li, Cs, Rb y colina, pero no ricas en H⁺, Mg⁺² o con aniones PO₄⁼². Algunos otros ejemplos en este grupo son enterocina 1071 (*Enterococcus faecalis* BFE 1071), plantaricina E/F, plantaricina J/K (*Lactobacillus plantarum* C11) y aureocina A70, entre otros (Oppegård y col., 2007, 2010, Nissen-Meyer y col., 2010). Esta última, sintetizada por *S. aureus* A70, es un ejemplo formado por un sistema de 4 péptidos (Netz y col., 2001). En la clase IIc se encuentran una variedad de bacteriocinas no modificadas que no poseen un péptido líder, es decir que son sintetizadas sin un extremo amino terminal en la secuencia aminoácida. Las mismas son termoestables, de tamaño pequeño (< 8 KDa) y no cumplen con los criterios IIa y IIb. Algunos ejemplos representativos son las mutacinas producidas por *S. mutans* UA159, enterocinas Q y 62-6 producidas por cepas de *E. faecium*, MR10A y MR10B sintetizadas por *E. faecalis* (Hale y col., 2005, Martin-Platero y col., 2006, Nes y col., 2007). La enterocina 62-6 sintetizada por *Enterococcus faecium* cepa 62-6, es una bacteriocina caracterizada por poseer un tamaño pequeño, estabilidad al calor y pH, de características catiónicas e hidrofóbicas, con un amplio espectro de actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram positivas y negativas (Dezwaan y col., 2007).

Aunque la mayoría de las bacteriocinas de bacterias Gram positivas son péptidos pequeños, la clase III, está formada por polipéptidos o proteína grandes (PM>10KDa) lábiles al calor. En este grupo se pueden diferenciar dos tipos, bacteriocinas tipo IIIa o lisinas y las tipo IIIb o bacteriocinas no líticas. Algunos ejemplos de las bacteriocinas (clase IIIa) son lisostafina producida por *Staphylococcus simulans* subsp. *staphylolyticus*, zoocina A producida por *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, millericin B producida por *S. milleri* y enterolisina A de *E. faecalis* (Nilsen y col., 2003, O'Rourke y col., 2009, Freire-Bastos y col., 2010, Özdemir y col., 2011). En el caso de lisostafina, tiene un efecto lítico, del tipo endopeptidasa que hidroliza los puentes intercatenarios del peptidoglicano de estreptococos (Gargis y col., 2009). Las bacteriocinas clase IIIb son proteínas de gran tamaño cuyo mecanismo antimicrobiano no involucra la lisis del microorganismo susceptible, sino la disipación de la fuerza motriz de protones que conduce a la pérdida de ATP y finalmente produce la muerte celular. En este grupo se pueden mencionar helveticina J producida por

L. helveticus, disgalacticina y streptococina A-M57 secretadas por *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* cepa W2580 y *S. pyogenes*, respectivamente. Disgalacticina presenta un menor espectro de actividad antimicrobiana, limitado a estreptococos del grupo A, C y G, mientras la streptococina A-M57 inhibe a *M. luteus*, *L. lactis*, diferentes especies de listeria, *Bacillus megaterium* y *S. simulans* (Heng y col., 2004, 2006, Swe y col., 2009, 2010).

Las bacteriocinas de la clase IV son péptidos que adoptan una conformación cíclica, unidos por sus extremos carboxilo y amino terminales mediante un péptido unido covalentemente (Van Belkum y col., 2011). Esta conformación les confiere una mayor estabilidad termodinámica y resistencia a las proteasas, contribuyendo con una actividad biológica más perdurable (Montalbán-López y col., 2012). Algunos ejemplos de esta clase son enterocina AS-48 producida por *E. faecalis* S-48, gasericina A, uberolisina, lactocyclina Q sintetizadas respectivamente por *L. gasseri* LA39, *S. uberis* y *Lactococcus* spp. (Maqueda y col., 2004, Wirawan y col., 2007, Nishie y col., 2012).

Claramente la investigación sobre las bacteriocinas de BAL se encuentra en continuo crecimiento y el interés en estas bacterias productoras de bacteriocinas está dirigido a sus potenciales aplicaciones prácticas en la preservación alimentaria o favoreciendo la actividad antimicrobiana de la cepa productora, para su uso como probiótico (Heng y col, 2007). Además en el desarrollo de nuevas estrategias de control antimicrobiano, estas sustancias presentan un uso potencial en la prevención y/o tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas y pueden constituir un complemento a la terapia con antibióticos (Papagianni , 2003, Sang y Blecha, 2008, Papagianni y Anastasiadou, 2009, Montalbán-López y col., 2011).

El descubrimiento de agentes antimicrobianos ha creado una nueva era de la medicina. El control de las enfermedades infecciosas en la actualidad está basado, sobre la elección y cuidadoso uso de un grupo de inhibidores de peso molecular bajo a medio con diversos mecanismos de acción y variado espectro de actividad antibacteriana y antifúngica. Por su parte los microorganismos han desarrollado una variedad de mecanismos de defensa contra los antibióticos y así la resistencia a estos antimicrobianos constituye una temática de preocupación mundial para la que urge una resolución rápida. Las nuevas sustancias antimicrobianas deberán ser desarrolladas eficientemente para contrarrestar no solo las infecciones sino la capacidad de los microorganismos de sobrevivir continuamente a cada vez más tratamientos antibióticos. Así, estrategias para hallar nuevos agentes antimicrobianos están siendo investigadas (Mota-Meira y col., 2000, Gillor y col., 2005, Gillor y Ghazaryan, 2007, Sit y Vederas, 2008).

3.3. Modo de acción de bacteriocinas de bacterias Gram positivas

El modo de acción de las bacteriocinas es complejo debido a la gran variabilidad estructural y química de estas sustancias. De hecho, definir sus mecanismos de acción con mayor precisión está relacionado a la estructura primaria de estos péptidos (Hasper y col., 2006, Nishie y col., 2012). Por lo general, actúan destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños o altera la fuerza protón motriz necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácidos nucleicos (Nissen Meyer y col., 2009).

Si bien existen diferencias estructurales, las bacteriocinas clases I y II comparten algunas características que conducen a la eliminación de microorganismos susceptibles en los diferentes nichos. Los péptidos se unen a la membrana citoplasmática a través de uniones electrostáticas con los fosfolípidos cargados negativamente, luego se insertan a la membrana con una reorientación que depende del potencial de membrana, el cual está influenciado por el pH y la composición fosfolipídica. Los monómeros de bacteriocinas forman agregados proteicos, que resultan en la formación del poro con la consecuente salida de iones (principalmente potasio y magnesio), pérdida de la fuerza protón motriz (FPM), salida de ATP y aminoácidos. La FPM juega un papel central en la síntesis de ATP, en el transporte activo y el movimiento bacteriano, por lo tanto, se inhibe la síntesis de macromoléculas, de péptidoglicano y la producción de energía dando como resultado la muerte celular (Asaduzzaman y col., 2009, Desriac y col., 2010, Lohans y Veredas, 2012).

Aunque es común la formación de poros y la disipación de la FPM en la acción que llevan a cabo las bacteriocinas, existen algunas particularidades en cada clase, que procederemos a mencionar. En los lantibióticos, la actividad inhibitoria de nisina sobre bacterias Gram positivas de los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria*, no requiere un receptor en la célula blanco, ya que se une con alta afinidad a un precursor de la pared celular como el lípido II, inhibiendo la síntesis de pared celular y formando un poro que permeabiliza las membranas por el cual se da eflujo de moléculas desde los microorganismos susceptibles (Breukink y de Kruijff, 2006, Bierbaum y Sahl, 2009). Las bacteriocinas de la clase IIa, como pediocina PA-1/AcH con fuerte actividad contra especies de *Listeria*, usan como receptores a componentes del sistema manosa fosfotransferasa (man-PTS) de la célula blanco, ejerciendo su actividad mediante disipación de la FPM y consiguiente formación de poros. Este sistema fosfotransferasa unido a las membranas es la principal vía de incorporación de manosa y glucosa por las bacterias con el que interactúan específicamente las bacteriocinas clase IIa (Nissen-Meyer y col., 2009, Kjos y col., 2010). A diferencia de la mayoría de las bacteriocinas clase II, lacticin Q, sintetizada por *L. lactis* QU5 no requiere de un receptor en las membranas de la célula blanco, ya que actúa

por un mecanismo de formación de poros del tipo toroidal o a rosca (Fujita y col., 2007, Yoneyama y col., 2009, Zendo y col., 2010).

En la clase IIb, las plantaricinas E/F (péptidos PlnE y PlnF) y J/K (péptidos PlnJ y PlnK), son 4 péptidos catiónicos necesarios para la formación de poros en la membrana, los que dependen de la unión de 2 péptidos homólogos o complementarios respectivamente, para la disipación del potencial de membrana, la formación del complejo de poración y finalmente la acción bactericida. Ambas plantaricinas E/F y J/K permeabilizan membranas específicamente con iones monovalentes, incluyendo aquellas ricas en H^+ a diferencia de lactococina G (clase IIb). De hecho, plantaricina J/F conduce aniones más eficientemente que plantaricina E/F, la cual presenta mayor afinidad con los cationes. Otros ejemplos son lactacin F que permite solo el paso de K^+ y PO_4^- a través de las membranas permeables (Fimland y col., 2008, Diep y col., 2007, Rogne y col., 2009).

Hasta el momento el mecanismo de acción en las bacteriocinas de gran tamaño, correspondientes a la clase III, se desconoce y debería ser más estudiado (Heng y col., 2007).

La interacción de las bacteriocinas con las membranas de los microorganismos es un paso fundamental para su acción antimicrobiana. Algunos de los componentes de membranas como los grupos fosfatos del LPS en bacterias Gram negativas y los ácidos teicoicos y lipoteicoicos en Gram positivas son los responsables de generar cargas negativas que interaccionan electrostáticamente con las cargas positivas de los péptidos antimicrobianos (Wimley, 2010, Laverty y col., 2011). Para ello las estructuras secundarias y terciarias de estos péptidos catiónicos adoptan una variedad de cambios estructurales que se asocian con variaciones en su carga eléctrica e hidrofobicidad, los cuales son importantes para su actividad biológica (Thomas y col., 2010). Así, las estructuras anfífilas de láminas plegadas β y α -hélice de las bacteriocinas, oligomerizan en las membranas microbianas mostrando diferentes mecanismos de formación de poro, entre ellos los de tipo agregación, toroidal, tonel y de cobertura (Figura 4) (Shai, 2006, Huang y col., 2010). En el modelo de agregación, los péptidos antimicrobianos se reorientan para formar agregados peptídicos que cruzan las membranas sin adoptar una orientación particular (Figura 4A). La formación de poros mediante el mecanismo tipo toroidal se da cuando los péptidos se insertan perpendiculares al plano de la bicapa lipídica mediante interacciones electroestáticas entre las regiones hidrofílicas del péptido y la cabeza fosfolipídica de la bicapa, mientras las zonas hidrofóbicas de los mismos doblan los lípidos creando un poro revestido por las cabezas de los fosfolípidos de membrana y los péptidos insertos (curvatura positiva de membrana), lo cual permite una mayor entrada de péptidos activos (Figura 4B) (Sengupta y col., 2008, Cirac y col., 2011). En los poros tipo tonel los péptidos se disponen

perpendiculares al plano de la membrana formando un barril (transmembrana), donde los lados hidrofóbicos están asociados con la bicapa de lípidos y las regiones hidrofílicas dan hacia el lumen formando el poro del canal (Figura 4C) (Fuentes y col., 2011). El modelo tipo cobertura sugiere que los péptidos se acumulan paralelamente a la membrana con sus lados hidrofóbicos asociados a las cabezas aniónicas de los fosfolípidos y las hidrofílicas hacia el lumen, dando lugar a un tapizado de péptidos, a partir del cual ejercen una acción de tipo detergente generando micelas y poros transitorios, los cuales favorecen la ruptura y desintegración de las membranas del microorganismo sensible (Figura 4D) (Bechinger y col., 2006, Sato y Feix, 2006, Laverty y col., 2011).

Los probióticos productores de bacteriocinas y las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas (BAL), han sido estudiadas durante años por su amplio espectro antimicrobiano, lo cual es útil en la industria alimenticia como preservantes de alimentos y para prevenir infecciones del tracto gastrointestinal (Savadogo y col., 2006, Collado y col., 2009). Sin embargo, también existen varios trabajos científicos evaluando el uso de probióticos bacteriocinogénicos y/o de las bacteriocinas purificadas o parcialmente purificadas, como alternativa terapéutica en el tratamiento de infecciones producidas por microorganismos patógenos en medicina humana y veterinaria (Montalbán-Lopez y col., 2011).

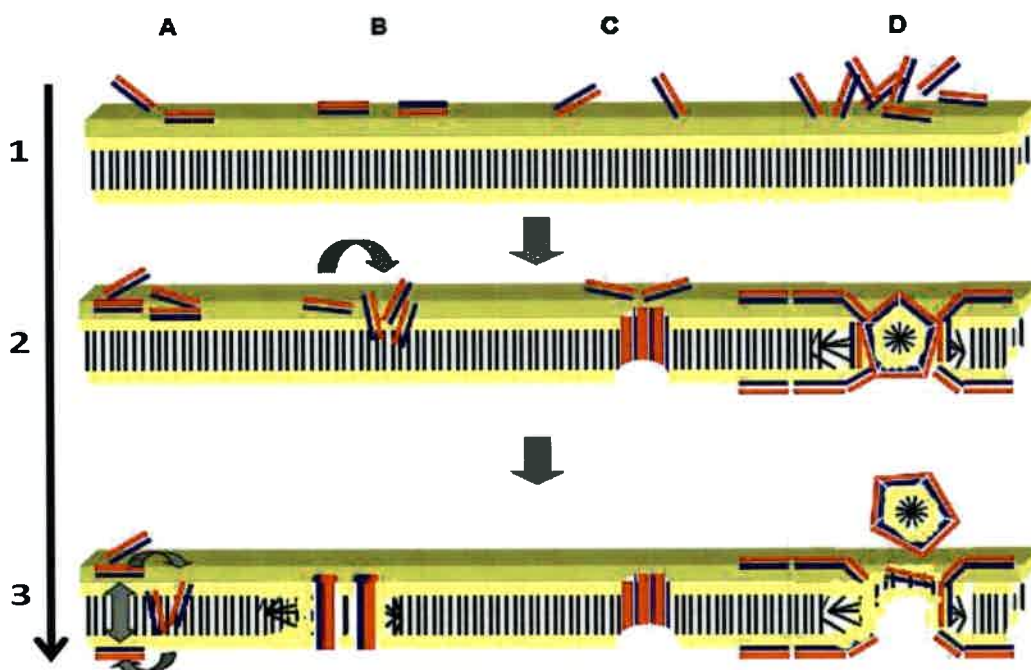


Figura 4. Mecanismos de formación de poro para péptidos antimicrobianos (Laverty y col., 2011). Referencias. Los péptidos antimicrobianos son esquematizados como pares de bastones con regiones hidrofílicas (rojas) e hidrofóbicas (azules) y la secuencia de pasos en que se insertan los péptidos se indica con los números 1, 2, 3. A: modelo de agregación de péptidos, B: poro tipo toroidal, C: modelo de tonel o barril, D: modelo tipo tapete o cobertura.

Esto es así, ya que la terapia probiótica es considerada del tipo natural, generalmente "segura" y sin efectos secundarios como los que se producen con los tratamientos farmacológicos convencionales, generando en la población una aceptación más fácil para este tipo de tratamientos alternativos (Pascual, 2004, Rahimi y col., 2008, Jones, 2010). De hecho, la posibilidad de utilizar a diferentes especies de lactobacilos probióticos como agentes antimicrobianos, es conveniente por ejemplo: en mujeres embarazadas, con infecciones genitales como vaginosis bacteriana, las cuales son recurrentes y están vinculadas a complicaciones obstétricas y ginecológicas, en pacientes femeninos con infecciones urinarias, donde los cambios hormonales o los tratamientos con antibióticos, han disminuido la biota protectora vaginal y predisponen al huésped a contraer diversas infecciones. Sin embargo, la aplicación directa de las bacteriocinas solas o en combinación con antimicrobianos convencionales, también representa una valiosa herramienta terapéutica para combatir y prevenir las infecciones de microorganismos patógenos que son resistentes al tratamiento con los antibióticos existentes (Gillor, 2007, Gillor y Ghazaryan, 2007, Guillor y col., 2008, Dobson y col., 2012). Además, dada las características estructurales y funcionales de algunas bacteriocinas, la amplia actividad antimicrobiana y en general, la baja toxicidad para células eucariotas, estas sustancias son de interés particular en la industria farmacológica, ya sea para su utilización directa, como también, para el desarrollo de nuevos péptidos antimicrobianos (*síntesis de novo*), basándose en las características y mecanismos de acción de estos péptidos naturales. De esta manera se han abierto nuevas perspectivas en la concepción de los tratamientos terapéuticos contra las infecciones (Smith y Hillman, 2008, Rink y col., 2010, Nagao y col., 2011, Lohans y Veredas, 2012).

3.4. Bioensayos para bacteriocinas, interacciones antimicrobianas

La mayor dificultad en la investigación de bacteriocinas y sus aplicaciones se encuentra en la obtención de cuantificaciones precisas usando bioensayos (Rasch y col., 1998). Aunque se han descrito varios métodos, tales como ELISA (Bouksaim y col., 1999), bioluminometría asociada a ATP (Waites y Ogden, 1987), ensayos de radiometría (Culter y col., 1989), mediciones de conductancia (Giraffa G, 1990), o incluso técnicas sofisticadas de autoinducción de un promotor *nis* y bioluminiscencia (Walstrom y col., 1999), no son ampliamente aceptados porque requieren de equipamientos e insumos costosos, y además los resultados con estos métodos, no se correlacionan necesariamente con la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas (Turcotte y col., 2004). Por ello, las técnicas de inhibición del crecimiento mediante difusión en placa de agar o en medios líquidos por turbidimetría (Nunez y col., 1996, Cabo y col., 1999), continúan siendo las más utilizadas en los ensayos diarios (Papagianni y col., 2006, Pascual y col., 2008b, Ruiz y col., 2009). Para determinar

efecto inhibitorio de sustancias con actividad antimicrobiana se utilizan habitualmente ensayos de microdilución en caldo o de difusión en agar (Stubbings y col., 2004). La microdilución en caldo es conveniente y ampliamente usado para probar la susceptibilidad a diferentes antimicrobianos sobre un gran número de aislados bacterianos (Rahman y col., 2004). La determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) es un método esencial para la cuantificación de la actividad antimicrobiana.

Para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana de bacteriocinas, algunos investigadores realizaron adaptaciones de las técnicas de CIM empleadas para antibióticos. Uno de los primeros trabajos para ejemplificar, fue el de Mota-Meira y colaboradores (2000), donde evaluaron la eficacia de la mutacina B- Ny 266 con respecto a nisina A, una variante de nisina disponible comercialmente y se comparó con concentraciones subinhibitorias de antibióticos sobre un grupo de bacterias patógenas. Brumfitt y colaboradores, (2002), empleando otra nisina, nisina Z, en combinación con antibióticos de pared celular, evaluaron *in vitro* la efectividad de la aplicación de esta sustancia sobre *S. aureus* y enterococos resistentes a metilicina y vancomicina, respectivamente. En ambos trabajos la CIM se determinó empleando mediciones turbidimétricas de la densidad bacteriana y se expresaron los valores en concentraciones de masa/volumen, ya que se trataron de bacteriocinas disponibles en el mercado. A diferencia de estos últimos, en el trabajo de Melacom y col., (2003) con bacteriocinas de bacterias aisladas de origen porcino, se evaluó la acción inhibitoria de estas sustancias realizando la CIM con mediciones de densidad óptica y se expresaron las concentraciones en unidades de actividad de bacteriocina por mililitro. Recientemente un grupo de investigadores propone un método más preciso para la cuantificación de la actividad inhibitoria de bacteriocinas disponibles en el mercado, tomando como ejemplo el antibiótico nisina, mediante la lectura fotocolorimétrica del cambio de color de una sal de tetrazolio (Wang y col., 2007). La administración de dos o más antimicrobianos puede producir varios efectos en la actividad combinada, por lo que es necesario estudiar previamente las interacciones *in vitro* de dichas sustancias. La modificación producida como consecuencia de las interacciones puede suponer el aumento, adición o disminución de la intensidad de la respuesta frente a la combinación de dos o más sustancias con actividad antimicrobiana (Barcia Hernández y Negro Álvarez, 2002). La actividad combinada de dos o más compuestos antimicrobianos puede resultar en las siguientes interacciones:

- Sinergismo: se da cuando la presencia conjunta de dos o más sustancias antimicrobianas produce un efecto inhibitorio mayor al obtenido con cada sustancia de manera independiente. Se conocen dos tipos de sinergismo: a) sinergismo de suma o aditivo; en el que la actividad antimicrobiana producida por la acción de las sustancias combinadas es igual a la suma de los efectos inhibitorios de cada

compuesto por separado y b) sinergismo de potenciación; se produce cuando la actividad inhibitoria de las sustancias combinadas resulta superior a la suma de la inhibición individual de los compuestos antimicrobianos;

- Antagonismo: el efecto inhibitorio encontrado como producto de la interacción entre las sustancias combinadas, es menor a la suma de las actividades inhibitorias de los dos antimicrobianos por separado;
- Indiferencia: ocurre cuando la actividad antimicrobiana de las sustancias combinadas, es igual al efecto inhibitorio producido por alguno de los dos compuestos por separado (Castells y Hernandez Perez, 2007). Entre las técnicas recomendadas por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (2001) para demostrar las interacciones de dos o más antimicrobianos se pueden mencionar las técnicas de tablero de ajedrez, curvas de letalidad y los métodos de difusión en agar. El método del tablero, es uno de los más empleados en los estudios de sustancias combinadas con actividad antimicrobiana (García Rodríguez y col., 2001).

Hasta el momento no existen estudios que utilicen combinaciones de bacteriocinas producidas por especies de *Lactobacillus* humanos, evaluando su actividad antimicrobiana *in vitro*. En la búsqueda bibliográfica tampoco se han encontrado trabajos donde hayan utilizado mezclas de bacteriocinas aisladas del microorganismo productor o inclusive, considerando la aplicación directa de probióticos productoras de estos metabolitos, inhibiendo a microorganismos patógenos de infecciones del tracto urogenital o de sepsis neonatal, como en el caso de *Streptococcus agalactiae*.

Estudios previos realizados en el laboratorio de Bacteriología sobre las cepas *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60, determinaron que ambas cepas producían una variedad de metabolitos activos, entre los cuales se hallaban dos bacteriocinas identificadas respectivamente como L23 y L60 (Pascual, 2004; Pascual y col., 2006, Pascual y col., 2008a,b, Daniele y col., 2011). Asimismo, ambos lactobacilos presentan importantes características probióticas y un amplio espectro de actividad antimicrobiana que sumadas al potencial bacteriocinogénico validan la selección de estos microorganismos como potenciales candidatos para la prevención y tratamiento de infecciones genitourinarias.

3.5. Actividad hemolítica de las bacteriocinas

Durante los últimos años distintos comités de expertos han desarrollado guías estándares sobre los probióticos para determinar propiedades nutricionales y de salud que deberían producir estos microorganismos en el huésped. Además de la correcta identificación de las especies o cepas seleccionadas y de los distintos ensayos *in vitro* que permitan delinear los mecanismos de acción de los microorganismos potencialmente

probióticos, también se han recomendado un mínimo de determinaciones para evaluar la seguridad de los mismos en el hospedero, entre ellas el estudio del potencial hemolítico, ya sea de la cepa probiótica como también de sus metabolitos (FAO, 2006, NHPD, 2006, EFSA, 2007, EFFCA, 2008, Sanders y col., 2010, Venugopalan, 2010, Bal y col., 2011, Sieladie y col., 2011, ICMR-DBT, 2011, Shekh y Roy, 2012).

La actividad hemolítica que poseen determinados microorganismos es considerada uno de los factores de virulencia más importantes a la hora de comprobar la bioseguridad de cepas microbianas, como por ejemplo aquellas con características probióticas (García-Rodríguez y Picazo, 1999, Riley y Gordon, 1999, Kerr y col., 2002, Riley y Wertz, 2002).

Los lactobacilos productores de estas sustancias como así también, otras bacterias destinadas a su uso como probióticos, deben asegurar ser inocuos mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* entre los cuales se estudia la actividad hemolítica (Snydman, 2008).

4. Las herramientas moleculares en microbiología como complemento para filogenia

En el área de la microbiología clínica, la identificación del agente etiológico responsable de una infección, el estudio de su patología y la búsqueda de una terapia antimicrobiana lo más efectiva posible es una actividad que usualmente se realiza mediante métodos correctos, aunque históricamente convencionales, tales como las características culturales y fenotípicas de los microorganismos aislados. En los últimos años un complemento muy utilizado, a las claves de taxonomía por medio de pruebas bioquímicas, lo constituyen las técnicas moleculares (Fernandez-Cuenca, 2004, Scott y col., 2004, Petti, 2007, Woo y col., 2008, SEIMC, 2010).

Las relaciones filogenéticas de las bacterias, y de hecho de todas las formas de vida, pueden ser determinada mediante comparación de una parte estable o conservada del código genético. En la célula bacteriana se encuentran los genes que codifican para los ARN ribosomales, los cuales están organizados en operones (conjunto de genes que se transcriben a partir de la misma región promotora). Cada operón ribosómico (*rrn*) contiene genes para los ARNr 5S (*rrf*), 16S (*rrs*), 23S (*rrl*), separados por regiones espaciadoras o intergénicas (IG), y genes para uno o más ARN de transferencia (ARNt). El producto de la transcripción del operón a partir de dos promotores, P1 y P2, situados en la región anterior a *rrs*, es procesado por la enzima ARNasa III, mediante cortes en sitios específicos que separan las tres clases de ARNr, el/los ARNt y las dos regiones IG (Figura 5) (Rodicio y Mendoza, 2004).

La parte del ADN más comúnmente utilizada con propósitos taxonómicos en bacterias es la del gen que codifica para el ARN ribosómico 16S (Garrity y Holt, 2001; Harmsen y Karch, 2004). La importancia que posee la macromolécula del ARNr 16S es el grado de conservación en este fragmento, siendo un componente crítico de la función

celular bacteriana y útil como cronómetro molecular. Sólo algunos otros pocos genes, están tan altamente conservados como el gen 16S del ARN ribosómico y esto lo convierte en un marcador ideal de distancia evolutiva y de las relaciones entre los organismos. Aunque existen herramientas moleculares alternativas al ARNr 16S, hasta el momento ninguno ha conseguido desplazarlo (Case y col, 2007, Pruesse y col, 2007).

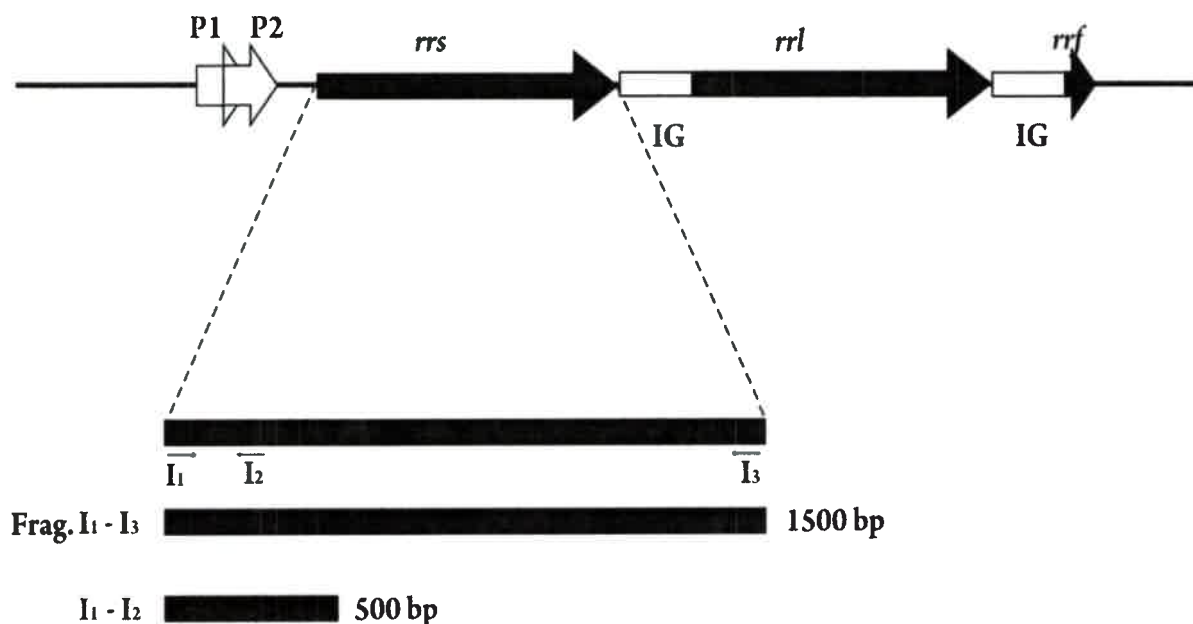


Figura 5. Operón ribosómico (*rrn*). Se muestran los tres tipos de ARNr (genes *rrs*, *rrl* y *rrf*), los promotores P1, P2 y las regiones intergénicas (IG). Los fragmentos del gen *rrs* mas abajo representan una estrategia de amplificación, donde se indican las posiciones de los iniciadores I₁(directo), I₂, I₃ (reversos) para obtener 500 -1500 bp.

4.1. Estructura del gen ARNr 16S

La secuencia de nucleótidos del gen 16S ARNr o ADN ribosomal (ADNr 16S) está codificada por el gen *rrs*, tiene una longitud de aproximadamente 1550 pb y se compone de regiones variables y conservadas, siendo las regiones variables específicas de especie, mientras que las otras son las que confieren el carácter de universalidad a dicha molécula (Petti, 2007). En eucariotas el ARNr 18S es la macromolécula equivalente. Dado que los ARNr 16S y 18S proceden de las subunidades pequeñas de los ribosomas, el acrónimo ARNr SSU (del inglés, small subunit) se utiliza para ambos. Los ARNr SSU se encuentran altamente conservados, presentando regiones comunes a todos los organismos, donde se encuentran los llamados genes "housekeeping" o genes de expresión constitutiva (se expresan siempre), encargados del metabolismo básico de la célula e involucrados en el buen funcionamiento celular (Pfaff y col, 2005). Así mismo, estas moléculas contienen variaciones o acumulación de mutaciones que se concentran en zonas específicas y que son diferentes según las especies. Dichas secuencias específicas cortas se conocen como

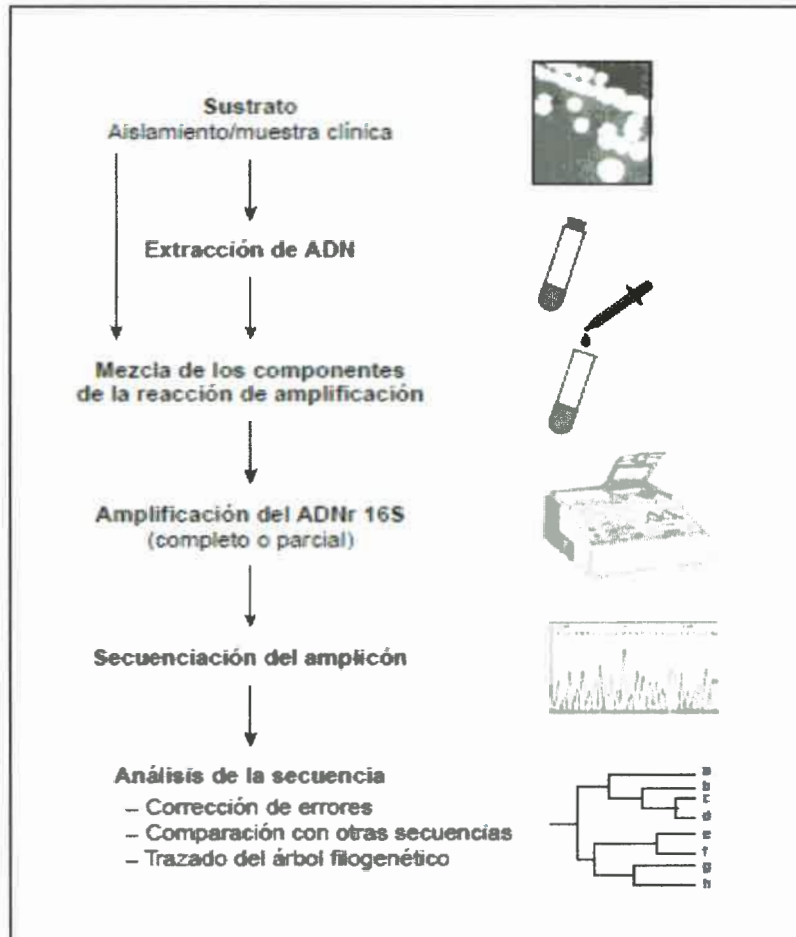
oligonucleótidos “firma o *signature*” y aparecen en todos (o en la mayor parte de) los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca (o sólo raramente) están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por ello, los “oligonucleótidos firma” pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo (Rodicio y Mendoza, 2004). La secuencia del gen ARNr 16S presenta de forma aproximada 1.500 pb, y se compone de 9 zonas variables (V1-V9) y zonas conservadas. Este tamaño proporciona suficiente polimorfismo interespecífico para diferenciar y establecer medidas estadísticamente válidas, que le permiten distinguir la identidad de los microorganismos. Los cebadores universales suelen ser elegidos complementarios a las regiones conservadas en el inicio del gen, en la zona de 540 pb y al final de toda la secuencia (de la región de 1.550 pb). Las zonas variables, comprendidas entre estas zonas conservadas, son las regiones utilizadas para realizar una taxonomía comparativa (Clarridge, 2004, Hunt y col, 2006, CLSI, 2008; Kommedal y col, 2008, Sontakke y col., 2009, SEIMC, 2010).

Sin embargo, cuando existe alta homología genética en determinados géneros bacterianos o un reciente cambio en su asignación taxonómica, se puede recurrir a otros genes dianas que también tienen una distribución semejante al ARNr 16S, entre ellos se pueden mencionar: la secuencia del ARNr 23S; las regiones del espacio intergénico del ARNr 16S-23S (ITS), que varían en función al número, tamaño y tipo de operones o alelos de *rrn* que contengan las distintas especies y cepas de una misma especie; el gen *rpoB* que codifica para la subunidad β de la ARN polimerasa (ARNP), principal responsable de la actividad catalítica de la ARNP encargada de la transcripción de los ARNm, ARNr y ARNt bacterianos y el gen *gyrB* que codifica para la subunidad β de la ADN girasa o topoisomerasa II, implicado en la replicación del ADN bacteriano y que es útil para realizar estudios filogenéticos en numerosos géneros, permitiendo establecer diferencias inter e intraespecies. Aunque no son los únicos genes o secuencias dianas complementarias al ARNr 16S, todos ellos son frecuentemente utilizados en estudios taxonómicos, evolutivos, de ecología, filogenia y como herramientas en el diagnóstico clínico (Sadeghifard y col, 2006; Woo y col, 2008; Adékambi, 2009; Pei y col, 2009).

4.2. Metodología para la identificación bacteriana mediante la secuenciación del ADN/ARNr 16S

El método molecular de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S incluye tres etapas: a) extracción del ADN cromosómico y amplificación del gen a partir de la muestra apropiada; b) determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón, y c) análisis de la secuencia. Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre los ADNr 16S de las bacterias lo que indique su relación evolutiva. Además, el análisis comparativo de secuencias permite

construir árboles filogenéticos, que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados (Rodicio y Mendoza, 2004, SEEIMC, 2010). La Figura 6 esquematiza las etapas a considerar en la identificación molecular.



Rodicio y Mendoza, 2004

Figura 6. Etapas en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S.

5. Filogenia molecular, métodos de análisis para la elaboración del árbol filogenético

Los métodos de identificación molecular desarrollaron lo que hoy se conoce como filogenética computacional, es decir, la aplicación de algoritmos computacionales, en métodos y programas de análisis sistemáticos, con la finalidad de construir un árbol filogenético para evaluar las relaciones entre genes específicos compartidos por varios microorganismos (Felsenstein, 2004; Mount, 2004). Los métodos más usados para hacer dendogramas son el NJ (*neighbor-joining*) o "reunión por vecindad"; UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic average*) o método de agrupación por pares no ponderado, utilizando promedios y WPGMA (*weighted pair group method with arithmetic average*) o método de agrupación por pares ponderados y con media aritméticas (Purdom,

2000, Takahashi y Nei, 2000, Clarridge, 2004). En el método NJ se utilizan técnicas generales de lectura de datos, para el análisis de las secuencias de nucleótidos y se emplea la distancia genética, como un medidor de agrupación. Por medio de este método se producen árboles no enraizados y no se asume una tasa constante de evolución entre los linajes (especies o cepas) (Simmons, 2004). Contrariamente, el método relacionado UPGMA produce árboles enraizados y requiere presuponer una tasa constante de evolución, es decir, se asume un dendrograma en el que las distancias desde la raíz a cada extremo de las ramas son iguales (Gascuel, 2006; Didelot, 2010). En general, estos métodos son comparables y la mayoría de los agrupamientos o *clusters* se mantienen, si los microorganismos están estrechamente relacionados (Soll y col., 2003, Clarridge, 2004). Los dendrogramas o cladogramas generados con estos algoritmos a partir de los marcadores moleculares deberían ser considerados como una forma práctica para visualizar el grado de relación entre cepas e identificar grupos o *clades* (Ritcher, 2005).

Algunos árboles filogenéticos suelen contener un grupo externo, es decir, una secuencia primaria contra la cual es comparado un alineamiento problema. Esta secuencia (o conjunto de secuencias) está solamente relacionada de forma distante con las secuencias de interés y se puede entender como grupo control. Si el grupo externo se elige bien, debería estar separado de los demás, por una mayor distancia genética, y por lo tanto, en el árbol será una rama de mayor longitud que el resto y con un nodo más cercano a la raíz. De esta manera se pueden realizar las inferencias filogenéticas en función de la distancia que comparten o no los microorganismos y así, reconstruir un "árbol" (Van Belkum y col., 2001, Santos, 2004, Simmons, 2004, Weber y col., 2006).

5.1. Aplicaciones de la secuenciación de genes conservados para la identificación y evaluación de la relaciones filogenéticas bacterianas

La adopción de herramientas moleculares por los microbiólogos ha aumentado rápidamente nuestro conocimiento sobre la abundancia, diversidad y función de los procariontes. Ciertas herramientas moleculares como las librerías de clones, la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), los métodos "fingerprinting" o de fragmentos huella (electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) y el análisis de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP) de longitud polimorfa o variable) son comúnmente usados y miden respectivamente un aspecto diferente de la comunidad, ya sea, diversidad, detección *in situ* y la dinámica dentro de la misma. Aún así, todos ellos utilizan a un único gen como es el ARNr 16S, para diferenciar unidades taxonómicas operacionales (UTO) (Case y col, 2007).

Una forma de estudiar microorganismos de distintos orígenes, es mediante el análisis por secuenciación que se utiliza para el estudio y comparación de aislados de diferentes áreas geográficas y su evolución en el tiempo (SEEIMC, 2010). De esta manera

se establecen inferencias filogenéticas dada la diversidad que presentan las cepas de *S. agalactiae*. Algunos estudios intentan explicar la persistencia de las infecciones producidas por SGB en función de la amplia distribución ecológica de este microorganismo, ya sea como bacteria patógena o comensal. Si bien se sabe que los humanos y los bovinos son los principales reservorios de este estreptococo piogénico, *S. agalactiae*, también se pueden citar otros diversos animales como por ejemplo: perros, caballos, cerdos de guinea, peces y delfines (Evans y col, 2002, Salvador y col, 2005, Zapulli y col, 2005, Brochet, 2006, Evans y col 2006, Oliveira y col, 2006, Evans y col, 2008).

6. Enfermedades de transmisión sexual. Infecciones genitourinarias

Las enfermedades de transmisión sexual (ETS) son uno de los problemas de la salud mundialmente subestimados. Muchas personas con estas infecciones no presentan síntomas y permanecen sin diagnóstico. Además, las enfermedades que son diagnosticadas, frecuentemente no son informadas o relevadas a los sistemas de vigilancia epidemiológica en distintos países. Muchos de los datos publicados sobre la prevalencia e incidencia de las ETS provienen de países desarrollados. A pesar de las dificultades en el seguimiento de estas enfermedades en la población, la Organización Mundial de la Salud estimó anualmente un índice global para las ETS curables (excluidos HIV y hepatitis virales) de 448 millones de casos nuevos, de los cuales 248 millones son a tricomoniasis, 101 millones son infecciones por *C. trachomatis*, 88 millones de casos son por infecciones gonocócicas y 12 millones fueron referidas a sífilis, afectando un rango etario de 15-49 años (WHO, 2005, 2007, Chinsembu, 2009, Coffin y col., 2010, Mabey y col., 2010, WHO, 2011, Sutcliffe y col., 2012). En los Estados Unidos un estudio indicó que más de 65 millones de personas padecían ETS incurables y que 15 millones de ellas se infectaban con uno o más agentes etiológicos cada año. Aproximadamente un 25 % de esas nuevas infecciones ocurren en los adolescentes y adultos jóvenes (<24 años) (Forhan y col., 2009, Wolfers y col., 2011). Mientras algunas de las ETS como la sífilis presentan baja incidencia, otras como el herpes, la gonorrea y las infecciones por *C. trachomatis* continúan resurgiendo y diseminándose a través de las poblaciones a nivel mundial (Madani, 2006, CDC, 2010a, ECDC, 2010).

En países como Canadá y los Estados Unidos, las infecciones genitourinarias en las mujeres, incluidas aquellas que afectan la vejiga, riñones, vagina, uretra, periuretra y cérvix, llevan una alta incidencia de consultas médicas (>7 millones/año) y un enorme costo económico por tratamiento (>1.6 billones de dólares/año) principalmente para los sistemas de salud público (Reid, 2006, Salvatore y col., 2011). En la mayoría de los hospitales y centros de salud del mundo, no es un tema menor debido a la elevada frecuencia y recurrencias de estas infecciones que deterioran la calidad de vida de las pacientes. Siendo

generalmente la población joven en edad reproductiva (16-35 años) y las mujeres embarazadas, la más afectada (Biggs y Williams, 2009, Graver y Wade, 2011, Giraldo y col., 2012).

Aún hoy, en varios países del mundo (desarrollados y subdesarrollados), las infecciones de transmisión sexual (ITS) y aquellas del TGF que involucran descargas vaginales (VB, VCV, VA), cuando no son tratadas, se asocian en las mujeres no solo a complicaciones obstétricas y ginecológicas, sino también con infecciones congénitas y perinatales en los neonatos. Particularmente en las mujeres gestantes, algunas de estas complicaciones incluyen abortos, alumbramiento de neonatos muertos, partos prematuros, niños de bajo peso, sepsis posparto, neumonías, meningitis, ceguera neonatales, etc. Sin embargo, en los individuos tratados, las resistencias adquiridas por tratamientos prolongados con antibióticos de amplio espectro, afectan el balance de la biota vaginal y también aumentan el riesgo de contraer una variedad de infecciones en el tracto vaginal (Sandoval y col., 2008, Wiggert y col., 2008, Msuya y col., 2009). Por ello, en varias regiones del mundo el control de las infecciones del tracto genital femenino es una prioridad que requiere el desarrollo de nuevas o inclusive mejoradas estrategias de control y tratamiento.

A continuación dentro de las infecciones del tracto genitourinario se procederá a describir específicamente aquellas producidas por *N. gonorrhoeae* y *S. agalactiae* y la problemática actual de la resistencia antimicrobiana de ambos microorganismos patógenos.

6.1. Infecciones por *Neisseria gonorrhoeae*

Neisseria gonorrhoeae es un microorganismo patógeno humano y el agente causal de la gonorrea, una enfermedad bacteriana de transmisión sexual (ETS) que también es referida con el nombre de "blenorragia", "purgaciones" o "gota militar" (Spurbeck y Arvidson, 2008). En base a sus características morfológicas, tintoriales y culturales, *N. gonorrhoeae* es un diplococo Gram negativo, unido por sus caras aplanadas con un aspecto similar a granos de café. Este microorganismo es aerobio estricto, oxidasa y catalasa positivo, nutricionalmente exigente y muy sensible a las condiciones ambientales, razón por la cual su transmisión siempre es directa de persona a persona. Cuando son observados microscópicamente a partir de un directo se los puede encontrar en gran número como diplococos intracelulares en polimorfonucleares, situación congruente con una verdadera infección gonocócica. Se diferencia de otras especies de *Neisseria* mediante la utilización de hidratos de carbono, produciendo ácidos solo a partir de la glucosa (Janda y Gaydos, 2007, Sandoval y col., 2008, Hook y Handsfield, 2008, Sparling, 2008).

Las infecciones gonocócicas producen cervicitis en la mujer; uretritis, faringitis y proctitis en ambos sexos. El 45% de las mujeres infectadas sin tratamiento pueden experimentar severas secuelas de enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), dolor pélvico

crónico, embarazos ectópicos e infertilidad, mientras que los hombres pueden desarrollar otras complicaciones como epididimitis, prostatitis y obliteración uretral. Ocasionalmente algunos individuos con gonorrea (1-3%) pueden padecer infecciones diseminadas con complicaciones sistémicas (tenosinovitis poliarticular, artritis séptica, lesiones petequiales o pustulares), mientras otros pueden tener infecciones asintomáticas y transmitir gonococos. De hecho, principalmente en las mujeres la prevalencia de esta enfermedad se relaciona con una alta frecuencia de infecciones asintomáticas o subclínicas, a diferencia de lo que ocurre en los hombres donde las infecciones gonocócicas se presentan con síntomas en su gran mayoría. Por ejemplo, las infecciones en orofaringe y anorectales suelen ser asintomáticas y pueden adquirirse por prácticas sexuales receptivas orales y/o anales, o por contaminación con secreciones cervicales desde el perineo. Dado que este microorganismo en las mujeres infecta el canal endocervical, las infecciones urogenitales por gonococo pueden ser sintomáticas o asintomáticas y se producen con elevada frecuencia, siendo la infección uretral una de las más comunes en las pacientes infectadas (70-90%), aunque también ocurren infecciones en las glándulas periuretrales y de Bartolino, con secreciones purulentas ocasionales. Los síntomas más significativos en las mujeres con infecciones urogenitales ocurren en un período incierto de 10 días y se caracterizan por elevada descarga vaginal, disuria, sangrado uterino intermenstrual, los cuales pueden presentarse de manera aislada o combinada con variada intensidad. La queratoconjuntivitis gonocócica en los adultos se presenta ocasionalmente, y se origina por autoinoculación con las secreciones genitales de pacientes infectados o por contacto con las exudaciones de sus parejas. Esta conjuntivitis se presenta en un corto periodo de incubación (2-5 días) y se caracteriza por una severa descarga purulenta que penetra rápidamente la cornea y produce una fuerte inflamación (endofalmitis). En cambio en los recién nacidos de gestantes infectadas, su pasaje a través del canal de parto los deja más expuestos a secreciones que producen la oftalmia neonatal, aumentando el riesgo de ceguera (Miller, 2006, Buvé y col., 2008, Quirke y Cullinane, 2008, Al-Sweiha y col., 2011, Shim, 2011, Unemo y Dillon, 2011, Bleich y col., 2012).

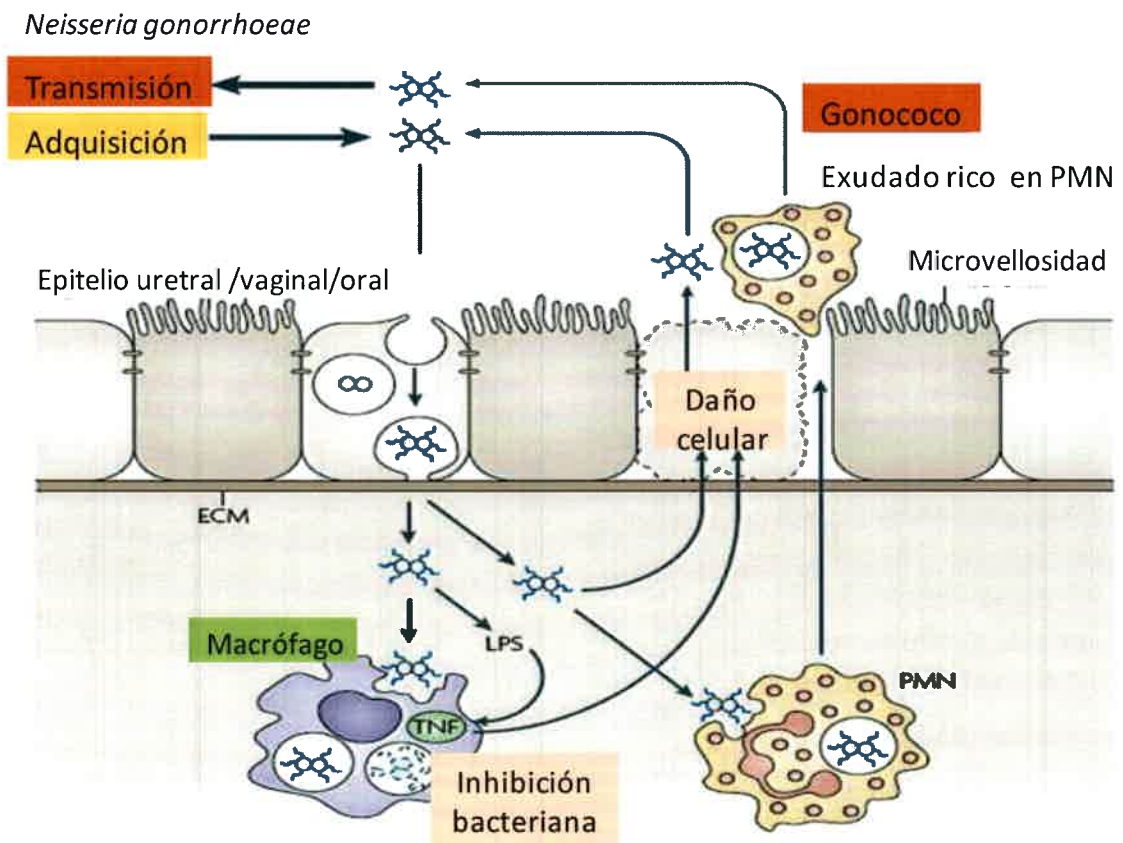
En los Estados Unidos, el último informe del CDC sobre la vigilancia de las ETS durante el 2010 estimó una tasa de 700.000 nuevos casos de infección a gonococo por año, principalmente en adolescentes (15-24 años) y adultos (30-34 años) (CDC, 2010a). En nuestro país la gonorrea, también es una enfermedad de notificación obligatoria (ENO) del Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS) perteneciente al Ministerio de Salud de la Nación y representa la segunda ETS denunciada, después de sífilis. Según el informe epidemiológico del SNVS durante el año 2008, Argentina presentó una tasa de infección de 1,45/10.000 habitantes en los jóvenes entre 15-24 años, disminuyendo hasta un valor de 0,82/10.000 habitantes en individuos entre 35-44 años, siendo las regiones del noroeste

(NOA) y noreste (NEA) las de mayor incidencia. Particularmente, en la provincia de Córdoba se relevaron los distintos departamentos y se halló una frecuencia de infección que oscilaba entre 0,31 hasta 1,58 en determinadas zonas (Maggi y col., 2006, SNVS, 2008). Sin embargo, durante el periodo 2010-2012 en esta provincia del centro del país se registraron valores progresivamente mayores en las tasas de infección gonocócica desde 0,94 (2010), 1,24 (2011) y hasta el mes de agosto de 2012 se alcanzó una tasa de 4,74 (SNVS, 2012). En las mujeres jóvenes y en edad reproductiva, este agente etiológico tiene el más alto impacto de morbilidad, agravando esta situación las co-infecciones con *C. trachomatis* y además, el alto riesgo de adquirir otras infecciones como sífilis, HIV y/o hepatitis B. Algunos factores que están asociados con la prevalencia mundial de esta infección son el inicio en edad temprana de la actividad sexual, variadas prácticas sexuales con ausencia del uso de profilácticos, promiscuidad sexual, prostitución, uso de drogas y/o alcohol, mujeres con previas infecciones a gonococo u otras ITS, bajos recursos económicos y educación (CDC, 2010a, ECDC, 2010, Shim, 2011, Zhu y col., 2011, Badescu y col., 2011).

6.2. Mecanismo de patogenia

Los gonococos son patógenos de las mucosas que invaden y como tales, deben persistir e impedir ser eliminados por las descamaciones de las células del epitelio oral o vaginal, el flujo de las secreciones salivares o cervicales, la acción de los anticuerpos y polimorfonucleares (PMN). Para ello, la adherencia de *N. gonorrhoeae* a los receptores de los epitelios es un paso inicial fundamental en su mecanismo de infección. En el tracto urogenital, los gonococos establecen contacto con las células no ciliadas de los epitelios y mediante las adhesinas pili IV ubicadas en las fimbrias que sobresalen de la superficie del soma bacteriano y la proteína de membrana externa Opa se unen a los receptores de las células epiteliales, células dendríticas o fagocitos, aunque también pueden participar otros componentes como el LPS y porinas. Desde el lumen de la mucosa, estos cocos Gram negativos pueden invadir los epitelios atravesando las células eucariotas en fagolisosomas, los cuales son dirigidos mediante reordenamientos de fibras de actina hacia el espacio subepitelial de la submucosa, donde al cabo de 2 días el LPS con actividad endotoxina induce una fuerte reacción inflamatoria con la llegada de numerosos PMNs al sitio de infección y daño local, mientras escapa a la acción del complemento, IgA y los fagocitos, llegando a la sangre (bacteriemia) para su diseminación. Además el LPS estimula a los fagocitos para producir factor de necrosis tumoral (TNF) que liberado, causa un mayor daño citotóxico en los epitelios, contribuyendo con exudados ricos en PMNs, detritos celulares y gonococos (Figura 7). La inflamación en la mucosa uretral masculina es responsable de la disuria y descarga uretral blanquecina y purulenta, característica de infección por gonococo, no así en las mujeres infectadas asintomáticas. Sin embargo, aquellas que presentan un cuadro agudo de cervicitis gonocócica manifiestan secreción purulenta, profusa, inodora,

color blanco crema o amarillo y vulvovaginitis secundaria durante 2 a 3 semanas, luego desaparece la inflamación y se adopta el curso crónico, caracterizado por una secreción escasa, aspecto seroso, alternando con secreciones purulentas. En esta etapa, el microorganismo asciende por las glándulas de Bartholino, el endometrio, trompas de Falopio, provocando la enfermedad inflamatoria pélvica (EIP). Esta última, de extrema gravedad ya que produce abortos e infertilidad causada por lesiones u obstrucciones en los tubos por donde pasa el óvulo o huevo fecundado. Así el exudado inflamatorio y el pus pasan el extremo fimbriado de las trompas de Falopio hasta la cavidad peritoneal, comprometiendo ovarios, fondo de saco y peritoneo pélvico (Spurbeck y Arvidson, 2008, Furuya y Tanaka, 2009, Virji, 2009).



Virji, 2009

Figura 7. Mecanismo de patogénesis en *Neisseria gonorrhoeae*. Referencia. ECM, matriz extracelular.

7. Infecciones por *Streptococcus agalactiae*

De acuerdo a la clasificación de Lancefield el estreptococo grupo B, *Streptococcus agalactiae* (SGB), es la principal causa de morbilidad y mortalidad entre los neonatos. Se estima que el 20-30% de las mujeres embarazadas son colonizadas

vaginalmente por SGB, siendo esto el primer factor de riesgo para las enfermedades neonatales de comienzo temprano y tardío (van der Mee-Marquet y col., 2009, Valkenburg-van den Berg y col., 2010, Stoll y col., 2011). Sin embargo, también es un reconocido agente patógeno asociado a septicemias, meningitis, neumonía, endocarditis, infecciones del tracto urinario, de la piel e infecciones de tejidos blandos, estas últimas especialmente en adultos mayores (Edwards y Baker, 2005, Falagas y col., 2006, Phares y col., 2008, Matsubara y col., 2009, Corvec y col., 2011, Chaiwarith y col., 2011).

Los estreptococos grupo B son cocos Gram positivos, catalasa y oxidasa negativos, anaerobios facultativos, y se observan al microscopio formando cadenas de longitud variable en los cultivos y más cortas en las muestras clínicas. Forman colonias mantecosas y de mayor tamaño que la de los estreptococos del grupo A, generalmente se rodean de una estrecha β -hemólisis. El antígeno polisacárido de pared celular específico de grupo se compone de ramnosa, N-acetilglucosamina y galactosa hecho que lo diferencia de otros grupos según la clasificación de Lancefield (Edwards y col., 2006, Koneman, 2008, Bergey, 2009a). Las variaciones de la estructura polisacárida capsular y el antígeno proteínico superficial permiten la distinción de 13 serotipos de SGB, de los cuales 9 son de importancia clínica (Ia, Ib, II-VIII). Algunos estudios de USA y Europa han informado que entre el 80-90% de los aislados clínicos de SGB, los serotipos Ia, II, III, IV y V son los más prevalentes (Barcaitey col., 2008, Manning y col., 2008, El-Aila y col., 2009, Rajagopal, 2009, Wolny y Gołda-Matuszak, 2010, Kiely y col., 2011). Cierta número de serotipos han sido correlacionados con distintas infecciones, por ejemplo el serotipo Ia fue aislado principalmente en meningitis, mientras que las infecciones en sangre se relacionan con el serotipo III, las de piel y tejidos blandos con el serotipo V, las infecciones urinarias con los serotipos III y V y las del tracto respiratorio se asocian preferentemente con el serotipo IV de SGB. Sin embargo la prevalencia de determinados serotipos antigénicos también varía con la distribución geográfica, por ejemplo en USA el serotipo más comúnmente encontrado entre los adultos es el serotipo V, en Irlanda el serotipo IV y en Japón el serotipo III (Chaiwarith y col., 2011, Kiely y col., 2011).

En el hombre este microorganismo puede colonizar una variedad de nichos ecológicos como el tracto respiratorio alto, digestivo y genitourinario (Bergey, 2009). Sin embargo, se considera que el tracto gastrointestinal es el reservorio primario humano del SGB y la principal fuente de colonización vaginal en las mujeres embarazadas, siendo ésta transitoria, intermitente o crónica (CLAP/SMR y OPS/OMS, 2008, Szwabowicz y Panasiuk, 2012). Los estudios epidemiológicos sugieren que la raza negra, las múltiples parejas sexuales, el aumento de la edad materna, abortos espontáneos previos, alta actividad sexual y alteraciones en el balance de las comunidades de microorganismos de la vagina (con disminución de especies de lactobacilos y aumento de especies de *Candida*), son

algunos factores de riesgos que favorecen la colonización vaginal por *S. agalactiae* (Kim y col., 2011, Rochetti y col., 2011).

7.1. Estado actual de las infecciones por *Streptococcus agalactiae*

7.1.2. Infección en mujeres embarazadas

En general la colonización vaginal por *S. agalactiae* no ocasiona problemas en las mujeres sanas antes del embarazo. Sin embargo, en las últimas décadas SGB ha reemergido como un patógeno relevante, por ello investigar la colonización del tracto genital femenino y/o anorectal por este microorganismo cobra importancia en las mujeres embarazadas debido a las posibles infecciones durante la gestación como también, un elevado riesgo de infección perinatal, ya que SGB posee un gran poder de recolonización que lo hace difícil de erradicar como patógeno (Rinaudo y col., 2010, Sharmila y col., 2011). La tasa de colonización de SGB en la vagina o recto de mujeres embarazadas puede variar según el grupo étnico, la región geográfica, la edad, número de pariciones, nivel socioeconómico, ITS y conductas sexuales de las mismas (Foxman y col., 2007, Mavenyengwa y col., 2010, Lee y col., 2010). Algunos estudios sobre la frecuencia de colonización materna han informado una tasa entre el 4-40% alrededor del mundo, lo cual representa un dato valioso para la profilaxis temprana de las infecciones producidas por este microorganismo (Barcaite y col., 2008, Elbaradie y col., 2009, Joachim y col., 2009, Szwabowicz y Panasiuk, 2012). De hecho se asume que prácticamente el 100% de mujeres se colonizarán en algún momento de su vida (CLAP/SMR/OPS/OMS, 2008).

En USA el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) junto a organizaciones norteamericanas de médicos obstetras, ginecólogos y pediatras (ACOG y AAP), han desarrollado desde 1990 diferentes estudios de monitoreo de las infecciones producidas por SGB en ese país y realizaron algunos informes y recomendaciones tendientes a prevenir las enfermedades por este microorganismo. Los mismos han sido utilizados por muchos países del continente americano (fundamentalmente países de América latina), donde la información epidemiológica sobre las infecciones producidas por SGB principalmente en neonatos, mujeres gestantes y otros adultos es escasa o insuficiente (Quiroga y col., 2008, Reyna-Figueroa y col., 2008, López García y col., 2012). En el último informe del CDC, se advirtió que las mayores tasas de infecciones por SGB se dieron en niños menores a 1 año con un valor de 62,3/100.000 habitantes, mientras las mujeres en edad reproductiva presentaban una tasa de 7,38/100.000 habitantes y los adultos mayores una prevalencia de 13,1/100.000 habitantes. Asimismo, los individuos de raza negra fueron más afectados con una tasa de 11.1/100.000 habitantes, respecto de los de raza blanca con un valor de 7,7/100.000 habitantes (CDC, 2012). En otro estudio de vigilancia epidemiológica, se estimó que en los últimos años SGB causó aproximadamente 1200

casos de enfermedad neonatal temprana por año y aproximadamente el 70% de los mismos se produjo en los recién nacidos a término. Por ello a pesar de las medidas de control en todas las embarazadas, las infecciones de SGB permanecen liderando con elevada morbilidad y mortalidad en los recién nacidos, ya que dicho microorganismo patógeno ha sido aislado en más del 40% de las sepsis neonatales (ABCS, 2009, 2010, CDC, 2010b).

Recientemente en Argentina durante el año 2008 se aprobó la ley nacional 26.369, a partir de la cual se instituye el examen rutinario obligatorio para la detección de estreptococo grupo B a todas las embarazadas con edad gestacional entre las semanas 35 y 37, ya que la colonización al final de la gestación se asocia con enfermedad neonatal de aparición temprana. De esta manera, el Ministerio de Salud de la Nación establece la búsqueda y prevención de las embarazadas como una prestación de rutina reconocida por todos los prestadores públicos y privados de la salud (Ley 26.369, MSN/DNMI, 2010). Hasta el momento en las pacientes gestantes donde se ha detectado este microorganismo se emplea la profilaxis antibiótica intraparto con penicilina o ampicilina, mientras que en las pacientes alérgicas a penicilinas se recomienda el uso de cefazolina, clindamicina, eritromicina y vancomicina (CDC, 2010b, MSN/DNMI, 2010, SEGO, 2012). En salud pública la implementación de nuevas medidas, dentro de las estrategias de control y prevención para las infecciones de SGB, requieren de un punto fundamental que es el conocimiento de la prevalencia de colonización de este microorganismo en las mujeres embarazadas (Quiroga y col., 2008). Sin embargo, en nuestro país no existen estudios de vigilancia epidemiológica nacional sobre las infecciones por SGB, en su lugar los informes de los que se disponen provienen de algunos hospitales estatales y centros privados, situación que no representa los valores de prevalencia en la mayoría de nuestro territorio. En Argentina, la tasa de prevalencia de las infecciones por SGB varía ampliamente entre las áreas geográficas e incluso dentro de diferentes poblaciones. Hasta hace unos años, en algunas regiones de Argentina la prevalencia de SGB en las embarazadas era del 1,4-18%, siendo la tasa de infección neonatal entre 0,3-0,6 niños/1000 nacidos vivos, con un índice de mortalidad del 13-50% (Sutich y col, 2004; Di Bartolomeo y col, 2005, Larcher y col., 2005, Quiroga y col., 2008). Durante el año 2009, un estudio multicéntrico realizado por distintos centros y laboratorios de Capital Federal, La Plata, Bahía Blanca, Mar del Plata, Entre Ríos y Rosario sobre la prevalencia de SGB en las mujeres embarazadas informó una tasa de portación entre todos los centros que osciló entre 5,8-23% y de acuerdo a la edad de la población en estudio, se halló que en un rango de edad comprendido entre 15-44 años la tasa de portación oscilaba entre 14,4 -11,5%, con dos valores máximos en las mujeres de 26-30 años (14,4%) y en las de 31-35 años con un valor del 17,1% (Pérez y col., 2009). En Santa Fe, durante el año 2011 se realizó un estudio de prevalencia de SGB en 487 embarazadas de las cuales 68 fueron colonizadas por SGB, representando una tasa de portación del

13,96% (Vera Garate y col., 2012). Específicamente en la provincia de Córdoba un estudio reciente realizado entre algunos Hospitales y el Ministerio de Salud provincial informaron que durante los últimos años se observaron valores anuales crecientes en la tasa de portación de las embarazadas, en un rango porcentual de 1,46% (2006) a 11,65 % (2009), atribuyendo este último aumento en la detección de SGB a la aplicación de la Ley Nac. 26.369 (Camisassa y Fando, 2011).

La colonización materna por SGB también está asociada con un elevado riesgo de infecciones urinarias que pueden conducir a diferentes inconvenientes durante los embarazos con una frecuencia del 2-4%. Por ejemplo en un estudio realizado en Santa Fé sobre el impacto de la detección de SGB en urocultivos de mujeres embarazadas, se observó que mientras las mujeres gestantes presentaban un bajo nivel de colonización rectovaginal a este microorganismo, la frecuencia de infección urinaria a SGB en dichas mujeres fue alto (13%), con lo cual sin este análisis complementario se elevaría el riesgo de infección neonatal (Giusti y col., 2012). Otras infecciones debidas a la colonización con SGB que suelen adquirir las mujeres son la vaginitis por microorganismos aerobios (VA) y ciertas complicaciones obstétricas tales como endometritis, corioamnionitis, septicemias, ruptura prematura de membranas coriónicas y muerte intrauterina, las cuales ocurren generalmente durante el embarazo o en el período posparto (Donders y col., 2011). La incidencia de sepsis puerperal por SGB se estima en 2 por cada 1.000 partos. Además en algunas mujeres puérperas, se pueden producir infecciones por SGB en heridas quirúrgicas derivadas de cesáreas. Este microorganismo ha sido aislado del 20% de las mujeres con endometritis postparto y es la causa del 20 al 25% de las bacteriemias luego de la operación cesárea. Todas estas complicaciones son factores de riesgo importantes para la enfermedad de aparición temprana en los lactantes (Winn, 2007, MSN/DNMI, 2010, Valkenburg-van den Berg y col., 2010, Kim y col., 2011, Zodzika y col., 2011). La transmisión vertical de la madre al hijo, ocurre antes o durante el nacimiento. La infección fetal intrauterina es el resultado de la propagación ascendente del SGB desde la vagina o durante el pasaje por el canal de parto, en madres colonizadas y habitualmente asintomáticas. Sin embargo, su forma más frecuente de transmisión de madre a hijo ocurre después del comienzo de trabajo de parto o en la ruptura de las membranas. Los recién nacidos pueden contagiarse en su paso a través del canal de parto, mediante la aspiración del líquido amniótico contaminado, por infección debida a la rotura de membranas, o muy raramente cuando el estreptococo invade el torrente sanguíneo materno (CLAP/SMR/OPS/OMS, 2008, Turner y col., 2012).

7.1.3. Infección en el recién nacido

En general se estima que los niños nacidos de mujeres vaginalmente colonizadas por SGB presentan 25 veces más riesgo de desarrollar sepsis perinatal que los neonatos de madres no colonizadas. Aunque más del 60% de los niños nacidos de madres colonizadas tienen cultivos de piel y mucosas positivos a SGB, aproximadamente el 1-2% de estos niños puede desarrollar una infección invasiva por SGB (Sharmila y col., 2011, Szwabowicz y Panasiuk, 2012).

La enfermedad neonatal por este microorganismo puede ser de aparición temprana (durante los primeros 7 días después del nacimiento) o tardía (entre 7–90 días después del nacimiento). La enfermedad de aparición temprana es siempre por transmisión vertical. Por el contrario, en la enfermedad de comienzo tardío no se conoce con certeza el modo de transmisión. Ambas formas de aparición de la enfermedad por SGB son graves y pueden causar la muerte o secuelas permanentes como crisis convulsivas o dificultades en el habla, déficit de audición y/o visión (Heath y Schuchat, 2007, CLAP/SMR y OPS/OMS, 2008).

El 85% de las infecciones neonatales en la enfermedad de comienzo temprano se consideran precoces ya que los recién nacidos en las primeras 24-48 h de vida, pueden presentar dificultad respiratoria, apnea y luego hacia el séptimo día, son comunes la sepsis, neumonía y meningitis. La rápida aparición de los síntomas en el 90% de los recién nacidos se atribuye a la adquisición de la infección intraútero. Esto sucede cuando el SGB asciende de la vagina hacia el líquido amniótico después de iniciado el trabajo de parto o cuando ocurre ruptura de la membrana coriónica, aunque se ha visto que este microorganismo también invade a través de las membranas intactas. Desde el líquido amniótico el SGB puede ser aspirado por los pulmones en el feto y así conducir a una bacteriemia. Por último, el pasaje del neonato a través del canal de parto constituye otra vía de infección ya que la exposición directa con el microorganismo permite la colonización de las mucosas del recién nacido (CDC, 2010b, Edwards y Nizet, 2011).

Además del requisito de colonización materna existen otros factores de riesgo obstétrico como prematuridad (<37 semanas de gestación), ruptura de membranas (>18 h), elevada fiebre intraparto (>38°C) (la cual puede ser indicativa de corioamnionitis), haber tenido un RN previo afectado por SGB, bacteriuria o ITUs en la gestación, que contribuyen a aumentar el riesgo de infección neonatal temprana en más del 75% de los casos. Aunque estas infecciones suelen ser más graves en los nacimientos prematuros, estos alumbramientos solo constituyen el 10 al 12% del total de los nacimientos, por lo que la gran mayoría de las sepsis a SGB se presentan en los recién nacidos a término (MSN/DNMI, 2010, SEGO, 2012).

Durante el año 2008, el Centro Latinoamericano de Perinatología y de Salud Reproductiva de la Mujer junto a las Organizaciones Panamericana y Mundial de la Salud

informaron que en ausencias de medidas preventivas, la incidencia mundial de infección neonatal a SGB presentaba una tasa de 0.6-2.5 casos/1.000 nacidos vivos (CLAP/SMR y OPS/OMS, 2008). Más recientemente, en algunas regiones del mundo las tasas de incidencia de sepsis neonatal son bastante más dispares (Shin y col., 2009, Kim y col., 2011). Sin embargo, además de los factores geográficos y raciales, se debe considerar que la incidencia de infección neonatal también depende de la prevalencia en las mujeres colonizadas. En Argentina según un informe del Ministerio de Salud de la Nación y la Dirección Nacional de Maternidad e Infancia hasta el año 2010, la incidencia de enfermedad neonatal de aparición temprana presentaba una tasa entre 0,3-3/1000 recién nacidos vivos (RNv). En nuestro territorio se estima que existen aproximadamente 700.000 nacimientos anuales, de los cuales 500 RN por año, presentan sepsis neonatal precoz por SGB (MSN y DNMI, 2010).

La tasa de letalidad para las infecciones neonatales por SGB puede variar de un país a otro, dependiendo en parte de la disponibilidad de los cuidados intensivos neonatales. Aún así, 4.000.000 de neonatos mueren cada año de sepsis neonatal, la mayoría en la primer semana de vida en los países en vías de desarrollo (Turner y col., 2012). Sin embargo en los niños pretérmino los casos de letalidad llegan al 20% y hasta un 30% en aquellos neonatos con <33 semanas de gestación (Phares y col., 2008, CDC, 2010b). En Argentina durante el año 2009 la tasa de mortalidad infantil fue de 12,1/1000 nacidos vivos, mientras que en el 2012 dicho valor varía entre 8,3 y 24,2/1000 nacidos vivos en las provincias más pobres. Sobre este nivel de mortalidad infantil, la Organización Panamericana de la Salud y la Organización Mundial de la Salud en un estudio comparativo realizado sobre cada país del continente americano, advirtió que Argentina podría disminuir los niveles de mortalidad en la infancia si se tomaran medidas preventivas especialmente en relación a las infecciones perinatales, entre ellas las producidas por SGB (OPS/OMS, 2012). En la enfermedad neonatal de comienzo precoz por SGB el índice de mortalidad en Argentina oscila entre 5-20% (MSN/DNMI, 2010).

La enfermedad neonatal de comienzo tardío por SGB, se inicia después del séptimo día de vida. Algunas vías de adquisición de esta enfermedad por los neonatos pueden ser: pasaje a través del canal de parto o por contacto horizontal con la madre colonizada, la ingesta de leche materna con SGB, por inmediatez con otros recién nacidos afectados en la misma unidad neonatal y/o mediante manipulación manual del niño por personal del servicio de neonatología. Esta enfermedad perinatal tardía presenta una incidencia de 0,3 a 0,5 casos/1.000 nacidos vivos y en general, no tiene relación con los factores de riesgo obstétricos como ocurre con la enfermedad de comienzo temprano. La forma de presentación más frecuente es la sepsis fulminante y hasta un 30% de los pacientes tiene compromiso meníngeo, también ocurren las infecciones focales como artritis, celulitis y

onfalitis (inflamación del ombligo). Comparada con la sepsis precoz, la tasa de mortalidad es más baja (2-6%), sin embargo casi la mitad de los niños que sobreviven presentan secuelas neurológicas tales como: pérdida del habla, audición o visión y retraso mental (Ermolenko y col., 2007, Lanari, 2007, Jordan y col., 2008, MSN, 2010, Edwards y Nizet, 2011, Edmond y col., 2012).

8. Resistencia antibiótica en *Streptococcus agalactiae*

En varios países del mundo, el amplio uso de la profilaxis antibiótica intraparto (PAI) para prevenir la enfermedad neonatal de aparición temprana por SGB en las embarazadas, puede contribuir con el aumento de resistencia antibiótica entre las cepas de estreptococo, como también el riesgo de infección por otros microorganismos patógenos oportunistas (bacilos Gram negativos) (CDC, 2010, SEGO, 2012). En la profilaxis y el tratamiento de las infecciones por SGB la primera línea de antibióticos que se utilizan está formada por penicilina G, ampicilina y la primera generación de cefalosporinas ya que la mayoría de las cepas de *S. agalactiae* continúan siendo sensibles a estos quimioterápicos (Nandyal, 2008, Panda y col., 2009, AEG, 2010, Garland y col., 2011). No obstante, en los últimos años se han ido aislando un número creciente de cepas de SGB con sensibilidad disminuida a las penicilinas en USA, Japón y Suiza, debido a mutaciones en las proteínas de unión a penicilinas (pbp2x) (Dahesh y col., 2008, Kimura y col., 2008, Persson y col., 2008, Kasahara y col., 2010, Kimura y col., 2011).

En el caso de los pacientes alérgicos a las penicilinas o cefalosporinas, una alternativa antibiótica tradicional ha sido el empleo de eritromicina o clindamicina como segunda línea antibiótica (Nandyal, 2008). Sin embargo en los últimos 20 años, la resistencia a los macrólidos y a las lincosamidas como clindamicina entre los SGB, se ha incrementado alrededor del mundo. Hay dos grandes mecanismos genéticos de resistencia a macrólidos que manifiestan diferentes fenotipos. En general la resistencia a macrólidos en SGB puede ser debida a las metilasas codificadas por los genes *erm* (B, A/TR o C) o por las bombas unidas a las membranas que expulsan los macrólidos, las cuales están codificadas en los genes *mef* (A o E). En el primer caso se definen los fenotipos de resistencia MLS_B (macrólido-lincosamida-estreptogramina B) que pueden ser constitutivos o inducibles y en el segundo caso, se observan los fenotipos de resistencia M (de eflujo). Las cepas de SGB resistentes a eritromicina con el fenotipo MLS_B, habitualmente presentan resistencia cruzada a clindamicina. Mientras las cepas de SGB con fenotipo M sólo expresan resistencia a eritromicina (Pinheiro y col., 2009, SEEIMC, 2011a). Por ejemplo en USA se ha informado que la resistencia a eritromicina es del 25-32% y para clindamicina del 13-20%, aunque en otros países se registran valores respectivamente superiores para estos antibióticos (Castor y col., 2008, Janapatla y col., 2008, Shabayek y col., 2009, CDC, 2010b, Sadowy y col.,

2010, Abarzúa y col., 2011, Clifford y col., 2011). En relación a estos antecedentes de resistencia, algunos expertos han recomendado para la quimioprofilaxis intraparto el uso de vancomicina como antibiótico de elección cuando existen resistencias a macrólidos y lincosamidas (CDC, 2010b, Garland y col., 2011). En nuestro país estudios recientes realizados en hospitales zonales de la provincia de Neuquén y Buenos Aires sobre la resistencia de SGB a macrólidos y fluorquinolonas aisladas de mujeres embarazadas y de urocultivos, informaron valores de resistencia a eritromicina comprendido entre 7,3% y 6% con fenotipos de resistencia MLS_B constitutivos e inducibles, fenotipo M y el primer antecedente de resistencia a levofloxacina (2%) en gestantes de nuestro país. Aunque todos los aislamientos fueron sensibles a penicilina, los valores de resistencia a los macrólidos, lincosamidas y quinolonas alertan la necesidad de continuar la vigilancia de estos patrones de sensibilidad en los aislamientos de SGB ya que podrían reducirse las opciones de tratamientos antimicrobianos (Cecchini y col., 2012, Zurchmitten y col., 2012). De hecho, recientemente en Kuwait y Japón se han aislado cepas de SGB de mujeres gestantes y de infecciones nosocomiales con una amplio espectro de resistencia a diversos antibióticos como quinolonas, macrólidos, trimetroprimas, tetraciclinas, minociclina, kanamicina y streptomina junto a una reducida susceptibilidad a penicilina (Boswihi y col., 2012, Nagano y col., 2012). Todos estos antecedentes de resistencia antibiótica observados en distintos países, independientemente de que sean originados por mutación o por adquisición de resistencia a través de la transferencia horizontal de genes entre cepas de SGB o inclusive con otros microorganismos, tornan cada vez más problemáticos los tratamientos de estas infecciones (Amyes y col., 2007, Martínez y col., 2009, Sadowy y col., 2010). Con este panorama mundial de resistencia antimicrobiana, son necesarias nuevas estrategias biológicamente efectivas y seguras dirigidas a la prevención y tratamiento de las infecciones por SGB (Stapleton y col., 2011).

9. Resistencia antimicrobiana de *Neisseria gonorrhoeae*

El tratamiento para gonorrea en varias partes del mundo es cada vez más complicado, dada la habilidad que presenta *N. gonorrhoeae* para desarrollar rápidamente resistencia a las terapias con antimicrobianos (Worowski y col., 2008). Desde hace varios años se vienen observando cambios en los patrones de sensibilidad antimicrobiana en las cepas de gonococos, especialmente en áreas donde los regímenes de tratamientos aplicados fueron inefectivos (Cole y col., 2010, CDC, 2011 a, b, Kidd y col., 2012). Por ejemplo, la emergencia de la resistencia gonocócica a penicilina y tetraciclinas comenzó durante la década de 1970 y se diseminó en los inicios de los años '80. En 1981, la espectinomicina fue adoptada como alternativa a las tetraciclinas, aunque tuvieron un escaso protagonismo en la terapéutica para gonococo en USA, ya que en 1987 se hallaron

significativos aumentos en la resistencia a este antibiótico. En los años '90, se comenzó con la utilización de las fluoroquinolonas como terapia efectiva de gonorrea y se continuó así por más de una década, hasta el año 2006 donde se registraron en Canadá, USA e Inglaterra cepas de gonococos con una elevada resistencia a las quinolonas (Goold and Bignell, 2006). Durante el 2007 en USA, el CDC recomendó el cese del uso de las quinolonas en los regímenes terapéuticos para las infecciones gonocócicas y de igual modo otros organismos internacionales en Canadá, Reino Unido, Australia y Rusia excluyeron a estos antibióticos en el tratamiento de la gonorrea y sugirieron el uso de cefalosporinas de tercera generación (cefixima o ceftriaxona) como agentes terapéuticos de elección (CDC, 2007, PHAC, 2007, Kubanova y col., 2008, PHAC, 2008, Tapsall y col., 2008, Tapsall, 2009, AGSP, 2009). Recientemente en el último informe del programa de vigilancia de gonorrea desarrollado en USA, el CDC confirmó el uso de los antibióticos cefixima o ceftriaxona y azitromicina o doxiciclina para las infecciones gonocócicas no complicadas de cérvix, uretra y recto, sin considerar la espectinomicina para aquellos pacientes que no toleran las cefalosporinas, dado su alto costo y la no disponibilidad en dicho país (CDC, 2010a). Asimismo, algunas investigaciones realizadas en distintos países del mundo, tales como Escocia, Suiza, Amsterdam, Rumania, Portugal, España, Australia, Japón y China, han ido informando sobre la aparición de cepas gonocócicas (ST2958, ST1407) con genotipos y fenotipos multiresistentes a ceftriaxona, cefixima, ampicilina, ciprofloxacina, azitromicina, y a otras cefalosporinas de espectro extendido (CEE), con un amplio patrón de distribución mundial (Golparian y col., 2010, Badescu y col., 2011, Carnicer-Pont y col., 2012, Heymans y col., 2012, Hjelmevoll y col., 2012, Masatoshi, 2012, Tanaka, 2012).

En nuestro país son escasos los registros de resistencia de las cepas de gonococos circulantes y de hecho, los pocos estudios disponibles no necesariamente reflejan un panorama nacional, sumado a que existen subregistros de estas infecciones debido a que ocurren casos que no son notificados. Recientemente, durante el año 2011 se investigó la sensibilidad a CEE sobre 170 cepas de gonococo y se determinó que todos los aislados fueron sensibles a ceftriaxona (CRO), mientras el 5% de las cepas provenientes de Chaco y Córdoba presentaron una sensibilidad disminuida a cefixima (CFM). Estos resultados son preocupantes ya que es muy probable la pérdida de uno de los antibióticos (CFM) como herramienta terapéutica dentro de las CEE que actualmente están disponibles en nuestro país y que hasta el momento, son efectivas para los tratamientos de las infecciones a gonococo (Pagano y col., 2012). Durante los últimos años en las co-infecciones a gonococo y *C. trachomatis* se ha visto una creciente resistencia a macrólidos (azitromicina), debida a la sobreexpresión de sistemas de eflujo en las cepas de gonococo, lo cual revela un problema para la salud pública en la terapia de este tipo de infecciones (García y col., 2012a). En un estudio realizado en Buenos Aires entre los años 2005-2008, se vio una

mayor resistencia a fluoroquinolonas en las cepas de gonococo aisladas de homosexuales en relación a los aislamientos de individuos heterosexuales, atribuyendo esta diferencia a polimorfismos del gen *por* de porinas entre las cepas de gonococo circulantes (García y col., 2012b).

En la actualidad la elevada resistencia de *N. gonorrhoeae* a los antibióticos constituye un desafío mundial en la Salud Pública ya que cada vez son más reducidas las opciones de tratamiento antibiótico que se disponen en el mundo y además se carece de inversiones en la búsqueda de nuevos agentes anti-gonocócicos, como así también del desarrollo de vacunas. El impacto de las infecciones gonocócicas con difícil tratamiento antibiótico sobre la transmisión de infecciones tales como VIH, constituye un enorme problema sanitario principalmente en los países con alta prevalencia de ITS y de bajos recursos económicos. En base a estas observaciones, es urgente la búsqueda de nuevas estrategias antimicrobianas para el tratamiento de estas infecciones como así también en la prevención de las mismas (Tapsall y col, 2008; Wong y col, 2008, Lewis, 2010 Zhu y col., 2011).

10. Terapias biológicas para el control de procesos infecciosos

Los métodos actuales para prevenir las infecciones del TGF como también, aquellas infecciones de otros sitios del cuerpo generadas por microorganismos que transitoriamente proliferan en el tracto vaginal, no han sido completamente efectivos dada la recurrencias de las infecciones genitourinarias. Por ello muchos investigadores en la actualidad están dirigiendo su atención hacia la utilización de microorganismos que naturalmente están asociados con un nicho vaginal saludable (Spurbeck and Arvidson, 2011). El uso cotidiano de probióticos en obstetricia y ginecología aún se encuentra bajo los primeros estadios de estudio y experimentación. Las mayores aplicaciones han sido realizadas en los tratamientos de vaginosis, candidiasis e infecciones recurrentes del tracto urinario (Barrons y Tassone, 2008, Gil y col., 2010, Menard, 2011, Juárez Tomás y col., 2011, Köhler y col., 2012). Aún así, la naturaleza recurrente de las infecciones urogenitales, la emergencia de resistencia a múltiples drogas en las bacterias, la insatisfacción de los pacientes y los efectos colaterales de las drogas habitualmente utilizadas, son algunos antecedentes para promover la investigación de un mejor diagnóstico, tratamiento y prevención de estas infecciones. Debido a esto, en la búsqueda alternativa de estrategias biológicas, el empleo de lactobacilos probióticos constituye una opción de tratamiento beneficioso, como también para la restauración y mantenimiento de una microbiota vaginal saludable (Jassawala, 2007, Sleator y Hill, 2008a,b, Reid y col., 2010, Sleator, 2010, Hume, 2011, Khani y col., 2012, Reid, 2012). Para ello, un cierto número de requisitos se han identificado como propiedades importantes que deberían reunir los lactobacilos para ser considerados probióticos vaginales potencialmente efectivos. Entre ellos se pueden mencionar la adherencia a las células

epiteliales y la interferencia con los patógenos mediante agregación y coagregación, persistencia y multiplicación en el nicho vaginal, producción de una variedad de compuestos antimicrobianos sobre el crecimiento de microorganismos patógenos, estimulación del sistema inmune, resistencia a la acción de microbicidas vaginales, incluidos los espermicidas, ser seguros (no patogénicos, no invasivos, no carcinogénicos) y formar una microbiota equilibrada (Pineiro y Stanton, 2007, Reid, 2006, Lebeer y col., 2008, Reid y col., 2009, Borchers y col., 2009, Younes y col., 2012). Entre los compuestos y moléculas sintetizadas por algunos lactobacilos probióticos, se ha visto que los biosurfactantes y proteínas de unión a colágeno, inhiben la adhesión de los patógenos por desplazamiento y también pueden modular la inmunidad del huésped por disminución de las interleuquinas IL-1 y IL-8 que se encuentran elevadas durante la vaginosis bacteriana (BV). Dicha regulación se debe a la síntesis de moléculas de señalización celular que actúan inhibiendo la expresión de otras moléculas de señalización de microorganismos patógenos y a la estimulación de una mayor producción de moco que funciona como barrera protectora contra las de citoquinas antiinflamatorias (Jassawala, 2007, Velez y col., 2007, Sanchez y col., 2009, Lebeer y col., 2010, MacPhee y col., 2010, Sanchez y col., 2010). También resulta destacable la producción de H₂O₂ en las especies de lactobacilos vaginales, ya que previene la proliferación de microorganismos patógenos en el tracto genital (Pascual y col., 2006, 2008b, Martín y Suarez, 2010). De igual modo, se sabe que las bacteriocinas de los lactobacilos son potencialmente útiles para la prevención o tratamiento de procesos infecciosos, mediante la inhibición de microorganismos patógenos en humanos y animales (Gillor y col., 2005, Gillor y Ghazaryan, 2007, Sit y Veredas, 2008, Desriac y col., 2010, Svetoch y Stern, 2010, Daniele y col., 2011, van Heel y col, 2011, Wilson-Stanford y Smith, 2011, Lohans y Veredas, 2012).

En el desarrollo de productos probióticos destinados a humanos, la búsqueda de cepas entre los miembros del género *Lactobacillus* resulta de interés, ya que son microorganismos no patógenos (Borriello y col, 2003, Donohue, 2006). Estos microorganismos han sido utilizados desde tiempos remotos hasta nuestros días en diversos procesos para la producción de alimentos, industriales e investigaciones científicas (Turpin y col., 2010, Kleerebezem y col., 2010). Así mismo, hasta el momento no han sido identificados genes asociados con patogenicidad en cepas de lactobacilos utilizadas como probióticos (Sanders y col., 2010). Aún así, en la formulación de un producto con microorganismos vivos y de aplicación en medicina humana, además de una cuidadosa selección de la cepa probiótica a través de ensayos *in vitro* de caracterización fenotípica y genotípica, también son necesarios determinar ciertos criterios básicos como: estandarización de dosis, vías de administración del probiótico, posibles efectos tóxicos, evaluar su seguridad y determinar los efectos benéficos en la salud del huésped mediante

estudios *in vivo* (Hibberd y Davidson, 2008, Sutton, 2008, Gupta y Garg, 2009, Pascual y col., 2010). La demostración de los efectos benéficos está sujeta al diseño experimental y puede incluir algunos estudios, tales como actividad antimicrobiana, efectos inmunomoduladores, regulación de la proliferación celular y capacidad de promover el desarrollo fisiológico normal del epitelio de las mucosas (Donohue, 2004, 2006, Sanders y col., 2010, Iannitti y Palmieri, 2010, Irvine y col., 2010, Bendali y col., 2011, Erdoğan y col., 2012).

La demostración *in vitro* de las características probióticas y el amplio espectro de actividad antimicrobiana de las especies humanas de lactobacilos vaginales, *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 realizado por el grupo de investigación son resultados alentadores que avalaron los ensayos *in vivo* para determinar los efectos de la aplicación de estos microorganismos (Pascual, 2004, Pascual y col., 2006, Pascual y col., 2008a, Ruíz y col., 2009). Así, la utilización de estos lactobacilos probióticos podría representar una alternativa dentro de las estrategias de control biológico sobre microorganismos patógenos del tracto genitourinario.

10.1. Regulación y categorización de probióticos como agentes bioterapéuticos

En algunos países de Europa, Canadá y USA, el mercado de los probióticos constituye una tasa anual considerable, por ejemplo, sólo en USA la venta de probióticos en el año 2010 fue de 1,1 billones de dólares, por lo que durante los últimos años se han formulado diferentes regulaciones para el uso de estos microorganismos benéficos (FFDCAa,b, 2007, Degnan, 2008, Hibberd y Davidson, 2008, Reid 2008, van Loveren y col., 2012, Vero y Gasbarrini, 2012, Serafini y col., 2012). Si bien los Organismos Internacionales FAO y OMS han definido a los probióticos como microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio en la salud del huésped (FAO/WHO, 2006, 2008, Sander, 2008, Gupta y Garg, 2009), dicho concepto es legalmente subcategorizado para diferenciar los probióticos utilizados como “bioterapéuticos” de aquellos probióticos empleados en los alimentos de consumo humano, o del consumo directo de microorganismos para uso animal y de los probióticos de diseño, es decir, los que son modificados genéticamente (Mattia y Merker, 2008, Hoffman, 2008, Saldanha y col., 2008, Stoeker y col., 2011). Esto es así, ya que dependiendo del uso o aplicación de los probióticos como bioterapéutico o suplemento dietario, serán también diferentes las regulaciones requeridas antes de su comercialización y empleo en humanos (Venugopalan y col., 2010). De acuerdo a la FDA una droga o agente bioterapéutico se define como toda materia prima de origen biológico que directa o indirectamente sirve para la elaboración de medicamentos o productos que serán usados en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades. Cuando la utilización de un probiótico intenta prevenir o

tratar una enfermedad o condición no saludable en los humanos, directamente se categoriza y regula como una droga o producto bioterapéutico vivo (PBV), los cuales son sometidos a exámenes más rigurosos que los requeridos para los probióticos en alimentos. El término PBV se refiere a los productos que contienen microorganismos vivos y enteros como bacterias y levaduras, con un efecto que se pretende terapéutico o preventivo en los seres humanos, independientemente de la vía de administración (oral, intravaginal, tópica, etc) (FAO/FFDCA, 2004, Ross, 2006, Vaillancourt, 2006, Hoffman, 2008, Ross y col., 2008, FAO, 2009). En nuestro país, la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) junto con la Secretaria de Agricultura, Ganadería y Pesca, han incorporado recientemente dentro del Código Alimentario Argentino (CAA) el artículo N° 1389, por el cual se define a los probióticos y se enuncian los exámenes que deberían llevarse a cabo para aquellos empleados en alimentos, en concordancia a los organismos internacionales FAO/WHO y FDA (ANMAT/SAGyP, 2011). Sin embargo, la utilización o administración de productos probióticos destinados a prevenir o tratar infecciones en los humanos, aun no ha sido categorizada ni regularizada, a diferencia de lo que ocurre en otros países.

11. Modelo animal

Los modelos animales son herramientas indispensables en investigación biomédica, han sido usados desde los primeros descubrimientos en medicina y aún hoy, contribuyen con el conocimiento sobre los mecanismos de diferentes enfermedades, la efectividad y toxicidad de variados compuestos químicos y medicinales. Así, las experiencias con animales son útiles como ensayos preclínicos, ya que proveen evidencia científica sobre la seguridad de aplicar un determinado compuesto, producto o vacuna, la farmacocinética de una droga o sustancia y/o evaluando la eficacia biológica de un agente para un nuevo tratamiento (Le Monnier y col., 2006, Chow y col., 2008, Matthews y col., 2008, Wolvers y col., 2010, Veazey y col., 2012).

Los trabajos experimentales con ratones son los modelos predominantes en los laboratorios dedicados a la realización de ensayos *in vivo*. Algunas de las cepas más ampliamente utilizadas son los ratones C57BL/6, BALB/c y las ratas Wistar y Sprague-Dawley, seguidos por otros linajes de ratones como A/J, CD1 y los IRC. Todos estos animales han sido ampliamente utilizados en diferentes áreas de investigación como fisiología, patología, enfermedades infecciosas, inmunología, oncología y neurociencia. En particular los ratones BALB/c han sido propuestos como modelos animales básicos para el estudio de enfermedades infecciosas, colonización, adherencia, etc (Wall y col., 2008, Chung y col., 2008, Muñoz y col., 2011, Labome, 2012, Tsuji y col., 2012, Mamede y col., 2012). Los modelos con ratones fueron empleados en numerosos estudios, por ejemplo para evaluar la colonización de microorganismos patógenos en el tracto urogenital, estudiar la expresión de factores de virulencia, la estimulación de la inmunidad de mucosas, la

eficacia y toxicidad de microbicidas locales, antes de continuar con las distintas fases de estudios clínicos (Yao y col., 2007, Hibberd y Davidson, 2008, Vanderhoof y Young, 2008, Balakrishnan y col., 2009, Harriott y col., 2010, Packiam y col., 2010, Wang y col., 2012b, de Arellano y col., 2012).

Distintos comités internacionales de expertos sobre los criterios y metodologías necesarios para considerar un producto o microorganismo como probiótico, recomiendan el uso de modelos animales para estudiar los efectos de microorganismos potencialmente probióticos en el huésped. Para ello, se pueden mencionar algunos estudios de colonización, proliferación, prevención y protección de las infecciones, estimulación de células epiteliales e inmunes y del mantenimiento de la integridad de las mucosas, entre otros (FAO/WHO 2001, 2002, WHO, 2005, Reid, 2006, Yao y col., 2007, Rowland y col., 2010, Saksena y col., 2011). Además, aunque las bacterias ácido lácticas son generalmente reconocidas como microorganismos seguros, se debe demostrar que una determinada cepa ácido láctica no produce efectos adversos en el huésped mediante su aplicación en un modelo animal, antes de realizar los ensayos clínicos en humanos (Wolvers y col., 2010, De Gregorio y col., 2012).

El uso de productos probióticos para restaurar la microbiota vaginal es una estrategia natural y novedosa para prevenir o tratar las infecciones del tracto urogenital. Hasta el momento existe un escaso número de estudios con animales donde hayan evaluado específicamente la funcionalidad y seguridad de cepas de lactobacilos que podrían ser utilizadas en el diseño de productos probióticos de aplicación vaginal (Pascual y col., 2010; Muench y col., 2009, De Gregorio y col., 2012).

Hipótesis

Considerando los antecedentes anteriormente mencionados se establecieron las siguientes hipótesis:

- 1- Las bacteriocinas de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus rhamnosus* son sustancias con alto potencial para mejorar la microbiota vaginal de las mujeres en edad reproductiva.
- 2- Las bacteriocinas de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus rhamnosus* constituyen una alternativa válida en la eliminación de los microorganismos patógenos genitales.
- 3- Las bacteriocinas de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus rhamnosus* presentan acción sinérgica aumentando el efecto benéfico al aplicarlo como probiótico.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la actividad inhibitoria de las bacteriocinas de las cepas de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus rhamnosus* aisladas del tracto genital femenino, sobre microorganismos causales de enfermedades genitales. Con la finalidad de desarrollar un probiótico vaginal potencialmente útil que permita reconstituir la microbiota bacteriana vaginal y promover una mejora radical en la calidad de vida de las mujeres.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Aislar las cepas de *Neisseria gonorrhoeae* y *Streptococcus agalactiae* de pacientes femeninos.
2. Identificar mediante pruebas bioquímicas y kits comerciales las cepas aisladas.
3. Determinar la sensibilidad a antibióticos de las cepas patógenas genitales.
4. Estudios *in vitro* de la actividad bactericida:
 - Estudiar la actividad bactericida de las cepas de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* sobre las cepas patógenas aisladas.
 - Evaluar el sinergismo de las bacteriocinas de las cepas de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* sobre los microorganismos patógenos genitales.
 - Comparar por diferentes técnicas el efecto sinérgico de ambas bacteriocinas y cuantificarlo.
5. Determinar la actividad citotóxica de las bacteriocinas de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* sobre eritrocitos de humano y de carnero.
6. Identificar y estimar la diversidad de genotipos presentes en las cepas bacterianas.
7. Estudios *in vivo* de la actividad bactericida:
 - Valorar la capacidad de colonización en el tracto genital de ratones BALB/c, de cada una de las cepas de *L. fermentum* y *L. rhamnosus*.
 - Reproducir la infección genital en ratones hembras BALB/c.
 - Estimar la actividad preventiva de cada una de las cepas de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* productoras de bacteriocinas, sobre las cepas patógenas aisladas.
 - Determinar la concentración adecuada de lactobacilos para suprimir al microorganismo patógeno.
 - Valorar las dosis necesarias de ambas cepas de lactobacilos para eliminar el SGB del proceso genital.
 - Los estudios *in vitro* se extrapolarán a estudios *in vivo*

Materiales y Métodos

Ensayos *in vitro*

1. Pacientes femeninos, obtención de muestras y aislamiento de cepas bacterianas

Durante un período de 48 meses se aislaron cepas bacterianas patógenas de infecciones genitales, a partir de exudados vaginales y endocervicales, provenientes de pacientes con infecciones genitales y embarazadas o con abortos que habían concurrido al Servicio de Ginecología del Nuevo Hospital Río Cuarto. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Bacteriología y finalmente identificadas en la orientación de Bacteriología de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Química y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Las cepas humanas de lactobacilos vaginales, *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60, fueron suministradas por el equipo de investigación de la orientación de Bacteriología, quienes previamente identificaron a estos microorganismos mediante pruebas bioquímicas recomendadas en el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática, sistema API 50 CH (BioMérieux Inc., Francia), y por análisis molecular del ADNr 16S de ambas cepas (Lane, 1991, Cepeda y Santos, 2000, Bergey, 2009b). Las secuencias de ADNr de las cepas *L. fermentum* y *L. rhamnosus*, fueron depositados en la base GenBank de secuencias génicas, bajo los números GQ 455406 y EF 495247, respectivamente, tal como recomiendan los organismos internacionales FAO/WHO (2001) para microorganismos considerados probióticos (Pascual y col., 2010). Estas cepas de *Lactobacillus* spp. han sido extensivamente estudiadas en sus características probióticas y bacteriocinogénicas (Pascual, 2004; Pascual y col., 2006, Pascual y col., 2008 a,b). Así, *L. fermentum* L23 produce ácidos orgánicos y una bacteriocina L23, mientras la cepa *L. rhamnosus* L60 sintetiza ácidos orgánicos, bacteriocina L60 y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Las bacteriocinas producidas por estas cepas de lactobacilos fueron caracterizadas y purificadas empleando un procedimiento modificado para la purificación de bacteriocinas clase II (Guyonnet y col., 2000), mediante precipitación con sulfato de amonio, pasaje por columna cromatográfica de Sephadex G-25, columna C-18 de fase reversa para cromatografías de alta eficiencia con gradiente isocrático (HPLC). Luego se realizaron cromatografías en capa delgada (TLC) y ensayos de bioautografía (Pascual, 2004).

2. Identificación por pruebas bioquímicas de bacterias patógenas del tracto genital

A partir de aquellas pacientes que presentaron secreción purulenta y profusa, color blanco cremoso o amarillo, presuntamente bajo sospecha de infección por *N. gonorrhoeae*, se tomaron muestras de endocérvix, utilizando dos hisopos; uno de ellos sirvió para realizar un extendido en portaobjetos y posterior coloración de Gram, con la finalidad de observar su morfología y comportamiento tintorial, acorde a las características gonocócicas. El segundo hisopo se sembró inmediatamente sobre placas de Petri con el medio de cultivo Thayer-

Martin (Britania, Argentina) y se llevó a incubar durante 24-48 h a 37° C, bajo atmósfera controlada con 5% de CO₂.

La identificación de los microorganismos patógenos se efectuó en la orientación de Bacteriología siguiendo los criterios propuestos en el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática (Bergey, 2005, 2009a). Los aislados puros con morfología de diplococos reniformes enfrentados por sus caras planas y Gram negativos, fueron identificados mediante las siguientes pruebas bioquímicas oxidasa, catalasa, reducción de nitratos, O/F de glucosa (medio para la oxidación/fermentación de la glucosa), el patrón de utilización de los distintos hidratos de carbono y complementariamente se realizaron ensayos de β -lactamasas y sensibilidad a antibióticos según metodología propuesta por Pájaro y Barberis (1998). En la detección de β -lactamasas se empleó el método yodométrico, por el cual la enzima producida por el microorganismo en estudio, hidroliza el sustrato penicilina dando un producto inactivo, como el ácido penicilóico que reduce el yodo en solución, decolorando el complejo de yodo-almidón (azul). Para ello, en un extremo de la placa de Petri o portaobjeto se colocó una gota de la siguiente mezcla: 150 μ l de la solución A (penicilina 1.000.000 UI/ml en H₂O destilada) + 1000-1500 μ l de la solución B (1,5 g de IK y 0,3 g de I₂ sublimado en 1000 μ l de buffer fosfato a pH 6,4 y concentración 0,1 M). En el otro extremo de la cápsula o portaobjeto se colocó una gota de la mezcla mencionada anteriormente mas una gota de cultivo; a ambos extremos se le agregó una solución madre de almidón. Luego de 5-10 min., si la bacteria no produce la enzima la coloración permanece azul (reacción negativa). Cuando el resultado de dicha prueba es positivo, debe considerarse a la bacteria resistente a penicilina, ampicilina y amoxicilina, independientemente del resultado del antibiograma.

Para la investigación del estado de portación de estreptococos β -hemolíticos en mujeres embarazadas, se tomaron muestras vaginales y se realizaron extendidos con coloración de Gram y siembra en placas de Petri con agar sangre de carnero (ASC) al 5% (BioMérieux Inc, Francia), incubadas 24-48 h con atmósfera controlada al 5% de CO₂. A partir de colonias sospechosas aisladas en ASC, se realizaron subcultivos en caldo triptena soya (CTS) incubados en microaerobiosis, a 37 °C, durante 24 h. Luego se realizaron las correspondientes pruebas de identificación bioquímica: catalasa, susceptibilidad a bacitracina, hidrólisis del hipurato de sodio, prueba de CAMP, reacción de PYR (pirrolidonil – β -naftilamida), susceptibilidad a trimetoprima- sulfametoxazol (TMS), Voges-Proskauer. En la determinación de serogrupo de Lancefield se utilizó el Test Slidex Strepto-Kit (REF 58 810, BioMérieux, Francia) provisto de los sueros A, B, C, D, F y G, mediante pruebas de aglutinación con partículas de látex. El antígeno específico de grupo contenido en la pared celular es extraído enzimáticamente y así, identificado por partículas de látex sensibilizadas con un anticuerpo anti-antígeno de grupo de estreptococo. Si el antígeno está presente, el

reactivo de látex correspondiente aglutina (reacción positiva), en caso contrario el reactivo látex permanece en suspensión homogénea (reacción negativa). Para esta determinación se tomaron colonias β -hemolíticas y se repicaron en un tubo de hemólisis con 0,4 ml del reactivo enzimático de extracción para la obtención del antígeno específico de grupo contenido en la pared, se mezcló con la ayuda de un vórtex y se incubó 10-15 minutos a 37°C obteniéndose el extracto antigénico. Sobre una tarjeta (soporte) se depositó una gota de cada uno de los látex (suspensión de partículas de látex sensibilizados con anticuerpos anti-grupo A, B, C, D, F y G respectivamente). Con la ayuda de una pipeta Pasteur, se depositó una gota del extracto al lado de cada gota y con un palillo se mezclaron las gotas, dándole al soporte rotación para la observación de la aglutinación durante 2 minutos.

3. Conservación de las cepas bacterianas

Las diferentes cepas de *S. agalactiae* fueron conservadas a -20°C en caldo tripteína soya con glicerol al 30%. Para realizar las experiencias posteriores, las cepas de SGB fueron descongeladas y repicadas en nuevos caldos tripteína soya (CTS), incubadas en microaerobiosis a 37 °C durante 24-48 h. Los cultivos frescos se sembraron en placas de Petri con ASC o ATS (Britania, Argentina) y se incubaron en las mismas condiciones antes mencionadas. Para asegurar su viabilidad se realizaron repiques cada 20 días en medios ricos. Las cepas de *N. gonorrhoeae* fueron conservadas a -80 °C con hisopos de Dacrón en tubos estériles hasta su uso. Los repiques de las cepas de gonococos se realizaron en agar Thayer Martin suplementado con antibióticos (Britania, Argentina).

Las cepas de lactobacilos, *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 fueron repicadas en placas de Petri con agar MRS, incubadas en microaerobiosis a 37 °C durante 24-48 h, luego se conservaron a 4 °C realizando repiques cada 20 días.

4. Susceptibilidad antibiótica de los microorganismos patógenos

Para determinar la sensibilidad antibiótica de los microorganismos patógenos se realizó la técnica de Kirby-Bauer de difusión con discos. En el caso de los gonococos, a partir de colonias aisladas en una placa de Petri con agar chocolate, se realizó una suspensión bacteriana en solución salina al 0,9%, equivalente al tubo 0,5 de la escala Mc Farland. Luego se hisoparon placas con agar Thayer Martin suplementado al 1% con vitamina B12, L-glutamina, adenina, clorhidrato de guanina, ácido-para-amino-benzoico, L-cisteína, glucosa, NAD, carboxilasa, nitrato férrico y clorhidrato de tiamina. En la superficie del agar se colocaron los discos de antibióticos y se llevó a incubar en microaerobiosis a 37 °C durante 24 h. Se midieron los halos de inhibición del desarrollo microbiano y se determinó si presentaban resistencia antimicrobiana (CLSI, 2007, SEEIMC, 2011b).

Para el estudio de sensibilidad antibiótica de las cepas de *S. agalactiae* se continuó con la técnica de difusión anteriormente mencionada en concordancia a las

recomendaciones del CLSI (formalmente NCCLS) sembrando una suspensión bacteriana ajustada a la turbidez del tubo 0.5 de la escala Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml) en placas con agar Mueller-Hinton suplementado con 5% de sangre de carnero (MH+SC) (Britania, Argentina). Luego sobre la superficie del agar se colocaron los discos de los siguientes antibióticos: penicilina (PEN), ampicilina (AM), oxacilina (OXA), gentamicina (GEN), cefalotina (CET), eritromicina (ERY) y clindamicina (CLIN) y se llevó a incubar en microaerobiosis a 37 °C durante 24 h. Las zonas de inhibición del desarrollo microbiano se midieron en mm y se clasificaron como sensibles, sensibilidad intermedia y resistentes basados en los puntos de corte recomendados por la CLSI.

5. Actividad antimicrobiana de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre *Streptococcus agalactiae*

Para la detección de la actividad antimicrobiana de los lactobacilos L23 y L60, se utilizó la técnica de estrias cruzadas propuesta por Ruíz y col., (2009). Las cepas de lactobacilos se aislaron en una placa conteniendo agar MRS y se incubaron a 37°C en microaerofilia durante 24 hs. Se tomó una colonia aislada y se colocó en un tubo conteniendo 2 ml de caldo MRS, se incubó en microaerofilia, a 37°C durante 24 h. A partir del cultivo obtenido, se sembró una estria en el centro de una placa conteniendo caldo MRS adicionado con agar al 1,2% y se incubaron a 37°C en microaerofilia durante 18 h. Una vez desarrollado el microorganismo, se procedió a la inactivación con vapores de cloroformo durante 20 min y se sembraron estrias perpendiculares con un cultivo de 24 h de las diferentes cepas de *S. agalactiae*. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h y luego se midieron los halos de inhibición de crecimiento microbiano alrededor de la estria central.

6. Actividad inhibitoria de los sobrenadantes libres de células de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre las cepas de *Neisseria gonorrhoeae* y *Streptococcus agalactiae*

6.1. Obtención de los sobrenadantes libres de células (SLCs)

A partir de cultivos frescos de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 en caldos Man Rogosa Sharpe (MRS) con una concentración aproximada de 10^8 UFC/ml, se tomaron 0.5 ml de cada cultivo (5%v/v) y fueron resuspendidos en 9,5 ml de caldos MRS, incubados a 37°C durante 18 h en condiciones de microaerobiosis. Para la obtención del sobrenadante, los cultivos fueron centrifugados a 8500 RPM durante 20 minutos a 4°C, acorde al procedimiento propuesto por Sablon y col. (2000). Los SLCs cuidadosamente fueron trasvasados a tubos estériles, siendo inactivados mediante exposición a vapores de cloroformo durante 20 min. Posteriormente se comprobó la actividad inhibitoria por la técnica de difusión en pozos de los SLC puros, SLC neutralizados con NaOH 1N (SLCN) para ambas cepas de lactobacilos y del SLCNP neutralizado y tratado con enzima peroxidasa

(0,1 mg/ml) para la cepa de *L. rhamnosus* L60 sobre una cepa sensible de *E. coli* utilizada como microorganismo indicador. La actividad de los SLCs conteniendo cada una de las bacteriocinas se cuantificó mediante una adaptación de la técnica de dilución crítica.

6.2. Inhibición del crecimiento bacteriano de *Neisseria gonorrhoeae* y *Streptococcus agalactiae* por acción de las sustancias antimicrobianas producidas por las cepas de lactobacilos

6.2.1. Inhibición del crecimiento bacteriano de *Neisseria gonorrhoeae* por acción de las bacteriocinas producidas por ambos lactobacilos y el peróxido de hidrógeno

Para este ensayo se sembraron mediante hisopado, placas de Petri con el medio Thayer Martin (TM), (Britania, Argentina) con las cepas de *N. gonorrhoeae*, se llevaron a incubar 24 h en atmósfera controlada con 5% de CO₂. Posteriormente se realizó la técnica de pozos en el agar y se hicieron 3 hoyos por placa mediante la ayuda de un sacabocados en forma estéril. En cada orificio se depositó respectivamente 100 µl del sobrenadante libre de células (SLC) puro de la cepa *L. rhamnosus* L60 sin tratamiento, 100 µl del SLC neutralizado con hidróxido de sodio y 100 µl del SLCNP (640 UA/ml). De igual modo se procedió con los sobrenadantes de la cepa *L. fermentum* L23, depositando en cada pozo 100 µl del SLC puro y 100 µl del SLCN. Dichas placas se incubaron durante 18 h a 37 °C y luego se midieron las zonas de inhibición de crecimiento bacteriano, según lo sugerido por Ivanova (2000).

6.2.2. Inhibición del crecimiento bacteriano de *Streptococcus agalactiae* por acción de las bacteriocinas producidas por los lactobacilos y el peróxido de hidrógeno

Los sobrenadantes puros de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60, fueron neutralizados con hidróxido de sodio (NaOH) 1 N, obteniendo así los SLCN conteniendo la bacteriocina L23, los SLCN y SLCNP (neutralizado y tratado con peroxidasa) correspondientes al H₂O₂ y a la bacteriocina L60. Luego se realizaron cultivos frescos de las cepas de *S. agalactiae* y de la cepa sensible *E. coli* (control positivo) en tubos con 2 ml de caldo tripteína soya, se incubaron a 37 °C durante 24 h en atmósfera controlada con 5% de CO₂. Con dichos caldos se prepararon suspensiones de los microorganismos ajustadas a la densidad óptica del tubo 0,5 de la escala de Mc Farland en caldos tripteína soya (CTS) equivalentes a una concentración de 1,5 x 10⁸ UFC/ml. Luego se hisoparon placas de Petri conteniendo caldo MRS adicionado con 1,2% de agar (MRS+A) en varias direcciones, para obtener un crecimiento bacteriano confluyente. Seguidamente, se realizaron pozos en la superficie del agar y se colocaron en cada uno de ellos 100 µl del SLC puro, 100 µl del sobrenadante tratado con la enzima peroxidasa y 100 µl de cada una de las bacteriocinas. Las placas fueron llevadas a incubación a 37 °C durante 18 h. Después de este período se midieron los halos de inhibición del crecimiento bacteriano.

7. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de las bacteriocinas de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre las cepas de *Neisseria gonorrhoeae* y *Streptococcus agalactiae*

A partir del SLC de ambas cepas bacteriocinogénicas se realizaron diluciones seriadas al medio obteniendo unidades de actividad de bacteriocina de: 640 UA/ml, 320 UA/ml, 160 UA/ml, 80 UA/ml, 40 UA/ml, 20 UA/ml y 10 UA/ml. A continuación, se sembraron mediante hisopado las cepas de *N. gonorrhoeae* en placas de Petri con medio Thayer Martin (TM) (Britania, Argentina). En estas placas se efectuaron 7 orificios y se inocularon 100 µl de cada una de las diluciones de las bacteriocinas. Las placas se incubaron 24 h a 37° C bajo condiciones de atmósfera controlada (5% CO₂). Finalmente se midieron los halos de inhibición del crecimiento bacteriano, definiendo como CIM al valor absoluto e inverso de la máxima dilución que mostró inhibición del crecimiento de la cepa sensible. Así, fue expresado arbitrariamente en unidades de actividad inhibitoria por mililitro (UA/ml).

Para determinar la CIM de las bacteriocinas de las especies de lactobacilos en estudio sobre las cepas de *S. agalactiae*, se realizó una adaptación de la técnica de microdilución en placa descrita por Wu y colaboradores (2007). Dicha técnica se basa en el cambio de color del reactivo cloruro de 2,3,5 trifenil tetrazolio (TTC), de incoloro a rojo, en presencia de bacterias viables o metabólicamente activas. Dicho cambio se produce cuando la sal de tetrazolio se convierte en sustrato de deshidrogenasas bacterianas y se reduce apareciendo una coloración rojiza. A partir de colonias aisladas de *S. agalactiae* se realizaron cultivos frescos de las cepas y se ajustaron a la turbidez del tubo 0,5 de la escala de Mc Farland. La solución de trabajo de la sal de tetrazolio TTC se preparó al 5% en agua bidestilada estéril y se mantuvo en oscuridad hasta su uso. Los SLCs de cada lactobacilo, conteniendo las bacteriocinas, se diluyeron al medio en caldo MRS obteniendo 640 UA/ml, 320 UA/ml, 160 UA/ml, 80 UA/ml y 40 UA/ml. Se emplearon policubetas rectangulares estériles de 96 pozos rotuladas hacia sus lados (ejes X e Y) con números y letras (figura 8). En la serie de pozos de la fila A y B se colocaron alícuotas de 100 µl de cada dilución de las bacteriocinas L23 y L60, respectivamente. Luego se añadieron 75 µl de la suspensión bacteriana de una cepa de *S. agalactiae*, se llevó a incubar a 37°C bajo atmosfera controlada con 5 % de CO₂ durante 18-24 h. Posteriormente se adicionó 15 µl de la solución de tetrazolio y se reincubó en las mismas condiciones anteriormente descritas durante 2 h, controlando cada 30 min los cambios en la coloración del reactivo. El control positivo de viabilidad celular (rojo) se formó agregando, 100 µl de MRS estéril, 75 µl de cultivo de *S. agalactiae* y 15 µl de la solución de TTC. De forma similar, un volumen de 175 µl de caldo MRS estéril y 15 µl de la solución reactiva fue considerado como control negativo (incoloro). La CIM se consideró como la más alta dilución de bacteriocina donde no se observó cambio de color y se expresó en unidades de actividad por mililitros (UA/ml). La determinación de la

CIM de las bacteriocinas L23 y L60 se realizó por triplicado sobre las cepas sensibles de *S. agalactiae*.

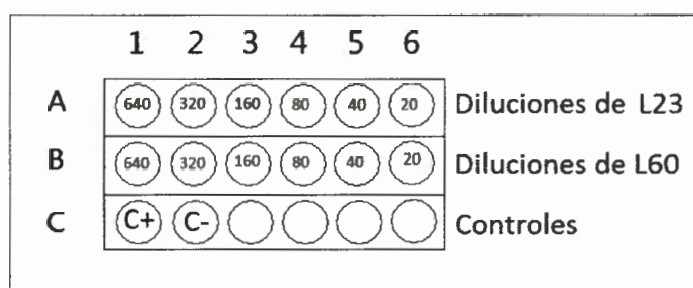


Figura 8. Esquema de la determinación de la CIM las bacteriocinas L23 y L60. Los valores representados en cada pozo corresponden a las diluciones de las bacteriocinas (UA/ml); C+= control positivo; C-= control negativo.

8. Ensayo cualitativo de interacción de las bacteriocinas de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre cepas *Neisseria gonorrhoeae* y *Streptococcus agalactiae*

A partir de cultivos frescos de las cepas de *N. gonorrhoeae* y *S. agalactiae* se ajustaron las concentraciones a la densidad óptica del tubo 0,5 de la escala de Mc Farland equivalentes a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Luego se hisoparon placas con agar TM y MRS+A, en varias direcciones para obtener un crecimiento confluyente. Seguidamente, se realizaron pozos próximos en la superficie del agar y se colocaron en cada uno de ellos 100 μ l de cada una de las bacteriocina L23 y L60. Las placas se incubaron en microaerobiosis a 37 °C durante 24 h. Luego en base a la difusión de las sustancias en el agar, se interpretaron las interacciones entre ambas bacteriocinas de la siguiente manera: un efecto sinérgico se produce cuando el halo de inhibición formado en el área de difusión de ambas bacteriocinas es mayor a las zonas de inhibición producidas por cada bacteriocina independientemente; interacción antagónica, cuando la zona de inhibición formada en el área de difusión de ambas bacteriocinas es menor que los halos de cada una de las bacteriocinas por separado; efecto indiferente; se da cuando en la zona de difusión de ambas bacteriocinas la inhibición del crecimiento bacteriano permanece con igual tamaño que los halos producidos por cada una de las bacteriocinas de manera independiente (Pascual, 2004, Ruíz y col., 2012).

9. Ensayos de interacción de las bacteriocinas de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre cepas de *Streptococcus agalactiae*

Para evaluar cuantitativamente las interacciones entre las bacteriocinas de ambos lactobacilos se realizaron las técnicas de difusión en pozos en el agar y de tablero de ajedrez por microdilución. Se procedió a la extracción de los SLCs de los cultivos de ambos lactobacilos y a los tratamientos respectivos como se describió anteriormente, para obtener las fracciones con las bacteriocinas en solución denominadas aquí, L23 y L60.

A partir de colonias aisladas de *S. agalactiae* (SGB) se realizaron subcultivos en caldo tripteína soya (CTS) y se ajustó a la turbidez del tubo 0,5 de la escala de Mc Farland. Luego se sembraron con hisopo las suspensiones de SGB en placas con agar MRS y se realizaron 3 pozos con sacabocado sobre la superficie del agar. En cada pozo se colocaron respectivamente 100 µl de la bacteriocina L23 de *L. fermentum* (50 µl de L23 + 50 µl de PBS estéril), 100 µl de L60 de *L. rhamnosus* (50 µl de L60 + 50 µl de PBS estéril) y 100 µl de una mezcla de ambas bacteriocinas L23:L60 (1:1 vol/vol). Las placas se incubaron a 37°C en microaerofilia durante 18-24 h. Finalmente se midieron en milímetros (mm) las zonas de inhibición del crecimiento bacteriano. En función a los tamaños de los halos se determinaron los tipos de interacciones entre las bacteriocinas, definiendo como:

- sinergismo de potenciación, se produce cuando la zona de inhibición del crecimiento bacteriano observado en la mezcla bacteriocinogénica resulta superior a la suma de las zonas de inhibición individuales de las bacteriocinas L23 y L60. Se consideró como tal, una diferencia > 2 mm en el tamaño del halo de inhibición de la mezcla L23:L60 respecto a la suma de los halos de cada una de las bacteriocinas L23 y L60;
- sinergismo aditivo, se observa cuando el halo de inhibición producido por la mezcla de bacteriocinas es igual a la suma de los halos de inhibición de cada una de las bacteriocinas;
- antagonismo, ocurre cuando la zona de inhibición en la mezcla L23:L60 es menor que la suma de los halos encontrados con las bacteriocinas en forma individual;
- indiferencia, se da cuando el halo de inhibición en la mezcla de bacteriocinas es igual a la inhibición observada con alguna de las bacteriocinas en forma independiente.

Las interacciones entre las bacteriocinas L23 y L60 se confirmaron con la prueba del tablero de ajedrez mediante una adaptación de la técnica descrita previamente por Petersen y colaboradores (2006) para combinaciones de sustancias antimicrobianas. Dicha técnica del tablero hace referencia a la disposición de los tubos o pocillos formando un tablero de ajedrez donde hay múltiples diluciones de los antimicrobianos en concentraciones inferiores a la CIM de cada uno de ellos frente al microorganismo a estudiar. Se utilizó la sal de tetrazolio TTC siguiendo el principio de reducción del reactivo a formazan, observado en el ensayo para determinar la CIM de las bacteriocinas.

En esta experiencia las concentraciones iniciales de las bacteriocinas, expresadas como unidades de actividad inhibitoria por mililitros (UA/ml) fueron al menos el doble del valor obtenido en la CIM de cada una de las sustancias a evaluar. A partir de las bacteriocinas L23 y L60 se hicieron diluciones seriadas al medio utilizando caldo MRS en nuevos tubos Eppendorf estériles. De este modo, empleando policubetas de 96 pocillos se trazaron ejes imaginarios a los lados de la microplacas y se dispusieron las diluciones de

L23 a lo largo de de las abscisas y las de L60 en el eje de las ordenadas. Posteriormente se colocó en cada pocillo un volumen de 75 µl de cada una de las diluciones de ambas bacteriocinas alcanzando un volumen de 150 µl. Luego, se agregó a cada uno de los pozos 25 µl de una suspensión de SGB cuya turbidez fue equivalente al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland y las placas se incubaron a 37°C por 24 h en microaerobiosis. Después de este periodo, se añadieron 15 µl del reactivo TTC al 5% y las placas se reincubaron por otras 2 h bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Al igual que en el ensayo de la CIM se realizaron los mismos controles positivos y negativos para esta experiencia. A continuación en la figura 9 se esquematiza la combinación de las diluciones de ambas bacteriocinas estudiadas y la localización de sus controles.

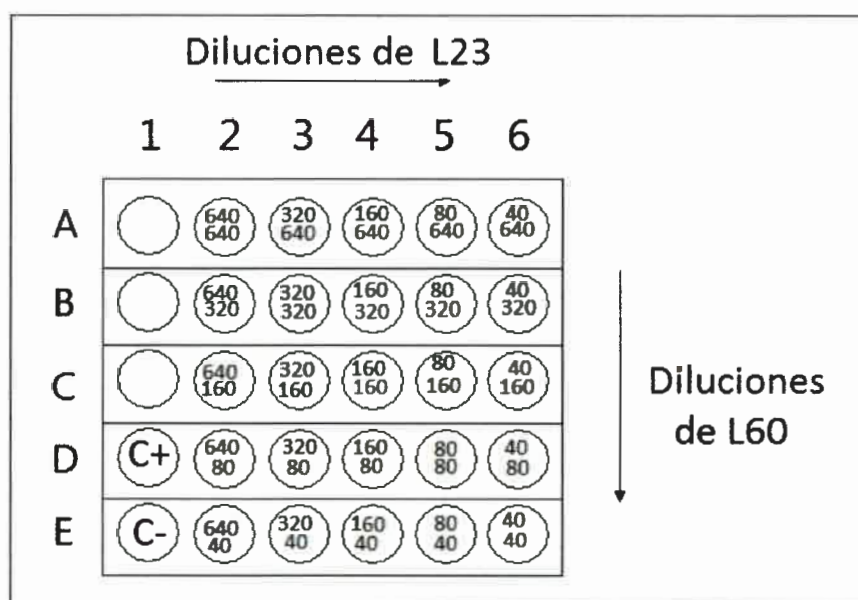


Figura 9. Diagrama de las diluciones de las bacteriocinas L23 y L60 por la técnica de tablero de ajedrez. Los valores representados en cada pocillo corresponden a las diluciones de las bacteriocinas (UA/ml). C+= control positivo y C-= control negativo.

Después de la incubación, se analizaron las interacciones de las combinaciones de estas sustancias con actividad antimicrobiana y se calcularon las concentraciones inhibitorias fraccionarias (CIF) dando un valor índice de CIF. Dicho índice se calcula realizando el cociente entre la CIM de la sustancia antimicrobiana en la combinación y la CIM de esa sustancia sola, frente al microorganismo ensayado, según la siguiente fórmula:

$$\text{CIF} = \frac{\text{CIM A en AB}}{\text{CIM A}} + \frac{\text{CIM B en AB}}{\text{CIM B}}$$

Donde A y B representan, en este caso, las dos bacteriocinas a evaluar y AB se refiere a la mezcla de las bacteriocinas. Para evaluar las interacciones de las sustancias con actividad antimicrobiana se adoptaron los siguientes criterios de Nworu y Esimone (2006) y Adikwu y col., (2010):

- sinergismo, cuando el índice de CIF resultó menor a 1 ($CIF < 1$);
- adición, cuando el valor de CIF es igual a 1 ($CIF = 1$)
- indiferencia, cuando la CIF se presentó con valores mayores a 1 y menores a 2 ($1 < CIF < 2$);
- antagonismo, cuando el índice CIF resultó mayor o igual a 2 ($CIF \geq 2$).

10. Estudio de la actividad hemolítica de los sobrenadantes libres de células sobre glóbulos rojos

10.1. Preparación de la suspensión de glóbulos rojos humanos (GRH) y de carnero (GRC)

Se colocaron en tubos de hemólisis 2,5 ml de PBS (pH 6,8) y 2,5 ml de sangre entera humana o sangre entera de carnero. Los tubos fueron centrifugados a 1500 rpm durante 2 min. El sobrenadante se removió y se añadió nuevamente un volumen de PBS y se repitieron los pasos anteriores hasta evidenciar ausencia de hemólisis en el sobrenadante. Los sobrenadantes se descartaron y se prepararon las suspensiones de glóbulos rojos al 8% en PBS.

10.2. Obtención del sobrenadante libre de células (SLC)

A partir de las colonias de las cepas de *Lactobacillus* estudiadas, aisladas en placas de MRS (Man, Rogosa and Sharpe), se inoculó una ansada en un tubo con 2 ml de caldo MRS estéril. El tubo fue incubado a 37°C durante 24 h en microaerofilia. Se transfirieron 0.5 ml de inóculo del caldo a un tubo conteniendo 9,5 ml de caldo Rogosa estéril y se incubó nuevamente a 37 °C por 24 h en microaerofilia. Posteriormente, para remover las células, se centrifugó a 8500 rpm durante 20 min a 4 °C El sobrenadante libre de células (SLC) se expuso por 20 min a vapores de cloroformo y fue refrigerado a 4 °C hasta el momento de su uso (Sablon y col., 2000, Pascual y col., 2008b).

10.3. Ensayo de hemólisis

Esta experiencia se llevó a cabo mediante una adaptación de la técnica descrita por Hertle y col., (1999). Para estudiar el efecto citotóxico de las distintas sustancias biológicas contenidas en los SLCs sobre glóbulos rojos, se utilizó la técnica en tubo con eritrocitos humanos y de carnero. Alícuotas de 100µl de cada una de las fracciones se incubaron con 1ml de la suspensión de eritrocitos al 8% en PBS (pH 6,8) a 22 °C durante 15 min y luego se centrifugaron a 1500 rpm durante 1 min. Se midió la absorbancia de la hemoglobina por espectrofotometría a 405 nm. Se realizó un control positivo de hemólisis total y un control negativo se realizó utilizando PBS (pH 6,8).

Para hacer la curva de hemólisis total se utilizó duodecil sulfato de sodio (SDS) como control positivo para determinar la hemólisis total de GRH y GRC. Se utilizaron 35 mg de SDS, los cuales se agregaron a una concentración constante de GRH y GRC al 8%. Se incubaron a 22 °C durante 15 min y se centrifugaron a 1500 rpm durante 1 min. Se realizaron 10 diluciones hasta 1/2048 cuyas concentraciones de SDS son las siguientes: 17,5; 8,75; 4,37; 2,18; 1,09; 0,55; 0,27; 0,14; 0,07; 0,03 mg/ml. Esto permitió realizar las lecturas en el espectrofotómetro a 405 nm (A_{405}) y posteriormente se construyó la curva de hemólisis total.

11. Estudios genotípicos sobre cepas de *S. agalactiae*

El análisis molecular de los aislamientos bacterianos se llevó a cabo para confirmar la identidad de las cepas patógenas previamente identificadas mediante pruebas bioquímicas y se intentó estimar la diversidad de los genotipos presentes en la colección de cepas bacterianas aisladas del tracto genital femenino.

11.1. Aislamiento de ADN genómico

A partir de un cultivo fresco en placas de ACC se tomaron colonias puras de *S. agalactiae* y se resuspendieron en 500 µl de solución fisiológica y se centrifugaron a 10000 rpm por 10 min. Se eliminaron los sobrenadantes de los tubos y los pellets fueron resuspendidos en 500 µl de una matriz comercial de InstaGene (BioRad, Hércules, USA). La suspensión se incubó durante 30 min a 56 °C y se calentó a 100 °C durante 10 min. Dichos sobrenadantes fueron usados como molde de ADN bacteriano para la reacción PCR (Cepeda y col, 2000).

11.2. Secuenciación del gen *ARNr 16S*

A partir del ADN de *S. agalactiae* se tomaron 1 µl de ADN molde y se colocaron en 20 µl de la mezcla de reacción para realizar una PCR directa, conteniendo los siguientes primers universales 27F (5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'), siguiendo la enumeración basada en el 16S ARNr de *Escherichia coli* (Brosius y col., 1978, Lane y col., 1991). La amplificación del amplicón se realizó por 35 ciclos, a 94 °C por 45 seg., 55 °C por 60 seg., y 72 °C por 60 seg. Los productos de PCR purificados de ~1,400 bp fueron secuenciados con el modelo Applied Biosystem 3730XL automatizado del Servicio de laboratorios MacroGen Inc. (Seúl, Corea). La secuencia de nucleótidos de los productos purificados de PCR fue determinada por el laboratorio MACROGEN utilizando los primers universales empleados fueron 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') y 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') (Ke y col., 2000). Las secuencias obtenidas fueron analizadas por medio del programa BLAST proporcionado por el Centro Nacional para información biotecnológica, USA, para hallar las identidades de las secuencias mediante la asignación de valores de similitud entre las mismas utilizando el programa CLUSTAL W por medio del cual se compararon secuencias

de referencia obtenidas de la base de datos RDP y RDP (Ribosomal Database Project) y GenBank (Thompson y col., 1994, Maidak y col., 2001, Kong y col. 2002).

11.3. Análisis filogenético

Los estudios filogenéticos fueron realizados mediante la aplicación de dos software PAUP* (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) versión 4.0b8 (Swofford, 2001) y MEGA 5 (Molecular Evolutionary Genetics analysis) versión 5.05 (Tamura y col., 2011), para producir un árbol filogenético reflejando las relaciones entre las cepas de *S. agalactiae* seleccionadas y las cepas de referencia, mediante los algoritmos de máxima parsimonia y neighbor-joining (NJ). En el caso de la generación del árbol con el método de máxima parsimonia se unieron la información de las secuencias amplificadas y se ponderó con el mismo valor a todas las posiciones de la secuencia y se consideraron los *gaps* como un quinto carácter. Se realizó una búsqueda heurística de 100 repeticiones con adición aleatoria de taxones (*random sequence addition*) y con intercambio de ramas (*branch-swapping*) de tipo TBR (*tree bisection reconnection*). En este software se dejó el método *Multitrees* por defecto (PAUP* guarda todos los árboles mínimos que encuentra durante el intercambio de ramas) y se colapsaron las ramas con longitud máxima igual a cero. Además mediante este análisis se obtuvo el índice de consistencia (CI) y el índice de retención (RI). La medida de confianza o fiabilidad de los grupos obtenidos se valoró mediante un análisis de *bootstrap* de 1000 réplicas. Las siguientes cepas de *S. agalactiae* y otras cepas de la familia *Streptococcaceae* fueron utilizadas para la construcción del árbol filogenético: SGB HN090816-2, SGB HN090816-3, SGB A909, SGB ZQ100810-B, SGB gi311409, SGB AF459432.1, SGB 2603 v/R, SGB so304015, SGB ATCC 13813, SGB cepa 20*, SGB cepa 14*, SGB 2603 v/R sero V, SGB JCM5671, SGB NEM316 seg 1, SGB CIP8245, SGB NEM316 seg 3, SGB AF015927, *S. difficilis* gi62084055, *S. difficilis* ATCC51487, *Streptococcus pyogenes* M1 GAS NCBI Ref Seq: NC002737.1, *Streptococcus pyogenes* MGAS8232, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 700669, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* cepa NJODL1, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CV56 16S rRNA.

Ensayos *in vivo*

12. Modelo animal

Para los ensayos *in vivo* fueron utilizados 36 ratones hembras BALB/c, de 8 semanas de edad, de tamaño y peso uniforme, proporcionadas por el bioterio de la Universidad Nacional de Río Cuarto. En esta segunda etapa experimental de ensayos *in vivo* se estudió la actividad biológica de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 frente a la infección vaginal producida por *S. agalactiae*. Para las experiencias *in vivo* todos los ratones fueron divididos en grupo de 4 miembros.

12.1. Microorganismos con características benéficas

A partir de cultivos frisados en caldos Man Rogosa Sharpe (MRS) de las cepas de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 se realizaron subcultivos en caldos MRS a 37 °C durante 24-48 h en microaerobiosis. El aislamiento de cada una de las cepas se realizó en placas con agar MRS y se incubaron bajo las mismas condiciones antes mencionadas.

12.2. Bacterias patógenas

A partir de caldos de cultivo conservados a -20 °C, la cepa de estreptococo β -hemolítica seleccionada fue subcultivada en un nuevo caldo tripteína soya (CTS) (Britania, Argentina) a 37 °C, en microaerofilia durante 24 h. Luego se realizó el aislamiento de las colonias en placas con ATS, en las mismas condiciones ya descritas. Después de la incubación algunas colonias fueron repicadas y teñidas con tinción de Gram y se les realizó la prueba de catalasa y CAMP, a los fines de reconfirmar su identificación.

12.3. Estudio de la microbiota vaginal de ratones BALB/c

Para determinar la microbiota vaginal existente se estudiaron todos los ratones hembras BALB/c, distribuidas en grupos de 4 ratones por jaula impidiendo el hacinamiento de los animales y la obtención de resultados erróneos. Todos ellos fueron alimentados e hidratados *ad libitum* y mantenidos bajo correctas condiciones de higiene con periodos de luz y oscuridad de 12 h.

Se tomaron muestras vaginales en todos los ratones hembras BALB/c con hisopo de algodón estéril, punta fina, previamente embebidos en buffer fosfato salino estéril (PBS) para favorecer la adsorción de los microorganismos en el extremo de los hisopos, los cuales fueron introducidos y rotados en la vagina. Los hisopos fueron sumergidos en tubos de Eppendorf estériles con 100 μ l de PBS estéril, la suspensión de cada tubo fue homogenizada y se tomaron alícuotas de 20 μ l para realizar la siembra en placas con agar chocolate, agar eosina-azul de metileno (EBM), agar manitol salado o Chapman (Britania, Argentina) y agar MRS (BioMérieux, Francia), respectivamente. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h en condiciones aeróbicas, con excepción de las placas con agar MRS que fueron incubadas en atmósfera controlada con 5% de CO₂. Posteriormente, a partir de

las colonias aisladas se realizaron frotis coloreados con tinción de Gram y se procedió a la observación microscópica. Todos los microorganismos fueron identificados mediante pruebas bioquímicas descritas en el Manual de Bergey (2009).

13. Estudio de la colonización vaginal de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 en ratones BALB/c

A partir de colonias aisladas de L23 o L60 en placas con agar MRS, se realizaron subcultivos en caldo MRS, incubados a 37 °C durante 24 h en atmósfera controlada con CO₂ al 5%. La suspensión de microorganismo a inocular fue ajustada a la turbidez de los tubos N° 1-2 de la escala de Mc Farland equivalentes a valores entre 3-6 x10⁸ UFC/ml en tubos con de PBS estéril.

Para realizar el ensayo de colonización de cada una de las cepas de lactobacilos en estudio, una alícuota de 20 µl de cada suspensión de las cepas L23 y L60 se inocularon por separado en la vagina de ratones hembras BALB/c. El control negativo se realizó inoculando en un grupo de ratones 20 µl de PBS estéril. A tiempo cero t₀ se determinó el número de lactobacilos inicialmente inoculados. Durante un período de 8 días se tomaron diariamente muestras vaginales de cada ratón. Dichas muestras se sembraron en agar MRS y a las colonias aisladas se les realizó coloración de Gram y pruebas bioquímicas correspondientes a la identificación de los lactobacilos.

La toma de muestra diaria por ratón se realizó mediante hisopado vaginal y se colocó en tubos Eppendorf con 40 µl de PBS estéril, desde los cuales se hicieron diluciones seriadas al medio en PBS estéril. Luego se procedió a la siembra de una alícuota de 20 µl de cada suspensión bacteriana en placas con agar MRS. La incubación de las placas se realizó en microaerobiosis a 37 °C durante 24-48 h. El número de lactobacilos presentes se cuantificó, mediante recuento en placa y se expresó en UFC/ml. Luego dichos valores fueron transformados a logaritmos en base 10.

14. Estudio de colonización vaginal de *Streptococcus agalactiae* en ratones BALB/c

A partir de colonias aisladas de *S. agalactiae* en placas con agar sangre de carnero al 5%, se realizaron subcultivos en CTS y se incubaron a 37 °C durante 24 h en atmósfera controlada con 5 % de CO₂. El cultivo fresco de estreptococo fue ajustado a la turbidez del tubo 1 de la escala de Mc Farland (3x10⁸ UFC/ml) y luego se realizaron diluciones seriadas en tubos eppendorf con PBS estéril hasta obtener una carga bacteriana del orden de 10⁷ UFC/ml que fue la concentración del microorganismo a inocular en la vagina de los ratones BALB/c. Se determinó la concentración bacteriana inicial de estreptococos beta hemolítico al t₀ por recuento en placas con ATS, las cuales fueron luego incubadas en microaerobiosis a 37 °C por 24 h.

Una alícuota de 20 μ l de la suspensión de estreptococo fue inoculada vaginalmente en cada ratón. El esquema de inoculación intravaginal se realizó con una única dosis de una concentración conocida de SGB a t_0 . En un grupo de ratones control negativo sólo se inoculó 20 μ l de PBS estéril y las muestras vaginales derivadas de dicho control fueron sembradas en placas con agar sangre de carnero al 5% (ASC). El período de esta experiencia fue de 8 días (t_1 - t_8), con una toma de muestra vaginal diaria. Las mismas se tomaron mediante hisopado vaginal, se colocaron en tubos Eppendorf con 40 μ l de PBS estéril y se hicieron diluciones seriadas al medio en PBS estéril. Una alícuota de 20 μ l de cada suspensión bacteriana se sembró en placas con ASC. La incubación de las placas se realizó a 37 °C durante 24-48 h en atmósfera controlada con CO₂ al 5%. El recuento del número de *S. agalactiae* se expresó como UFC/ml y luego fue transformado a logaritmo decimal.

15. Efecto preventivo de la administración vaginal de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre *Streptococcus agalactiae* en ratones BALB/c

Los ensayos sobre la actividad preventiva de las cepas de lactobacilos se evaluaron independientemente en dos grupos de 4 ratones hembras BALB/c.

A partir de colonias aisladas de L23 y L60 en placas con agar MRS, se realizaron subcultivos en caldos MRS, incubados a 37 °C durante 24 h en atmósfera controlada con CO₂ al 5%. Las suspensiones bacterianas se ajustaron a la turbidez del tubo 1 de la escala de Mc Farland, equivalente a valores de 3×10^8 UFC/ml. La determinación de la concentración de bacterias lácticas inicial a t_0 fue calculada mediante recuentos en placa con agar MRS e incubada en las mismas condiciones ya descritas y se expresaron en UFC/ml. De igual modo, se obtuvo un cultivo fresco de la cepa de *S. agalactiae* en CTS, incubado a 37 °C por 24 h en microaerobiosis. La suspensión de estreptococo fue ajustada a la turbidez de una dilución 1/10 del tubo 1 de la escala de Mc Farland. Las UFC/ml de SGB al t_0 se calcularon mediante recuentos en placas con ATS, incubadas en condiciones óptimas. Los volúmenes de alícuotas a inocular respectivamente de la suspensión de lactobacilos y de estreptococo β - hemolítico fueron de 20 μ l/ratón. El período de estudio comprendió 8 días consecutivos (t_1 - t_8), con una toma diaria de muestra vaginal.

La experiencia para este ensayo se basó en una sola inoculación a t_0 de la suspensión del lactobacilo y 1 control negativo o control de infección inoculado con 20 μ l de PBS estéril. La toma de muestra diaria por ratón se realizó mediante hisopado vaginal 24 h (t_1) y 48 h (t_2) pos-inoculación y se colocaron en tubos Eppendorf con 40 μ l de PBS estéril, desde los cuales se hicieron diluciones seriadas al medio (1/2; 1/4; 1/8) en PBS estéril. Luego se procedió a la siembra de una alícuota de 20 μ l de cada suspensión bacteriana en placas con agar MRS. La incubación de las placas se realizó a 37 °C durante 24-48 h en microaerobiosis.

A las 48 h de la inoculación de cada uno de los lactobacilos, se realizó la inoculación con la suspensión de *S. agalactiae* a los dos grupos de ratones BALB/c. Las consecutivas muestras vaginales de cada ratón se recogieron a tiempo t_3 , t_4 , t_5 , t_6 , t_7 , t_8 con hisopo estéril y se colocaron en tubos Eppendorf con 80 μ l de PBS estéril, desde los cuales se realizaron las diluciones y siembras correspondientes en placas con agar MRS y ASC. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24-48 h bajo atmósfera controlada con CO₂ al 5%. Las muestras vaginales derivadas del control negativo fueron sembradas e incubadas en las mismas condiciones mencionadas. Seguidamente se realizaron los recuentos diarios del número de lactobacilos y estreptococos presentes y se expresaron como UFC/ml. Todos los recuentos de UFC/ml fueron transformados a logaritmo decimal.

16. Estudio del efecto curativo de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre *Streptococcus agalactiae* en vagina de ratones BALB/c

En dos grupos de ratones hembras BALB/c se evaluó por separado el efecto curativo vaginal de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* sobre la cepa de *S. agalactiae*.

A partir de colonias aisladas de *S. agalactiae* en ASC, se hizo un subcultivo en CTS y se incubó a 37 °C durante 24 h en atmósfera controlada con CO₂ al 5%. El cultivo fresco de estreptococo fue ajustado a la turbidez del tubo 1 de la escala de Mc Farland en tubos con PBS estéril y desde el cual, se realizó luego una dilución 1/10 obteniendo la densidad microbiana óptima a inocular. La concentración inicial a tiempo t_0 de SGB se determinó mediante recuento de colonias en placas con ASC. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h en atmósfera controlada con CO₂ al 5%. Se realizaron subcultivos frescos de L23 y L60 en caldos MRS, incubados a 37 °C durante 24 h en atmósfera controlada con CO₂ al 5%. La suspensión de lactobacilos a inocular fue ajustada a la turbidez del tubo 1 de la escala de Mc Farland. La concentración de bacterias lácticas iniciales se determinó mediante recuentos en placas con agar MRS y se incubaron en las mismas condiciones anteriormente descriptas.

En este ensayo se realizó una sola inoculación a t_0 de la suspensión de estreptococos en el grupo de ratones. La toma de muestra diaria por ratón se realizó mediante hisopado vaginal 24 h (t_1) y 48 h (t_2) pos-inoculación y se colocaron en tubos Eppendorf con 40 μ l de PBS estéril, desde los cuales se hicieron diluciones seriadas al medio (1/2; 1/4; 1/8) en PBS estéril. Luego se procedió a la siembra de una alícuota de 20 μ l de cada suspensión bacteriana en placas con ASC, y se incubaron en las condiciones antes descriptas.

A las 48 h posinoculación de *S. agalactiae* se reinocularon todos los ratones con 20 μ l de la suspensión del lactobacilo respectivo. Se recogieron muestras vaginales consecutivas de cada ratón a tiempo t_3 , t_4 , t_5 , t_6 , t_7 , t_8 con hisopo estéril y se colocaron en

tubos Eppendorf con 80 μ l de PBS estéril, desde los cuales se realizaron las diluciones (1/2; 1/4; 1/8) correspondientes y siembras en placas con agar MRS y ASC. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24-48 h en microaerobiosis. Los recuentos diarios del número de colonias de estreptococos y lactobacilos presentes, se expresaron en UFC/ml y se transformaron a logaritmo decimal

17. Efecto preventivo de la inoculación conjunta de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre la colonización de *Streptococcus agalactiae* en vagina de ratones BALB/c

A diferencia de los ensayos preventivos descritos anteriormente, se evaluó la actividad preventiva de una mezcla de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 sobre la colonización de *S. agalactiae* en un grupo de ratones hembras BALB/c. Para ello, se siguió el mismo diseño experimental propuesto para cada efecto preventivo de las cepas de lactobacilo por separado, excepto en la preparación de la mezcla de L23+L60 utilizada para la inoculación vaginal. Para ello se realizó una mezcla 1:1(v/v) de los cultivos de las cepas de lactobacilos L23 y L60 en caldo MRS estéril. La suspensión bacteriana a inocular fue ajustada por comparación con la turbidez de los tubos 1-2 de la escala de Mc Farland, en tubos con PBS estéril. La concentración inicial de la mezcla de bacterias lácticas a t_0 fue calculada mediante recuentos en placa con agar MRS e incubadas en las mismas condiciones ya descritas. El número de colonias de lactobacilos se expresó en UFC/ml. De igual modo, se obtuvo un cultivo fresco de la cepa de *S. agalactiae* en CTS, incubado a 37 °C por 24 h en microaerobiosis. La suspensión de estreptococo fue ajustada a la turbidez correspondiente al tubo 1 de la escala de Mc Farland, en tubos con PBS estéril. Posteriormente se realizó una dilución 1/10 de *S. agalactiae* y se calcularon al t_0 las UFC/ml mediante recuentos en placas con ASC, las cuales fueron incubadas en condiciones óptimas.

La experiencia se realizó inoculando a t_0 20 μ l de la mezcla de lactobacilos (L23 +L60) en el grupo de ratones. Posteriormente se tomaron muestras de la vagina a las 24 h (t_1) y 48 h (t_2) pos-inoculación de los lactobacilos y se colocaron en tubos Eppendorf con 40 μ l de PBS estéril, desde los cuales se hicieron diluciones seriadas al medio (1/2; 1/4; 1/8) en PBS estéril. Luego se procedió a la siembra de una alícuota de 20 μ l de cada suspensión bacteriana en placas con agar MRS e incubadas.

En todos los ratones 48 h después de la inoculación con la mezcla de lactobacilos se reinoculó con la suspensión de estreptococos. Las muestras vaginales de cada ratón se recogieron consecutivamente a tiempo t_3 , t_4 , t_5 , t_6 , t_7 , t_8 con hisopo estéril y se colocaron en tubos Eppendorf con 80 μ l de PBS estéril, desde los cuales se realizaron las diluciones y siembras correspondientes en placas con agar MRS y ASC, e incubadas a 37 °C durante

24-48 h en microaerobiosis. Los recuentos diarios del número de colonias de lactobacilos y estreptococos presentes, se expresaron en UFC/ml y se transformaron a logaritmo decimal.

18. Efecto curativo de una mezcla de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre la colonización de *Streptococcus agalactiae* en vagina de ratones BALB/c

En un grupo de ratones hembras BALB/c se evaluó el efecto curativo vaginal de una mezcla de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* sobre la cepa de *S. agalactiae* continuando con el mismo ensayo de efecto curativo realizado con cada una de las cepas de lactobacilos por separado.

Como se mencionó en el ensayo del efecto preventivo de la mezcla de lactobacilos, se procedió de igual modo para obtener y ajustar las suspensiones de estreptococos y de la mezcla de L23+L60 (v/v).

En todos los ensayos de colonización, prevención y efecto curativo se realizaron las pruebas bioquímicas de identificación correspondientes para lactobacilos y *S. agalactiae*.

19. Ensayos para determinar la dosis efectiva *in vivo* de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre *Streptococcus agalactiae*

19.1. Modelo animal y protocolo de experimentación

Para determinar las dosis *in vivo* de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* necesarias para eliminar a SGB de la vagina del modelo animal se utilizaron nuevos grupos de ratones hembras BALB/c para cada lactobacilo a ensayar. El procedimiento de inoculación en el grupo de ratones es el mismo que fue propuesto para el estudio del efecto curativo. Todos los ratones hembras fueron alimentados e hidratados *ad libitum* en cajuelas separadas con periodos de luz y oscuridad de 12 h respectivamente. Las experiencias se realizaron para cada caso por duplicado.

19.2. Cepas de lactobacilos

A partir de cultivos frizados de las cepas de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 se realizaron subcultivos en caldos MRS a 37 °C durante 24-48 h en microaerobiosis. Posterior al período de incubación, se procedió al aislamiento en estrías por agotamiento de cada una de las cepas en placas de agar MRS y se incubaron bajo las mismas condiciones antes mencionadas. Desde las colonias aisladas de cada cepa se realizaron nuevos subcultivos en caldos MRS para obtener las suspensiones bacterianas necesarias.

19.3. Bacterias patógenas

Un cultivo de SGB conservado a -20 °C, fue subcultivado en CTS (Britania, Argentina) e incubado a 37 °C en microaerofilia durante 24 h. Luego se realizó el

aislamiento de las colonias en placas con ATS, en las mismas condiciones descritas anteriormente y se hicieron cultivos frescos para los posteriores estudios *in vivo*.

19.4. Valoración de la dosis efectiva de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre *Streptococcus agalactiae* en vagina de ratones BALB/c

En los grupos de ratones hembras BALB/c se evaluó el efecto curativo vaginal de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* a 4 concentraciones diferentes de cada uno de lactobacilos sobre la cepa de SGB en estudio. Para ello se siguió un procedimiento similar al descrito para el de efecto curativo de estas cepas. Las experiencias se llevaron a cabo durante 9 días (t_0 , t_1 , t_2 , t_3 , t_4 , t_5 , t_6 , t_7 , t_8) y el diseño consistió en una inoculación vaginal de la cepa de *S. agalactiae* permitiendo su colonización y 48 h posteriores, se inocularon alícuotas de cada una de las concentraciones respectivas de lactobacilos en los distintos grupos de ratones. Diariamente se realizaron tomas de muestras vaginales y recuentos en placas con los medios adecuados para determinar el número de estreptococos y lactobacilos correspondientes. Los ensayos independientes se realizaron por duplicado para cada concentración de lactobacilo a estudiar.

A partir de colonias aisladas de *S. agalactiae* en ASC, se hizo un subcultivo en CTS y se incubó a 37 °C durante 24 h en atmósfera controlada con CO₂ al 5%, luego se realizó una suspensión de 10⁷ UFC/ml de la cepa de estreptococo. La concentración inicial a tiempo t_0 de *S. agalactiae* se determinó mediante recuento de colonias en placas de ASC. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h en atmósfera controlada con CO₂ al 5%.

Se realizaron subcultivos de ambos lactobacilos en caldo MRS, incubados a 37 °C durante 24 h en atmósfera controlada con CO₂ al 5%. Las suspensiones de lactobacilos a inocular fueron ajustadas por comparación con los tubos 1 y 10 de la escala de Mc Farland cuya densidad óptica equivale a concentraciones del orden de 10⁸ y 10⁹ UFC/ml. A partir de los tubos 10⁸ se realizaron diluciones seriadas decimales en PBS estéril hasta obtener concentraciones del orden de 10⁶ y 10⁴ para cada cepa de lactobacilo. Posteriormente se determinó la concentración de bacterias lácticas iniciales (t_0) mediante recuentos en placa con agar MRS para las distintas concentraciones, incubadas en las mismas condiciones descritas anteriormente.

En este ensayo se realizó una sola inoculación a t_0 de la suspensión de estreptococo en el grupo de ratones. La toma de muestra diaria por ratón se realizó mediante hisopado vaginal a las 24 h (t_1), 48 h (t_2) pos-inoculación y durante 7 días posteriores.

A las 48 h posinoculación de *S. agalactiae* (t_2) se reinocularon todos los ratones con 20 µl de la suspensión del lactobacilo respectivo. Se recogieron muestras vaginales consecutivas de cada ratón a tiempo t_3 , t_4 , t_5 , t_6 , t_7 , t_8 con hisopo estéril y se colocaron en tubos Eppendorf con 80 µl de PBS estéril, desde los cuales se realizaron las diluciones

decimales correspondientes y siembras en placas con ASC para la búsqueda de SGB y MRS para el recuento de lactobacilos. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24-48 h en microaerobiosis. Los recuentos diarios del número de colonias de estreptococos y lactobacilos presentes, se expresaron en UFC/ml y luego se transformaron a logaritmo decimal.

20. Análisis estadístico

Se determinó mediante el análisis de la varianza los supuestos de la normalidad y homogeneidad de la varianza sobre los datos obtenidos en las diferentes experiencias. Los datos de las experiencias *in vivo* fueron transformados a logaritmos decimales $\log_{10}(x+1)$ para obtener la homogeneidad de la varianza. Se utilizó un nivel de significancia de 0,05 y se realizaron las comparaciones múltiples mediante la prueba de LSD de Fisher y de Bonferroni. El test de la menor diferencia significativa (LSD) fue usado para determinar las diferencias entre los recuentos totales y los recuentos en los diferentes días. El análisis realizado usando un PROCGLM in SAS (SAS Institute, Cary, NC) (Quinn y col., 2002). Para el análisis de los datos se utilizó el software Sigma Stat Statistical 2006, versión 3.5, NT & 3.1 SPSS Inc. Chicago, US) y el InfoStat (InfoStat versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Resultados y Discusión

Ensayos *in vitro*

1. Antecedentes de las cepas de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 con características bacteriocinogénicas y antimicrobianas

En trabajos previos, realizados por el grupo de investigación (Ruíz, 2005; Ruíz y col., 2005, Ruíz y col., 2007) estudiando la actividad de la bacteriocina de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60, se evaluó la acción de estas sustancias, primeramente, sobre microorganismos aislados de infecciones urinarias y los resultados hallados se muestran en la siguiente tabla 2.

Tabla 2. Actividad inhibitoria de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 sobre el crecimiento bacteriano de distintos patógenos genitourinarios.

Microorganismos aislados	Nº de cepas	Halos promedios de inhibición microbiana (mm) de cada especie bacteriocinogénica de <i>Lactobacillus</i>		% de cepas inhibidas
		cepa L23*	cepa L60*	
<i>Escherichia coli</i>	100	41	39	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	34	36	100
<i>Klebsiella oxytoca</i>	10	30	33	100
<i>Proteus mirabilis</i>	14	40	40	100
<i>Proteus vulgaris</i>	2	38	37	100
<i>Enterobacter cloacae</i>	14	42	47	100
<i>Citrobacter freundii</i>	5	40	36	100
<i>Serratia marscescens</i>	4	54	45	100
<i>Acinetobacter baumannii</i>	5	43	40	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	44	39	100
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6	21	21	100
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	15	30	29	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	36	38	100
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	20	24	100
<i>Enterococcus faecalis</i>	7	31	32	100
<i>Candida albicans</i>	30	15	20	100
<i>Candida glabrata</i>	8	13	0	100

* No hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambas actividades inhibitorias ($p < 0.05$).

Aquí se observó actividad inhibitoria sobre el crecimiento bacteriano de diferentes cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *S. marscescens*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *E. faecalis*, *C. albicans*, *C. glabrata*. Se determinó que el 100% de los microorganismos patógenos estudiados fueron sensibles a la acción inhibitoria de las bacteriocinas de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60. Cuando fueron comparadas las actividades inhibitorias producidas por las cepas de lactobacilos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,05$) mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Estos resultados no coinciden con los hallados en España por López y col., (2001), quienes trabajaron con una cepa bacteriocinogénica de *E. coli* 784, productora de la

microcina 784, con la que determinaron diferentes grados de sensibilidad sobre las bacterias. Todas las cepas inhibidas pertenecieron a especies de *Samonella* pero no fueron inhibidas las especies de *P. aeruginosa*, *S. marscescens*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *K. pneumoniae*, como tampoco otras bacterias Gram positivas. Por otro lado cuando se estudió sobre las interacciones que pudieran existir entre las bacteriocinas de estas bacterias lácticas (BAL) se halló un 30% de indiferencia y un 70% de sinergismo sobre el crecimiento de 200 cepas patógenas causantes fundamentalmente de infecciones urinarias. Más aún, no se halló antagonismo entre estas sustancias con muy buena actividad antimicrobiana. La figura 10 resume los porcentajes de interacción entre las bacteriocinas de las cepas L23 y L60 encontrados hasta el momento.

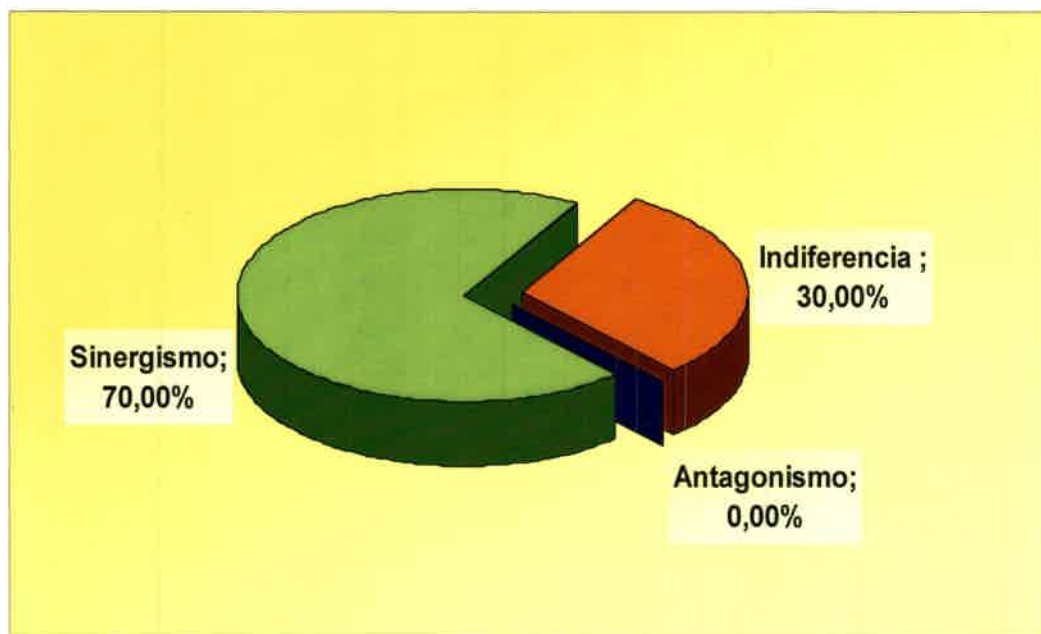


Figura 10. Porcentajes de las interacciones entre las bacteriocinas sintetizadas por *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60.

Las interacciones sinérgicas entre las sustancias antimicrobianas de L23 y L60 se manifestaron en el 100% de las cepas patógenas de *P. vulgaris*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. agalactiae* y *E. faecalis*; seguidos por otros porcentajes significativos de sinergismo entre las cepas de *E. cloacae* (92,85%), *K. oxytoca* (90%), *S. saprophyticus* (80%), *K. pneumoniae* (75%), *C. freundii* (60%) y *E. coli* (60%). En la tabla 3 se detalla el porcentaje de interacciones entre los pares de bacteriocinas producidas por las cepas L23 y L60.

Tabla 3. Interacciones entre las bacteriocinas de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60.

Microorganismos sensibles	Nº de cepas probadas	Interacciones entre bacteriocinas de <i>L. fermentum</i> L23 y <i>L. rhamnosus</i> L60				
		Nº cepas	% de indiferencia	% de antagonismo	Nº cepas	% de sinergismo
<i>Escherichia coli</i>	100	40	(40%)	-	60	(60%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	2	(25%)	-	6	(75%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	10	1	(10%)	-	9	(90%)
<i>Proteus mirabilis</i>	14	9	(64.28%)	-	5	(35.71%)
<i>Proteus vulgaris</i>	2	-	-	-	2	(100%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	14	1	(7.14%)	-	13	(92.85%)
<i>Citrobacter freundii</i>	5	2	(40%)	-	3	(60%)
<i>Serratia marscescens</i>	4	2	(50%)	-	2	(50%)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	5	-	-	-	5	(100%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	-	-	-	3	(100%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6	-	-	-	6	(100%)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	15	3	(20%)	-	12	(80%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	-	-	-	4	(100%)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	-	-	-	3	(100%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	7	-	-	-	7	(100%)
% promedio de las interacciones			30%	0 %		70%

Los resultados sobre estas investigaciones motivaron los estudios de actividad antimicrobiana de las bacteriocinas de estos lactobacilos sobre otros microorganismos productores de infecciones genitales, tales como *N. gonorrhoeae* y *S. agalactiae*. La investigación de esta última bacteria es importante debido a que es obligatoria su detección en mujeres embarazadas, ya que su colonización en el tracto genital femenino puede provocar severas consecuencias al feto y a la madre. Esto sumado a los resultados de interacción sinérgica que nos preceden, sobre un porcentaje considerable de microorganismos patógenos estudiados, hace a la relevancia de este estudio. Asimismo, es necesario destacar que es el primer trabajo en el que se inicia el estudio de la actividad antimicrobiana de bacteriocinas de lactobacilos vaginales y sus posibles interacciones sobre estos dos microorganismos patógenos como potenciales agentes de biocontrol.

2. Aislamiento y caracterización bioquímica de cepas de *Neisseria gonorrhoeae*

A partir de pacientes que concurrieron al Servicio de Ginecología del Nuevo Hospital Río Cuarto, de centros privados de la ciudad y de Córdoba capital, durante un período de 48 meses, se recuperaron 31 cepas de *N. gonorrhoeae* de mujeres con signos de descarga vaginal, blanquecina y purulenta. Debido a la baja incidencia poblacional de *N. gonorrhoeae*, entre el 1-4%, el número de cepas de gonococos estudiadas en este trabajo de tesis es muy importante (Zribi y col., 2008; Trevisan y col., 2008). La epidemiología de las infecciones del tracto reproductivo depende de factores económicos, sociales, corrientes migratorias y hábitos sexuales entre otros (Trevisan y col., 2008, Barry y Klausner, 2009).

Las colonias aisladas en agar TM presentaron una morfología típica de gonococos, colonias pequeñas, traslúcidas, semejante a gotas de rocío en todas las cepas estudiadas. La coloración de Gram reveló diplococos Gram negativos, en forma de granos de café o arriñonados, con sus lados adyacentes enfrentados y aplanados. En la tabla 4 se presentan los resultados de las pruebas bioquímicas de género y especie para su identificación.

Tabla 4. Pruebas bioquímicas para la identificación de especies de *Neisseria gonorrhoeae*.

	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Crecimiento en aerobiosis	+
Oxidasa	+
Catalasa	+
Reducción de Nitratos	-
Oxidación/Fermentación de glucosa	O/ F
Producción de ácidos a partir de:	
Glucosa	+
Maltosa	-
Fructosa	-
Sacarosa	-

Referencias. +: 90% o más de las cepas son positivas; -: 90% de las cepas son negativas. Bergey, 2005.

2.1. Resistencia antibiótica de las cepas gonocócicas

Con respecto a la determinación de la producción de β -lactamasas, el 38% de las cepas de *N. gonorrhoeae* fueron productoras de esta enzima y por lo tanto resistentes a penicilina y ampicilina. Estos resultados de resistencia a β -lactámicos son similares a los hallados por Mendez y col., 2008 y Galarza y col., 2012 quienes informaron valores en un rango del 34-37% para gonococos aislados en Santa Fe y Buenos Aires. Aun así, ninguna de las cepas estudiadas fue resistente a ceftriaxona y cefixima. Estos resultados coinciden parcialmente con los informados por Pagano y colaboradores (2012), quienes evaluaron la susceptibilidad a dichas cefalosporinas de espectro extendido y observaron sensibilidad a ceftriaxona, pero en el caso de cefixima encontraron un porcentaje considerable de cepas gonocócicas con sensibilidad disminuida a dicho antibiótico.

3. Aislamiento y caracterización bioquímica de las cepas de *Streptococcus agalactiae*

Se aislaron 57 cepas de *S. agalactiae* de pacientes femeninas que concurren al Nuevo Hospital Río Cuarto y a instituciones privadas, durante un período de 48 meses. La mayoría de las cepas aisladas en ASC al 5% presentaron una morfología de colonias pequeñas de 2 mm de diámetro, lisas y rodeadas por un halo de β -hemólisis, aunque algunas de ellas no presentaron dicha característica fenotípica, resultando en cepas no hemolíticas. Posteriormente se realizó coloración de Gram y se observaron cocos Gram

positivos de a pares formando cadenas de longitud variable. En la tabla 5 se presentan los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de las cepas de *S. agalactiae*. Cuando se realizó la prueba de aglutinación con partículas de látex sensibilizadas con el antígeno específico de grupo, se determinó que todas las cepas pertenecieron al serogrupo B de Lancefield.

Tabla 5. Características bioquímicas para la diferenciación e identificación de *Streptococcus agalactiae*.

	<i>Streptococcus agalactiae</i>
Crecimiento en aerobiosis	+
Crecimiento en aerobiosis con 5% de CO₂	+
Crecimiento anaeróbico	+
Crecimiento a :	
10°C	d
45°C	-
pH 9.6	-
Crecimiento con:	
6.5% NaCl	d
40% bilis	d
Alfa-hemólisis	-
Beta-hemólisis	+
Hidrólisis de:	
Arginina	+
Hipurato	+
Esculina	-
Producción de ácidos a partir de:	
Inulina	-
Lactosa	d
Manitol	-
Rafinosa	-
Ribosa	+
Salicina	d
Sorbitol	-
Trealosa	+
Producción de Pirrolidonilamidasa	-
Producción de CAMP	+
Prueba de Voges-Proskauer	+
Susceptibilidad a TMS	R
Susceptibilidad a bacitracina	R
Grupo serológico de Lancefield	B

Referencias. +: 90% o más de las cepas son positivas; -: 90% o más de las cepas son negativas; d: 11-89% de las cepas son positivas; R: 90% o más de las cepas son resistentes; B: Antígeno específico de grupo.

3.1. Resistencia antibiótica de las cepas de *Streptococcus agalactiae*

Al estudiar la susceptibilidad antibiótica de las cepas de SGB aisladas según las recomendaciones internacionales del CLSI, se hallaron los siguientes porcentajes de resistencia antibiótica: 54% de las cepas fueron resistentes a ampicilina (10 µg), 42% a

gentamicina (10 µg), 35% a eritromicina (15 µg), 31% a oxacilina (1 µg) y 17,31% de las mismas presentaron resistencia a cefalotina. Ninguna de las cepas de *S. agalactiae* estudiadas fue resistente a penicilina (10 U) o a clindamicina (2 µg). Estos resultados de sensibilidad a penicilina, seguidos por un alto porcentaje de sensibilidad cefalotina entre las cepas de SGB ensayadas, fueron similares a lo informado en otros estudios de algunas provincias de nuestro país durante los últimos cinco años (Lopardo, 2007, Quiroga y col., 2008, Zalazar, 2009, Cecchini y col., 2012). Por su parte, la elevada resistencia a ampicilina obtenida aquí, coincide con los resultados de Linhares y colaboradores (2011), quienes evaluaron la prevalencia de portación y la susceptibilidad antimicrobiana de SGB en mujeres embarazadas y hallaron similares valores de resistencia a dicho antibiótico. Los resultados encontrados con eritromicina en estas cepas de *S. agalactiae*, difieren con los obtenidos en otros trabajos de Chile, Neuquén y Misiones, donde se informaron valores significativamente menores de resistencia a eritromicina (7,3-7,1%) (Quiroga y col., 2008, Abarzúa y col., 2011, Oviedo y col., 2012, Zurchimetten y col., 2012). Para el tratamiento de las infecciones producidas por cepas de SGB en nuestro país, la penicilina continua siendo el primer antibiótico de elección. Sin embargo para los pacientes alérgicos a dicho antibiótico, algunas investigaciones han señalado a gentamicina, oxacilina y clindamicina como una segunda opción terapéutica (Puopolo y col., 2007). Los porcentajes de resistencia a gentamicina y oxacilina obtenidos en este trabajo coinciden parcialmente con lo informado previamente por Lopardo (2007), quien halló valores de resistencia respectivamente superiores en cepas de *S. agalactiae* aisladas de mujeres embarazadas. Asimismo, la elevada resistencia a gentamicina encontrada en estas cepas, no coincide con los resultados de un estudio reciente realizado por Hraoui y colaboradores, (2012), donde registraron un valor de resistencia a gentamicina significativamente menor (1,3%) entre los aislamientos clínicos de SGB. Si bien todas las cepas estreptocócicas estudiadas presentaron sensibilidad a clindamicina, estos hallazgos difieren notablemente con otros trabajos donde se encontraron valores diferentes de resistencia a dicho antibiótico en un rango del 9,6% al 78% (Pinheiro y col., 2009, Shabayek y col., 2009, Linhares y col., 2011, Clifford y col., 2011).

4. Actividad inhibitoria de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas producidos por *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus rhamnosus* sobre *Neisseria gonorrhoeae*

Cuando se evaluó la actividad antimicrobiana de los SLCs puros de ambas cepas, *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 mediante la técnica de difusión en pozo, sobre las 31 cepas de *N. gonorrhoeae* estudiadas, se halló que el 100% de las cepas de gonococos fueron sensibles a los metabolitos presentes en los sobrenadantes de cada lactobacilo. Los halos de inhibición promedio del crecimiento bacteriano obtenidos con el SLC de la cepa L23 fueron de 18,33mm ± 2,48 y de 19,01mm ± 2,69 para la cepa L60, sobre el total de

gonococos estudiados. El análisis de la varianza (ANOVA) de la acción antimicrobiana de ambos SLCs no demostró diferencias estadísticas sobre los diplococos ensayados ($p < 0,05$). Estos resultados coinciden con lo observado por Castro y De Rovetto (2006) quienes utilizando otras cepas de lactobacilos productoras de sustancias con actividad antimicrobiana, observaron inhibición del desarrollo de *N. gonorrhoeae* y otros microorganismos uropatógenos. De igual modo en este trabajo se evaluaron los sobrenadantes neutralizados para inhibir el efecto de los ácidos y tratados con enzima peroxidasa para impedir la acción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En el SLC neutralizado y tratado con peroxidasa se observó solamente la acción de la bacteriocina. Los SLCs de ambos lactobacilos neutralizados inhibieron el 100% de las cepas ensayadas. Esta actividad inhibitoria del SLC de *L. fermentum* correspondió a la acción de la bacteriocina L23, mientras que en el caso de *L. rhamnosus* se debió a la actividad antimicrobiana conjunta del peróxido y la bacteriocina L60. El tamaño promedio de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano para el SLC neutralizado de la cepa L60 fue de $16,93\text{mm} \pm 2,44$ para el total de cepas de *N. gonorrhoeae* ensayadas (Tabla 6). Sobre estas fracciones los resultados encontrados en el presente trabajo difieren de los hallazgos por Juárez Tomas y col., (2003), quienes utilizando sobrenadantes de cepas de *L. brevis* y *L. acidophilus* sobre gonococos, observaron la pérdida de actividad inhibitoria en dichos extractos cuando fueron neutralizados, indicando en ese estudio que el efecto inhibitorio fue debido a los ácidos. Los resultados de Amant y col. (2002) coinciden parcialmente con lo obtenido en este trabajo, ya que cepas de *L. jensenii* y *L. crispatus* inhibieron el desarrollo de *N. gonorrhoeae* aún luego de la neutralización de los ácidos orgánicos, atribuyendo la actividad antimicrobiana al peróxido de hidrógeno presente en los SLCs de dichas cepas.

El 100% de las cepas de *N. gonorrhoeae* fueron sensibles a cada una de las bacteriocinas producidas por ambas cepas de lactobacilos L23 y L60 con valores de halos de inhibición promedios de 15,81 mm y 15,01 mm respectivamente (Tabla 6). En la figura 11 se muestra la inhibición del desarrollo microbiano de distintas cepas de gonococos por acción del SLC sin tratar y neutralizado de *L. fermentum* L23. Estos resultados de inhibición producidos por las bacteriocinas L23 y L60 fueron superiores a los informados por Morency y col., (2001), quienes evaluaron la actividad antimicrobiana ejercida por bacteriocinas producidas por bacterias diferentes a lactobacilos, como nisina A, Z; mutacinas A, B, I, J, T y la bacteriocina epidermina, sintetizada por una cepa de *Staphylococcus epidermidis*, sobre 2 cepas de gonococos resistentes a antibióticos. De manera similar la actividad antimicrobiana producida por las bacteriocinas L23 y L60 y su amplio espectro de actividad no son comparables con la hallada por Ocaña y col., (1999), quienes caracterizando una bacteriocina producida por una cepa de *L. salivarius*, hallaron inhibición sobre un número reducido de especies bacterianas, entre ellas una única cepa de *N. gonorrhoeae*. Los

resultados obtenidos con los SLCs de ambos lactobacilos, con el SLC neutralizado de L23 y el SLC neutralizado y tratado con peroxidasa de L60 son de relevancia comparados a los informados por Graver y Wade, (2011). Estos autores investigando la actividad inhibitoria de 3 cepas de colección, *L. crispatus*, *L. gasseri* y *L. jensenii*, descritas respectivamente como fuerte, débil productora, y no productora de H_2O_2 sobre cepas de *N. gonorrhoeae*, atribuyeron la actividad inhibitoria sólo a la producción de ácidos orgánicos y no al peróxido de hidrógeno liberado respectivamente por *L. crispatus* y *L. gasseri*, a diferencia de los resultados obtenidos en este estudio con la cepa L60. Los resultados obtenidos con las cepas de lactobacilos mostraron que la actividad antimicrobiana sobre los gonococos estudiados, fue debido a la bacteriocina L23 y a la acción de los ácidos orgánicos para la cepa L23, mientras que en el caso de *L. rhamnosus* L60 la actividad inhibitoria se atribuyó a la bacteriocina L60 producida por esta cepa, los ácidos orgánicos y al H_2O_2 (Figura 12).

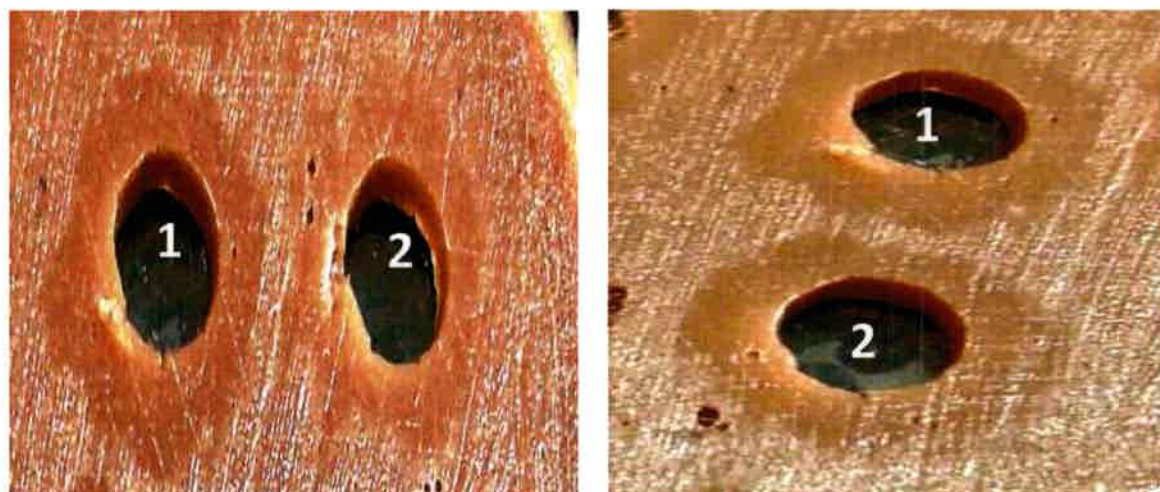


Figura 11. Efecto inhibitorio producido por los sobrenadantes libres de células de *Lactobacillus fermentum* L23 sobre el desarrollo microbiano de distintas cepas gonocócicas (A, B). Referencias. 1: SLC sin tratar, 2: SLCN neutralizado.

El análisis estadístico de ANOVA de las actividades antimicrobianas de las bacteriocinas L23 y L60 mostró diferencias estadísticas significativas entre las sustancias sobre el total de gonococos ensayados ($p < 0,05$). En la tabla 6 se presentan los promedios de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano de las cepas de gonococos frente al SLC sin tratar, al SLCN y a las bacteriocinas. La inhibición del crecimiento bacteriano por el SLC de *L. fermentum* fue estadísticamente superior a la inhibición del crecimiento por la bacteriocina de este lactobacilo. Para *L. rhamnosus* también se halló diferencia estadísticamente significativa entre la actividad antimicrobiana del SLC y a los diferentes tratamientos del mismo ($p < 0,001$).

Tabla 6. Actividad antimicrobiana de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas producidas por *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus rhamnosus* sobre *Neisseria gonorrhoeae*.

Cepas de NG	Promedio y desvío estándar de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano en mm				
	<i>L. fermentum</i> L23		<i>L. rhamnosus</i> L60		
	SLC	Bacteriocina L23	SLC	SLCN	Bacteriocina L60
1	19,7 ± 1,5	17,7 ± 0,5	18,7 ± 0,5	17,0 ± 0,0	14,7 ± 0,5
2	23,3 ± 1,1	21,0 ± 1,0	25,3 ± 0,5	21,0 ± 2,0	18,7 ± 1,5
3	22,3 ± 2,5	18,0 ± 1,7	22,0 ± 2,0	19,7 ± 0,5	17,7 ± 1,1
4	18,7 ± 1,1	17,0 ± 0,0		14,0 ± 1,0	13,0 ± 1,0
5	16,0 ± 2,0	14,0 ± 1,0	15,3 ± 0,5	14,0 ± 1,0	13,0 ± 0,0
6	18,3 ± 0,5	15,7 ± 1,1		15,0 ± 1,0	14,0 ± 1,0
7	21,0 ± 1,0	18,7 ± 0,5	19,7 ± 1,5	17,7 ± 0,5	16,0 ± 1,0
8		13,0 ± 0,0		15,0 ± 1,0	14,0 ± 1,0
9	19,0 ± 1,0	15,3 ± 0,5	19,7 ± 0,5	18,3 ± 0,5	16,7 ± 0,5
10		13,0 ± 1,0		15,0 ± 1,0	14,0 ± 1,0
11	14,3 ± 0,5	13,0 ± 0,0	15,7 ± 1,5	14,0 ± 1,0	13,0 ± 1,0
12		16,0 ± 1,0		13,0 ± 2,0	12,3 ± 2,0
13	20,7 ± 2,0	17,7 ± 1,5	14,0 ± 0,0	13,0 ± 1,0	12,0 ± 1,0
14		15,7 ± 0,5		17,0 ± 1,0	15,0 ± 0,0
15	17,0 ± 2,0	16,0 ± 1,0	19,7 ± 2,0	18,0 ± 2,0	16,0 ± 1,0
16	18,7 ± 0,5	16,3 ± 0,5		18,7 ± 0,5	17,0 ± 0,0
17	17,7 ± 0,5	16,0 ± 0,0	21,3 ± 0,5	17,7 ± 0,5	15,3 ± 0,5
18	18,3 ± 0,5	16,7 ± 0,5		17,0 ± 1,0	14,3 ± 0,5
19	19,7 ± 2,9	17,0 ± 1,0	21,0 ± 1,0	19,0 ± 1,0	16,7 ± 0,5
20		16,7 ± 0,5		17,7 ± 0,5	15,7 ± 0,5
21	19,0 ± 1,0	16,3 ± 1,1	19,7 ± 0,5	18,3 ± 0,5	16,7 ± 0,5
22	20,7 ± 2,0	17,0 ± 1,0		19,7 ± 0,5	17,3 ± 1,1
23	18,0 ± 1,0	15,0 ± 1,0	20,3 ± 1,1	18,7 ± 0,5	16,3 ± 0,5
24	17,3 ± 0,5	15,0 ± 1,0		21,3 ± 1,5	19,3 ± 2,3
25	19,7 ± 0,5	16,3 ± 0,5	18,7 ± 0,5	16,7 ± 0,5	14,3 ± 0,5
26	16,7 ± 0,5	13,3 ± 1,1		16,7 ± 0,5	14,7 ± 0,5
27	17,3 ± 0,5	14,3 ± 0,5	19,0 ± 0,0	17,3 ± 0,5	15,7 ± 0,5
28	16,3 ± 1,1	13,3 ± 0,5		16,3 ± 1,1	14,0 ± 0,0
29	20,3 ± 0,5	19,6 ± 1,5	19,6 ± 1,5	18,0 ± 1,7	15,0 ± 1,0
30	19,6 ± 0,5	18,6 ± 1,5		17,3 ± 1,5	15,3 ± 0,5
31	18,0 ± 0,5	17,0 ± 1,0	18,0 ± 1,0	16,0 ± 1,0	15,0 ± 1,0

Referencias: NG: *Neisseria gonorrhoeae*; SLC: Sobrenadante libre de células, SLCN: Sobrenadante libre de células neutralizado.

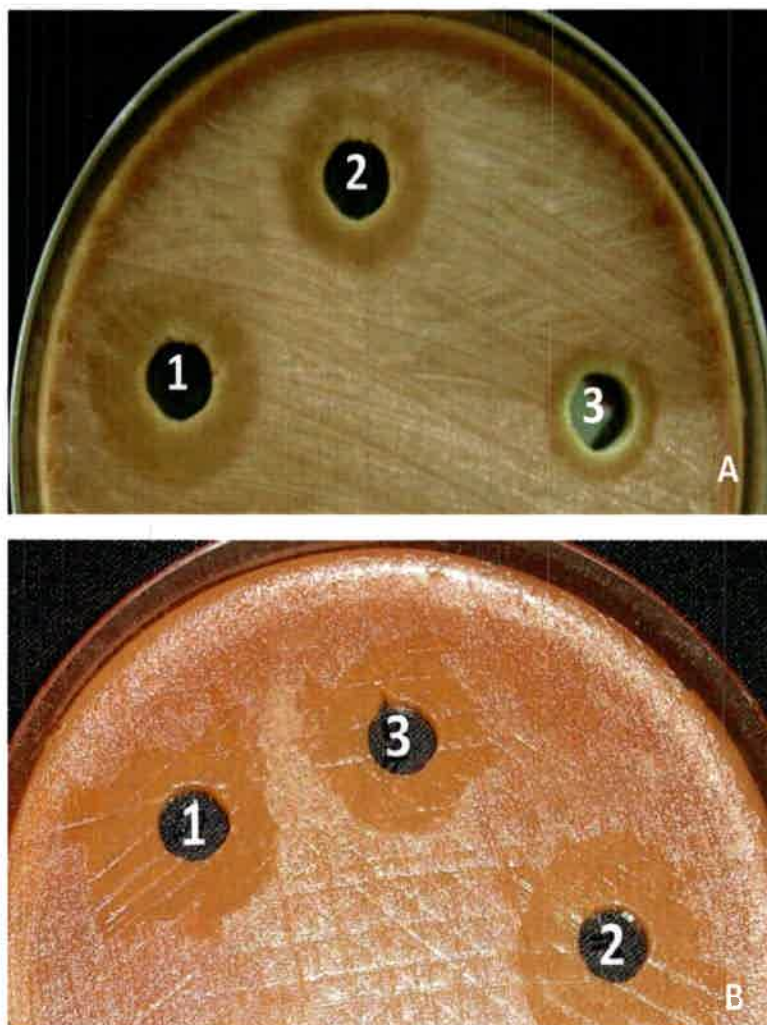


Figura 12. Efecto inhibitorio de los sobrenadantes libres de células de *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre el desarrollo microbiano de distintas cepas de *Neisseria gonorrhoeae* (A, B). Referencia: 1: SLC sin tratar, 2: SLCN neutralizado con NaOH, 3: SLCNP neutralizado y tratado con peroxidasa (bacteriocina L60).

Los hallazgos de actividad inhibitoria de cada una de las sustancias contenidas en los SLCs de estos lactobacilos resultan de importancia, ya que en la bibliografía consultada son escasas las investigaciones donde se informa que la inhibición de los gonococos, además de ser atribuida a la producción de ácidos por los lactobacilos, también es debida a otros metabolitos, como las bacteriocinas y H_2O_2 . A pesar de que abundan trabajos sobre bacteriocinas producidas por microorganismos de otros géneros bacterianos y sobre bacteriocinas del género *Lactobacillus* son escasos los trabajos referidos específicamente sobre el control biológico de gonococos.

En función a la actividad antimicrobiana encontrada con los distintos metabolitos activos presentes en los SLCs de los lactobacilos en estudio, se determinó en qué proporción los ácidos, el peróxido de hidrógeno y ambas bacteriocinas, fueron responsables de la inhibición hallada sobre las cepas de gonococos ensayadas (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano correspondientes a cada sustancia antimicrobiana producida por *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre *Neisseria gonorrhoeae*.

Cepas de NG	Valores porcentuales de actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano				
	<i>L. fermentum</i> L23		<i>L. rhamnosus</i> L60		
		Bacteriocina			Bacteriocina
1	10,00%	90,00%	10,00%	11,00%	79,00%
2		90,00%			74,00%
3	20,00%	80,00%	10,00%	10,00%	80,00%
4		90,00%			77,84%
5	13,00%	88,00%	6,67%	6,67%	86,66%
6		86,00%			83,83%
7	10,00%	90,00%	10,15%	8,63%	81,22%
8		93,00%			87,50%
9	20,00%	80,00%	7,11%	8,12%	84,77%
10		90,00%			87,50%
11	7,00%	93,00%	10,83%	6,37%	82,80%
12		90,00%			78,00%
13	15,00%	85,00%	7,14%	7,14%	85,72%
14		89,00%			80,21%
15	4,00%	96,00%	8,63%	10,15%	81,22%
16		87,00%			77,27%
17	9,60%	90,40%	16,90%	11,27%	71,83%
18		91,00%			74,10%
19	13,70%	86,30%	9,53%	10,95%	79,52%
20		86,40%			82,63%
21	14,00%	86,00%	7,11%	8,12%	84,77%
22		82,00%			79,72%
23	16,60%	83,40%	7,88%	11,82%	80,30%
24		87,00%			82,84%
25	17,00%	83,00%	10,70%	12,83%	76,47%
26		80,00%			80,33%
27	17,00%	83,00%	8,95%	8,42%	82,63%
28		82,00%			74,87%
29	8,21%	91,79%	8,44%	10,17%	81,39%
30		89,28%			77,98%
31	13,00%	87,00%	11,11%	5,55%	83,34%

Referencia. NG: *Neisseria gonorrhoeae*

Como se puede apreciar en la figura 13, para la cepa *L. fermentum* L23 el 87,28% del efecto inhibitorio encontrado en el SLC neutralizado correspondió a la acción de la bacteriocina y el 12,77% restante se debió a los ácidos orgánicos liberados por esta cepa de lactobacilo.

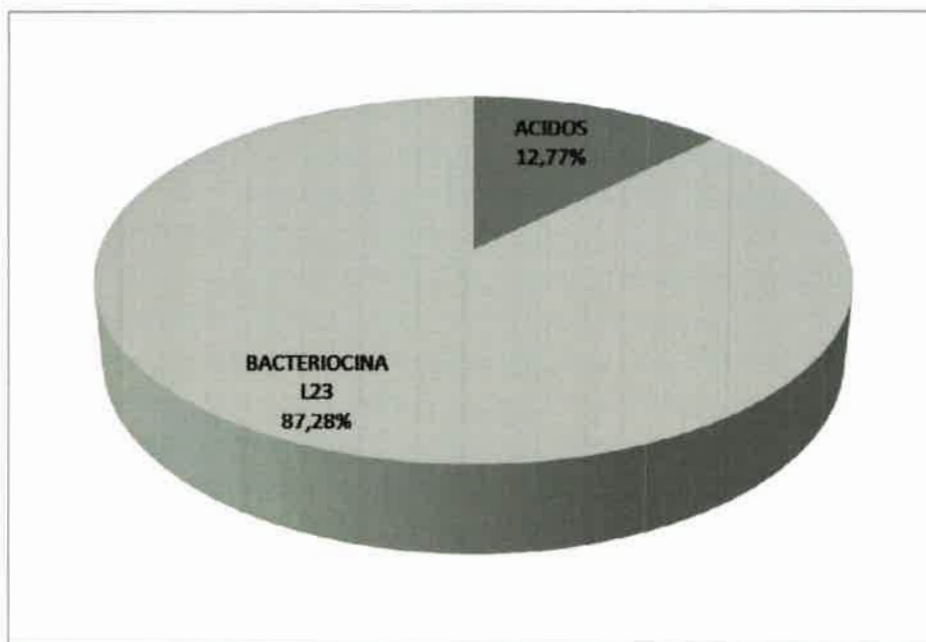


Figura 13. Valor porcentual de la actividad inhibitoria de los ácidos orgánicos y la bacteriocina L23 de *Lactobacillus fermentum* sobre cepas de *Neisseria gonorrhoeae*.

Para *L. rhamnosus* L60 la inhibición del crecimiento por la actividad de la bacteriocina correspondió al 80,66%, mientras que el porcentaje restante de inhibición de las cepas de gonococos fue debido a la acción antimicrobiana producida por los ácidos orgánicos (10,20%) y el H_2O_2 (9,14%) (Figura 14).

Estos resultados resaltan la importancia de la acción de las bacteriocinas de ambos lactobacilos sobre gonococos, ya que el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano fue debido a la producción de este metabolito secundario comparado a otros estudios que evidencian como principal actividad inhibitoria la de los ácidos y del H_2O_2 producidos por lactobacilos sobre *N. gonorrhoeae*. Debido a que en la bibliografía consultada no se hallaron estudios donde se evalúa la actividad antimicrobiana de bacteriocinas sobre un número importante de cepas de gonococos, estos resultados son novedosos y muy alentadores para la posible utilización de estas cepas de lactobacilos en el control biológico de las infecciones producidas por estos microorganismos.

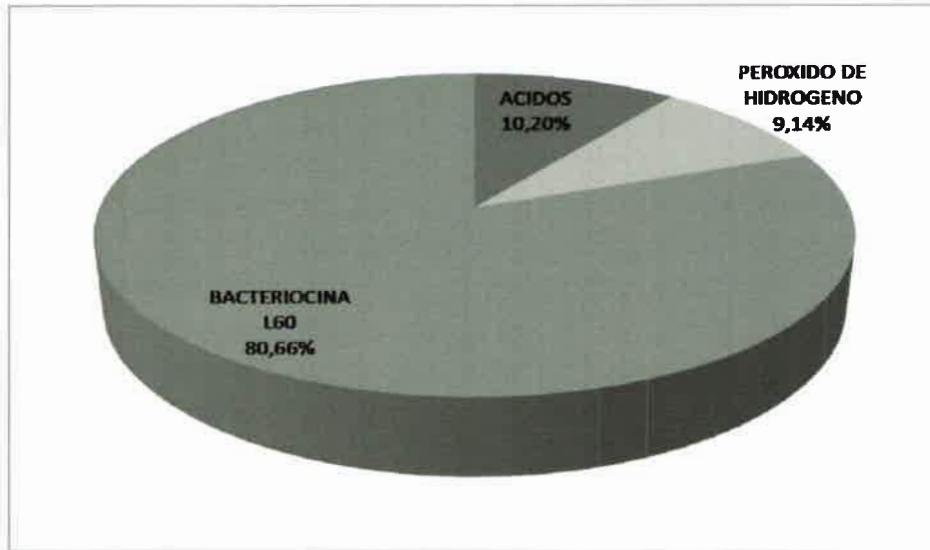


Figura 14. Valores porcentuales de la acción de los ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y la bacteriocina L60 de *Lactobacillus rhamnosus* sobre la inhibición del crecimiento de *Neisseria gonorrhoeae*.

5. Concentración inhibitoria mínima de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus rhamnosus* sobre *Neisseria gonorrhoeae*

Al determinar la CIM de las bacteriocinas L23 y L60 sobre las diferentes cepas de *N. gonorrhoeae*, se encontró un amplio rango de valores de actividad inhibitoria. El 16,13% de las cepas de *N. gonorrhoeae* presentó una CIM de 10 UA/ml, 22,58% fueron inhibidas con una CIM de 20 UA/ml, 22,58% con una CIM de 40 UA/ml, 32,26% con una CIM de 80 UA/ml y el 6,45% restante de las cepas, fue inhibido con una CIM de 160 UA/ml de la bacteriocina L23 (Figura 15). En la tabla 8 se detallan los halos de inhibición promedio y su valor equivalente de CIM sobre los gonococos estudiados.

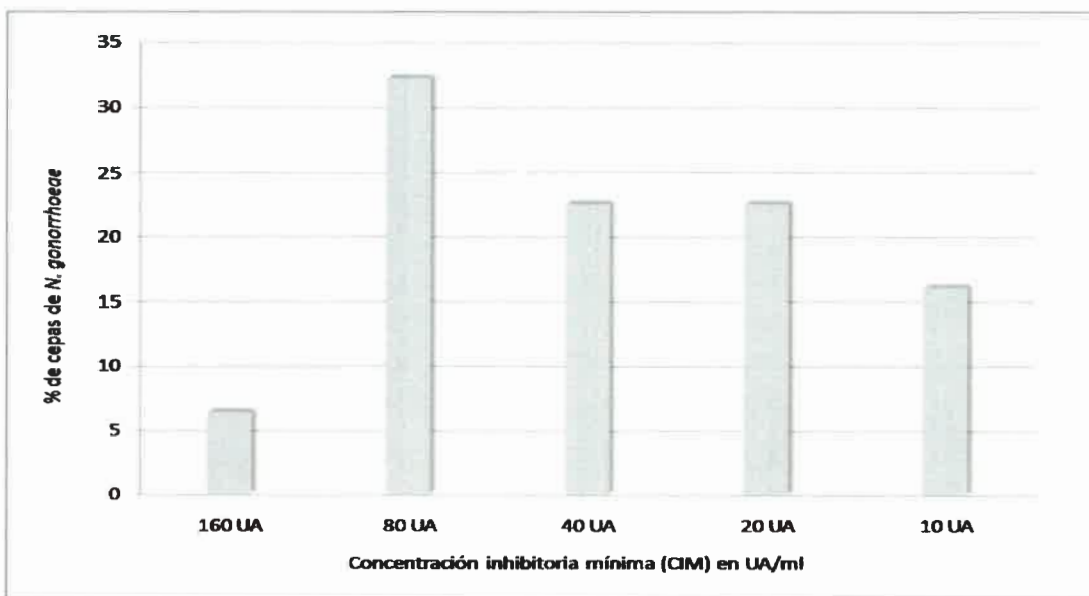


Figura 15. CIM de la bacteriocina de *Lactobacillus fermentum* sobre *Neisseria gonorrhoeae*.

Tabla 8. Concentración inhibitoria mínima de la bacteriocina de *Lactobacillus fermentum* L23 sobre gonococos.

Cepas de NG	Tamaño de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano en (mm) producidos por bacteriocina L23								
	640 UA/ml	320 UA/ml	160 UA/ml	80 UA/ml	40 UA/ml	20 UA/ml	10 UA/ml	5 UA/ml	CIM UA/ml
1	16	16	14	14	13	0	0	0	40
2	21	18	18	16	15	15	0	0	20
3	18	17	16	16	15	14	0	0	20
4	17	17	16	15	14	14	0	0	20
5	14	13	13	11	0	0	0	0	80
6	15	14	13	13	0	0	0	0	80
7	17	16	15	13	12	0	0	0	40
8	13	13	11	0	0	0	0	0	160
9	16	14	13	11	0	0	0	0	80
10	13	12	12	0	0	0	0	0	160
11	13	14	12	12	11	10	0	0	20
12	17	16	14	13	11	0	0	0	40
13	16	15	14	14	13	0	0	0	40
14	15	14	14	11	0	0	0	0	80
15	16	15	14	11	0	0	0	0	80
16	16	15	14	11	0	0	0	0	80
17	16	14	12	9	0	0	0	0	80
18	17	15	12	10	0	0	0	0	80
19	16	14	13	10	0	0	0	0	80
20	17	14	13	12	11	0	0	0	40
21	17	15	13	11	8	0	0	0	40
22	20	20	18	16	14	12	0	0	20
23	20	19	17	16	13	11	0	0	20
24	19	19	18	18	16	15	13	0	10
25	21	19	18	18	17	15	11	0	10
26	17	16	15	15	14	14	10	0	10
27	14	13	13	12	12	11	11	0	10
28	14	13	13	13	12	12	10	0	10
29	19	18	18	16	14	12	0	0	20
30	17	18	16	14	11	0	0	0	40
31	16	15	13	11	0	0	0	0	80

Referencia. NG: *Neisseria gonorrhoeae*

Los resultados obtenidos al realizar la CIM de la bacteriocina L23 producida por *L. fermentum* son relevantes ya que aún muy diluida esta sustancia, presentó actividad inhibitoria sobre el 93,55 % de los gonococos ensayados, correspondiendo al rango comprendido entre 10-80 UA/ml de esta bacteriocina. A continuación, en la figura 16 se observa la CIM de la bacteriocina L23 sobre distintas cepas de gonococos.

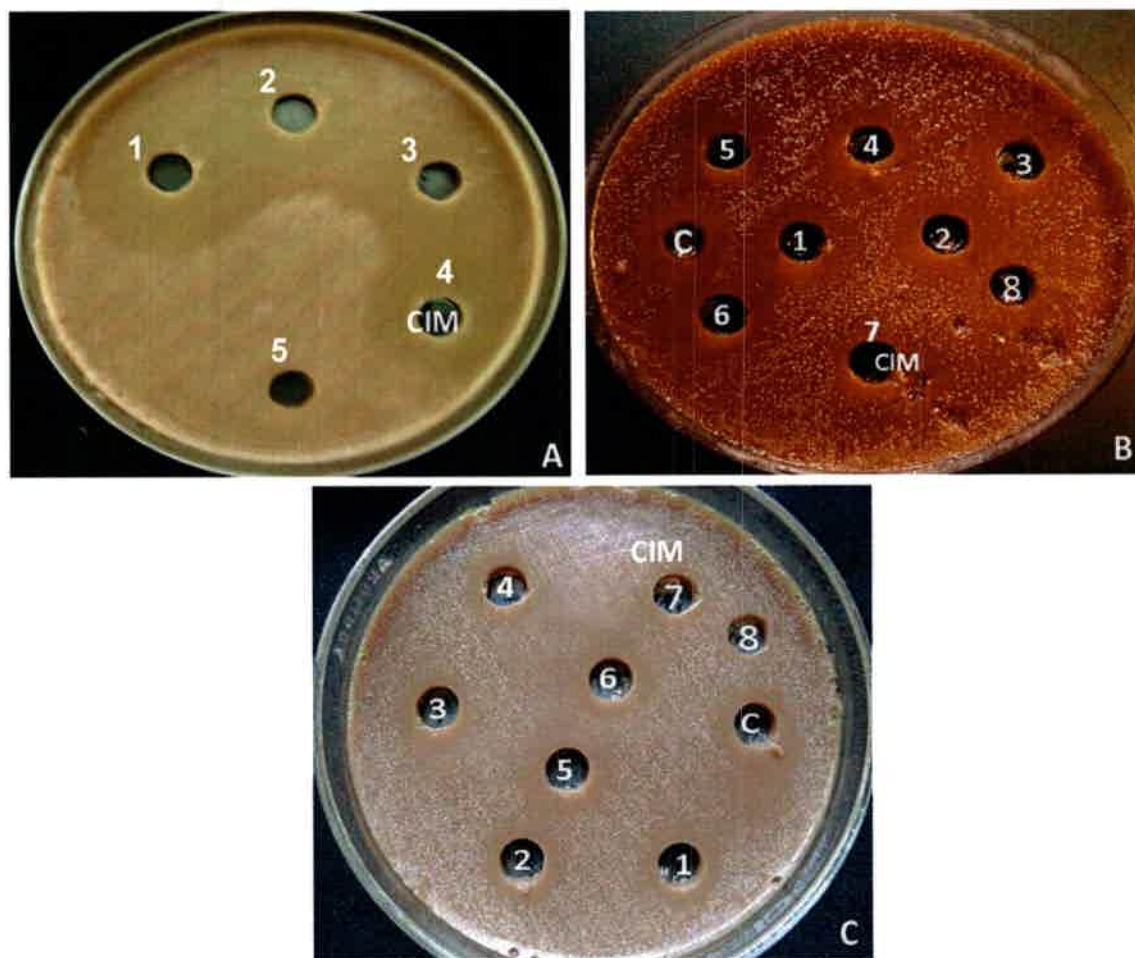


Figura 16. CIM de la bacteriocina L23 de *Lactobacillus fermentum* L23 sobre diferentes cepas de *Neisseria gonorrhoeae* (A, B, C). Referencia. C: sobrenadante puro, 1: 640 UA/ml, 2: 320 UA/ml, 3: 160 UA/ml, 4: 80 UA/ml, 5: 40 UA/ml, 6: 20 UA/ml, 7: 10 UA/ml, 8: 5 UA/ml.

La CIM de la bacteriocina L60, sintetizada por *L. rhamnosus*, fue de 10 UA/ml para el 16,13 % de las cepas de *N. gonorrhoeae*, 9,67% de las mismas fueron inhibidas con una CIM de 20 UA/ml, 12,90 % con una CIM de 40 UA/ml, 38,71% con una CIM de 80 UA/ml y el 22,59% de las cepas restantes con una CIM de 160 UA/ml. En la figura 17 y tabla 9 se presentan los valores y porcentajes de CIM de la bacteriocina L60 sobre los diplococos estudiados.

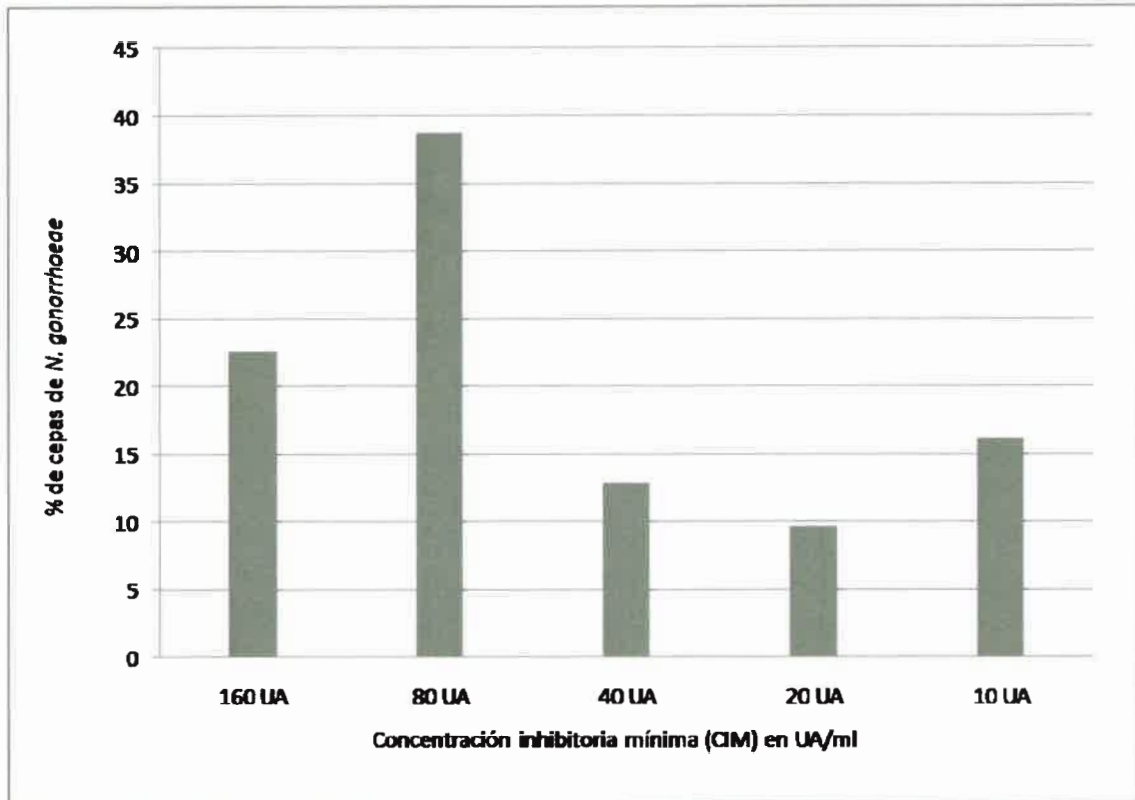


Figura 17. CIM de la bacteriocina L60 de *Lactobacillus rhamnosus* sobre *Neisseria gonorrhoeae*.

Los resultados de la CIM para la bacteriocina producida por *L. rhamnosus*, revelaron que aún muy diluida, mostró actividad inhibitoria sobre 24 cepas de gonococos (77,41%), correspondiendo a la CIM comprendida entre 10 y 80 UA/ml. El 22,59% restante de los diplococos fueron inhibidos por una CIM de 160 UA/ml (Figura 18). Al comparar las CIMs obtenidas en este estudio para la bacteriocina L23 y L60, se observó que L23 fue más efectiva en relación a L60 sobre las cepas de gonococos estudiadas. Aún así, ambas sustancias poseen una notable actividad inhibitoria sobre el desarrollo microbiano de los gonococos ya que más del 77% de las cepas estudiadas fueron susceptibles a ambas bacteriocinas, siendo este hecho de suma importancia para su potencial uso combinado.

Tabla 9. Concentración inhibitoria mínima de la bacteriocina de *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre gonococos.

Cepas de NG	Radio de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano en (mm) producido por bacteriocina L60								
	640 UA/ml	320 UA/ml	160 UA/ml	80 UA/ml	40 UA/ml	20 UA/ml	10 UA/ml	5 UA/ml	CIM UA/ml
1	14	12	11	10	10	0	0	0	40
2	18	18	16	14	13	12	0	0	20
3	17	16	16	15	14	11	0	0	20
4	13	12	11	0	0	0	0	0	160
5	13	12	12	0	0	0	0	0	
6	14	14	13	11	0	0	0	0	80
7	15	14	13	11	0	0	0	0	80
8	14	14	13	11	0	0	0	0	80
9	16	15	15	14	12	0	0	0	40
10	14	13	12	11	0	0	0	0	80
11	13	12	11	0	0	0	0	0	
12	12	12	11	11	0	0	0	0	80
13	12	12	11	0	0	0	0	0	
14	15	14	14	12	0	0	0	0	80
15	12	15	13	13	11	0	0	0	40
16	17	14	10	0	0	0	0	0	160
17	15	12	10	0	0	0	0	0	
18	14	12	10	8	0	0	0	0	80
19	17	16	14	9	0	0	0	0	80
20	16	14	11	9	0	0	0	0	80
21	17	15	11	8	0	0	0	0	80
22	18	17	16	14	11	10	0	0	20
23	16	16	15	13	11	0	0	0	40
24	19	19	18	18	16	13	11	0	10
25	14	14	13	13	12	12	11	0	10
26	15	13	13	12	12	11	11	0	10
27	16	14	13	12	11	10	10	0	10
28	14	13	12	12	11	10	10	0	10
	16	15	13	11	0	0	0	0	80
30	15	13	11	0	0	0	0	0	160
31	15	14	12	11	0	0	0	0	80

Referencia. NG: *Neisseria gonorrhoeae*

Si bien en la literatura consultada existe un trabajo realizado por Mota-Meira y col. (2000) sobre CIMs de bacteriocinas, es importante resaltar que estos autores trabajaron con otros microorganismos productores de bacteriocinas distintos a lactobacilos. Por lo tanto, aunque los hallazgos de estos autores son comparables a los obtenidos en este estudio en cuanto a la inhibición por bacteriocinas sobre gonococos, es necesario destacar que ellos trabajaron con bacteriocinas diferentes y con un número muy restringido de gonococos.

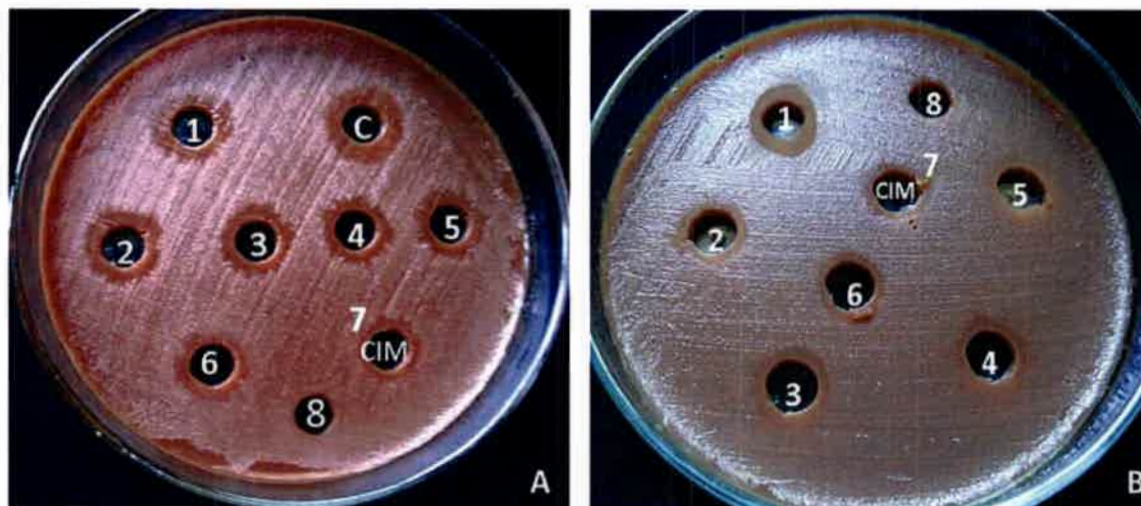


Figura 18. CIM de la bacteriocina L60 producida por *Lactobacillus rhamnosus* sobre cepas de *Neisseria gonorrhoeae* (A, B). Referencia: C: sobrenadante libre de células, 1: 640 UA/ml, 2: 320 UA/ml, 3: 160 UA/ml, 4: 80 UA/ml, 5: 40 UA/ml, 6: 20 UA/ml, 7: 10 UA/ml, 8: 5 UA/ml.

6. Estudio de interacción entre las bacteriocinas L23 y L60 sobre *Neisseria gonorrhoeae*

En el ensayo cualitativo de las interacciones entre las bacteriocinas mediante la técnica de difusión en pozos próximos se determinó un 100% de sinergismo sobre el desarrollo microbiano de todas las cepas de gonococos estudiadas. No se hallaron interacciones indiferentes ni antagónicas entre las bacteriocinas sobre las cepas de gonococos. En la figura 19 se observan el efecto sinérgico producido por la acción combinada de las bacteriocinas de L23 y L60 sobre el desarrollo microbiano de cepas de gonococo. Con respecto a las interacciones entre bacteriocinas y haciendo referencia al efecto sinérgico observado entre las mismas no pudieron ser discutidos con resultados de otros autores porque en la búsqueda bibliográfica realizada no fueron hallados.

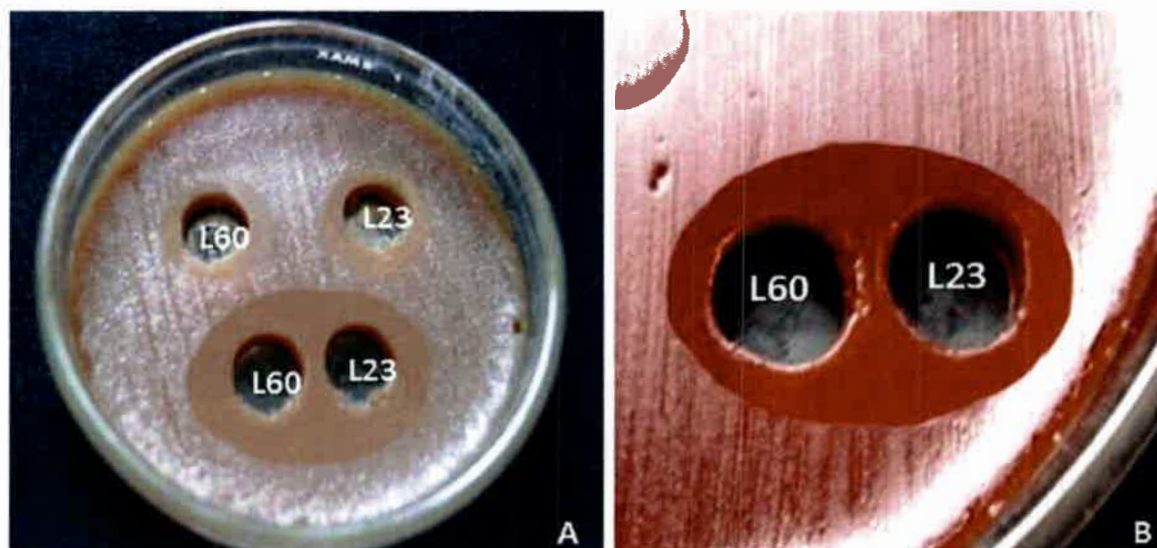


Figura 19. Interacción sinérgica entre las bacteriocinas L23 y L60 sobre el desarrollo microbiano diferentes cepas de *Neisseria gonorrhoeae* (A, B).

7. Actividad antimicrobiana de las cepas *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 y de las bacteriocinas L23 y L60 sobre *Streptococcus agalactiae*

Esta experiencia se realizó para determinar si los SGB aislados de las muestras clínicas eran inhibidos *in vitro* por los metabolitos producidos por *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60, respectivamente. En el ensayo de actividad antimicrobiana de ambos lactobacilos, mediante la técnica de estrías cruzadas se halló 100% de sensibilidad sobre las 57 cepas de SGB estudiadas. Los valores medios de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano para la cepa L23 fueron de 29,76 mm y de 30,47 mm para la cepa L60, diferencias que resultaron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (Figura 20 A y B). La tabla 10 muestra el tamaño de los halos promedios de inhibición del crecimiento bacteriano producidos por las cepas de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* sobre las cepas de estreptococos ensayadas. Estos hallazgos no coinciden con los resultados de Delucchi y col., (2008), quienes evaluaron la actividad inhibitoria de *L. plantarum* y *L. murinus* sobre un número menor de otros cocos Gram positivos, determinando tamaños de halos de inhibición del crecimiento bacteriano más bajos (21 y 15 mm, respectivamente) que los presentados en este trabajo sobre las cepas susceptibles. Cuando se evaluó específicamente, la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas L23 y L60 sobre las cepas de *S. agalactiae* se observó que del total de cepas de SGB ($n=57$), 52 cepas fueron inhibidas por las bacteriocinas L23 y L60. Siendo el porcentaje de sensibilidad del 91,23% de las mismas, sin mostrar diferencias estadísticas significativas entre ambas bacteriocinas.

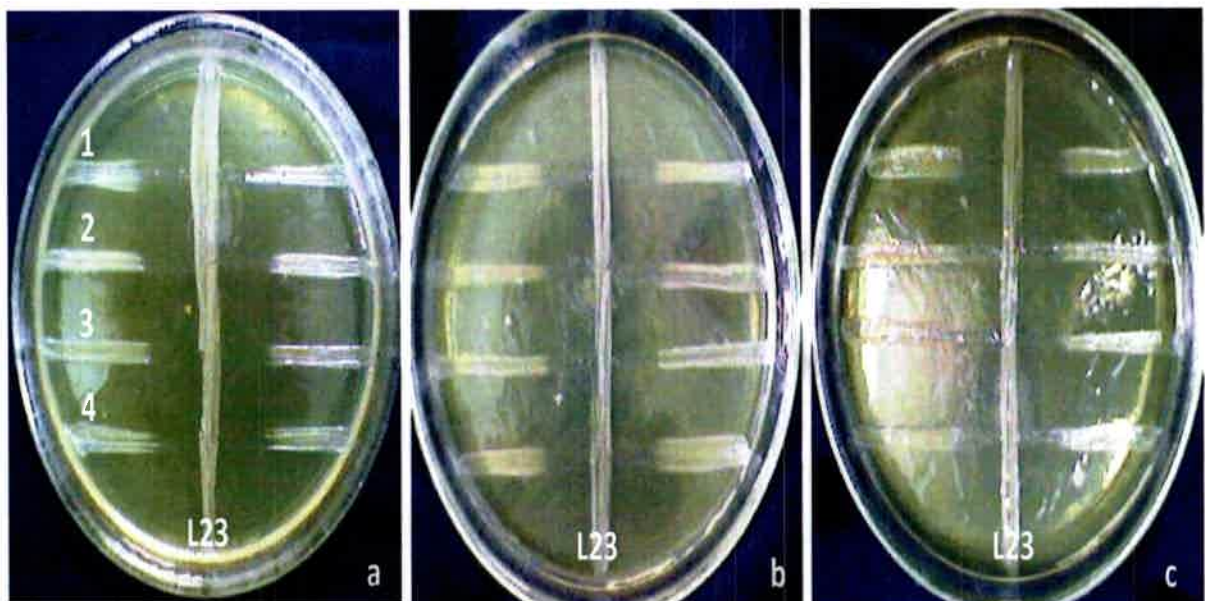


Figura 20 A. Actividad antimicrobiana producida por *Lactobacillus fermentum* L23 sobre diferentes cepas de *Streptococcus agalactiae* (a, b, c). Referencias. L23: *L. fermentum* L23, 1, 2, 3, 4: SGB

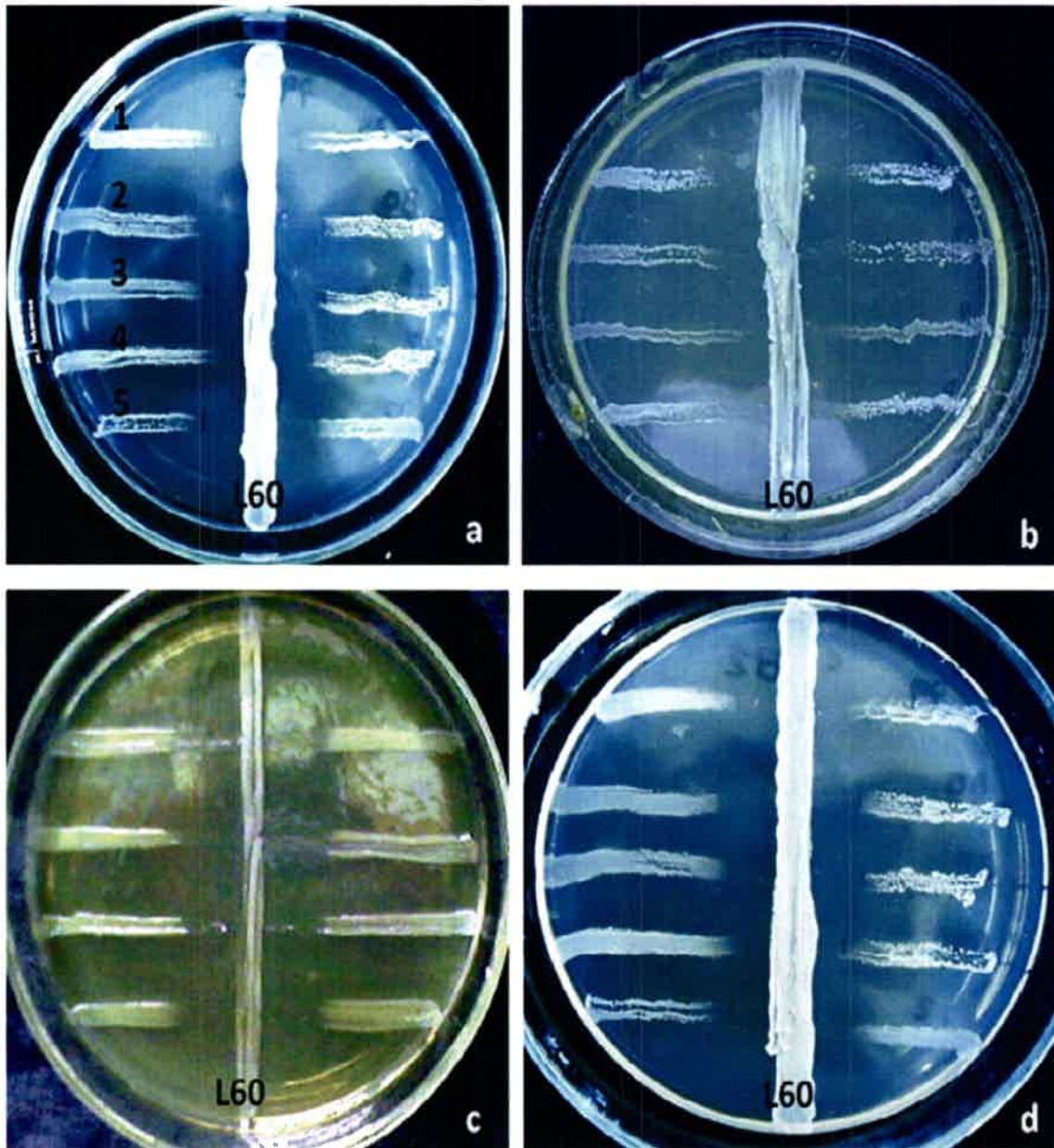


Figura 20 B. Actividad antimicrobiana producida por *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre *Streptococcus agalactiae* (a, b, c, d). Referencias. L60: estria central de la cepa *L. rhamnosus* L60, 1, 2, 3, 4, 5: SGB.

Estos resultados de sensibilidad a ambas bacteriocinas coinciden parcialmente con lo informado por Todorov y col., (2004), quienes probaron la actividad antimicrobiana de una bacteriocina producida por una cepa de *L. plantarum* y observaron un amplio rango de inhibición sobre cepas de enterococos. De igual modo, en otras investigaciones previas utilizando diferentes variantes de mutacina (A, B, C, D, I, K, L, M) y nisina (A y Z) se hallaron resultados semejantes sobre la inhibición del desarrollo microbiano de especies de estreptococos (Morency y col., 2001).

Tabla 10. Actividad antimicrobiana de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus rhamnosus* sobre *S. agalactiae*.

Cepas de <i>S. agalactiae</i>	Promedio y desvío estándar de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano en mm	
	<i>L. fermentum</i> L23	<i>L. rhamnosus</i> L60
1	36,33 ± 1,52	36,33 ± 0,57
2	34,33 ± 3,21	36,33 ± 0,80
3	40,00 ± 5,29	38,00 ± 2,00
4	31,00 ± 1,00	32,33 ± 0,57
5	32,00 ± 2,00	33,00 ± 1,00
6	33,33 ± 1,52	35,00 ± 1,73
7	33,33 ± 1,52	30,66 ± 2,08
8	26,33 ± 1,52	28,00 ± 1,00
9	27,00 ± 1,00	29,00 ± 1,00
10	38,33 ± 2,08	35,66 ± 1,15
11	33,33 ± 3,05	35,66 ± 2,51
12	28,33 ± 1,52	28,33 ± 2,51
13	29,00 ± 1,00	31,00 ± 1,00
14	27,00 ± 1,00	25,66 ± 0,57
15	28,00 ± 0,00	25,33 ± 1,52
16	31,00 ± 1,00	32,00 ± 1,73
17	27,00 ± 1,00	26,00 ± 1,00
18	31,33 ± 1,52	28,66 ± 0,57
19	26,33 ± 0,57	29,00 ± 1,00
20	25,33 ± 1,15	28,66 ± 0,57
21	38,00 ± 2,00	36,00 ± 0,00
22	34,30 ± 3,21	34,66 ± 1,52
23	27,33 ± 1,15	28,66 ± 0,57
24	33,30 ± 2,51	32,33 ± 3,05
25	28,33 ± 1,52	30,00 ± 0,00
26	30,30 ± 2,51	27,33 ± 1,15
27	31,60 ± 1,52	30,66 ± 0,57
28	32,30 ± 1,52	31,66 ± 1,52
29	28,30 ± 1,52	30,00 ± 0,00
30	30,60 ± 2,08	26,66 ± 1,15
31	28,00 ± 1,00	27,00 ± 1,00
32	27,33 ± 0,57	25,66 ± 1,15
33	28,30 ± 2,08	27,66 ± 2,08
34	27,00 ± 1,00	28,66 ± 1,15
35	27,60 ± 0,57	30,00 ± 0,00
36	27,33 ± 2,30	31,00 ± 1,00
37	29,00 ± 1,00	31,00 ± 1,00
38	27,33 ± 1,15	29,33 ± 0,57
39	30,00 ± 0,30	28,00 ± 2,00
40	27,60 ± 1,15	29,00 ± 0,00
41	27,10 ± 1,00	30,33 ± 0,57
42	29,33 ± 1,52	28,66 ± 3,05
43	27,66 ± 2,08	29,00 ± 1,00
44	28,00 ± 2,00	27,33 ± 1,52
45	28,00 ± 1,00	26,66 ± 1,15
46	27,00 ± 1,00	26,66 ± 0,57
47	28,00 ± 1,00	30,33 ± 0,57
48	25,33 ± 1,15	31,00 ± 1,00
49	27,30 ± 0,57	27,66 ± 1,52

(continuación Tabla 10)

50	27,66 ± 1,52	26,66 ± 2,08
51	32,30 ± 2,08	32,33 ± 3,05
52	30,30 ± 2,08	38,00 ± 2,00
53	29,33 ± 0,57	35,66 ± 2,51
54	31,00 ± 1,00	37,33 ± 1,15
55	30,33 ± 1,52	32,33 ± 2,51
56	28,00 ± 2,00	29,66 ± 1,52
57	27,00 ± 1,00	27,66 ± 1,15

Los halos de inhibición promedio del crecimiento bacteriano producido por la bacteriocina L23 sobre SGB fueron de 14,68 mm, mientras que con la bacteriocina L60, los halos promedios fueron de 15 mm (Figura 21). Estos resultados no coinciden con lo informado por Lima y col., (2007), quienes determinaron la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas de *L. reuteri*, *L. salivarius* y otras cepas de lactobacilos de origen animal, observando halos de inhibición del crecimiento bacteriano de menor tamaño sobre un número considerable de microorganismos, entre ellos, especies de cocos Gram positivos catalasa negativos. Estos tamaños de halos fueron semejantes a los obtenidos por Sutyak y col., (2008) quienes evaluaron la inhibición de subtilosina, una bacteriocina producida por *Bacillus amyloquefaciens*, sobre un bajo número de microorganismos, entre ellos una cepa de *S. agalactiae* y hallaron similar diámetro de inhibición. Sin embargo, los valores de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano obtenidos con las bacteriocinas L23, L60 difieren de los hallazgos de O'Connor y col., (2007). Estos autores estudiaron la actividad antimicrobiana de otras dos bacteriocinas, estafilococina C55 y lacticina 3147 sobre especies de estafilococos y enterococos, obteniendo zonas de inhibición en el rango de 5-10 mm con ambas sustancias, siendo significativamente menores a los halos mostrados en este trabajo. Por ello es de resaltar la importante antimicrobiana que poseen las bacteriocinas L23 y L60 de los lactobacilos en estudio sobre SGB.

Un 8,77% de los estreptococos del grupo B (correspondiente a 5 cepas), no fueron sensibles a las bacteriocinas. La resistencia encontrada a estas bacteriocinas coincide con lo informado por Morency y col., (2001) quienes determinaron que las mutacinas P, Q y X no inhibieron el desarrollo microbiano de especies de *Streptococcus*. Asimismo, Ocaña y col., (1999), evaluando la actividad antimicrobiana de una bacteriocina de *L. salivarius*, encontraron un elevado valor de resistencia sobre distintas especies, entre ellas dos cepas de *S. agalactiae*. Una de las hipótesis actuales para explicar la resistencia hallada en esas cepas de SGB, sería la síntesis de una peptidasa (C5A) producida por las cepas de *S. agalactiae*, que inactiva probablemente la acción de las bacteriocinas (dada su naturaleza proteica), sobre estos microorganismos (Franken y col., 2001, Brochet y col., 2006).

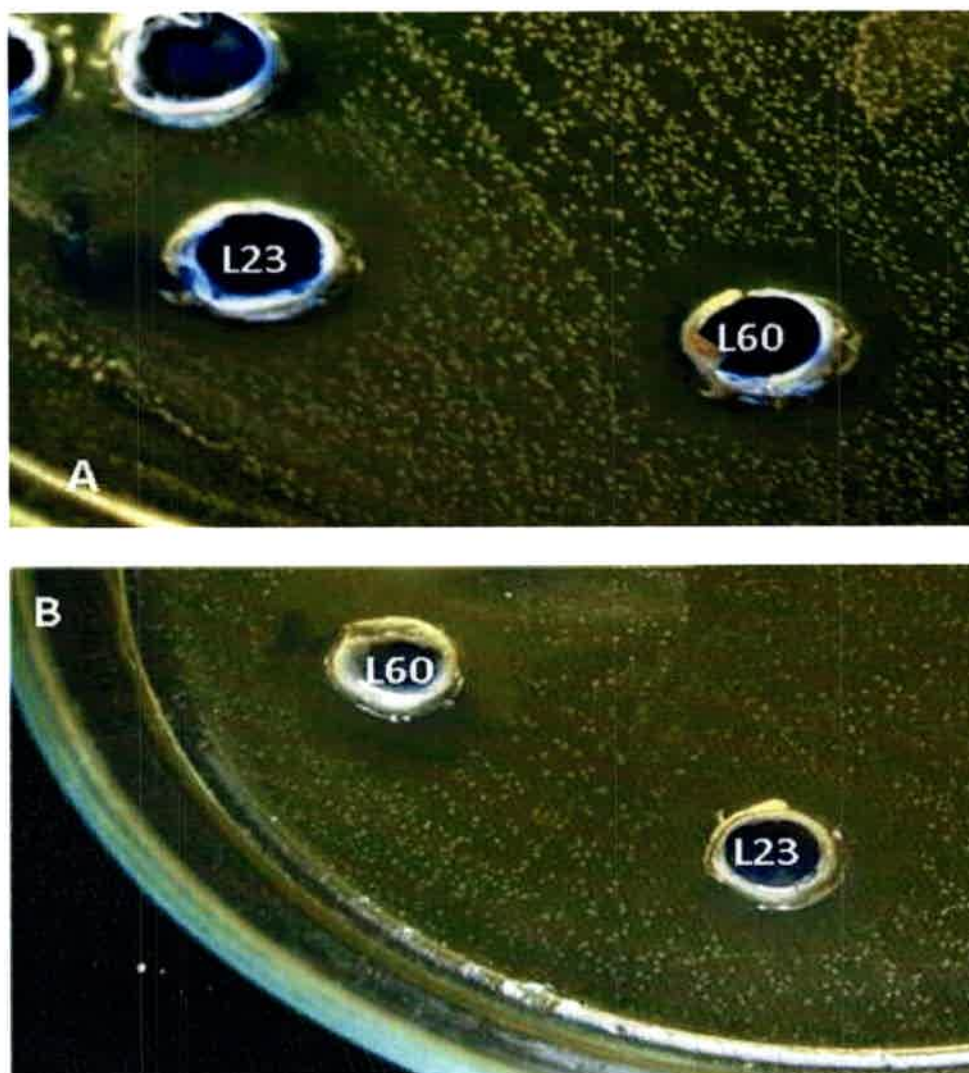


Figura 21. Efecto inhibitorio de las bacteriocinas L23, L60 sobre el desarrollo microbiano de cepas de *S. agalactiae* (A, B). Referencias. L23: bacteriocina L23 producida por *L. fermentum*, L60: bacteriocina L60 producida por *L. rhamnosus*.

8. Estudio de las interacciones entre las bacteriocinas L23 y L60 de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus rhamnosus* sobre *Streptococcus agalactiae*

8.1. Técnica de pozos próximos para la interacción de bacteriocinas

Para determinar las interacciones entre las bacteriocinas en estudio sobre el desarrollo microbiano de SGB se emplearon técnicas cualitativas y cuantitativas. La técnica de difusión en pozos próximos se realizó de igual modo que se describió previamente para gonococos. Mediante esta técnica cualitativa se halló 100% de sinergismo entre las bacteriocinas L23 y L60 inhibiendo el desarrollo microbiano de todas las cepas de *S. agalactiae* ensayadas. En la figura 22 se observa el efecto sinérgico producido por ambas bacteriocinas sobre cepas de SGB.

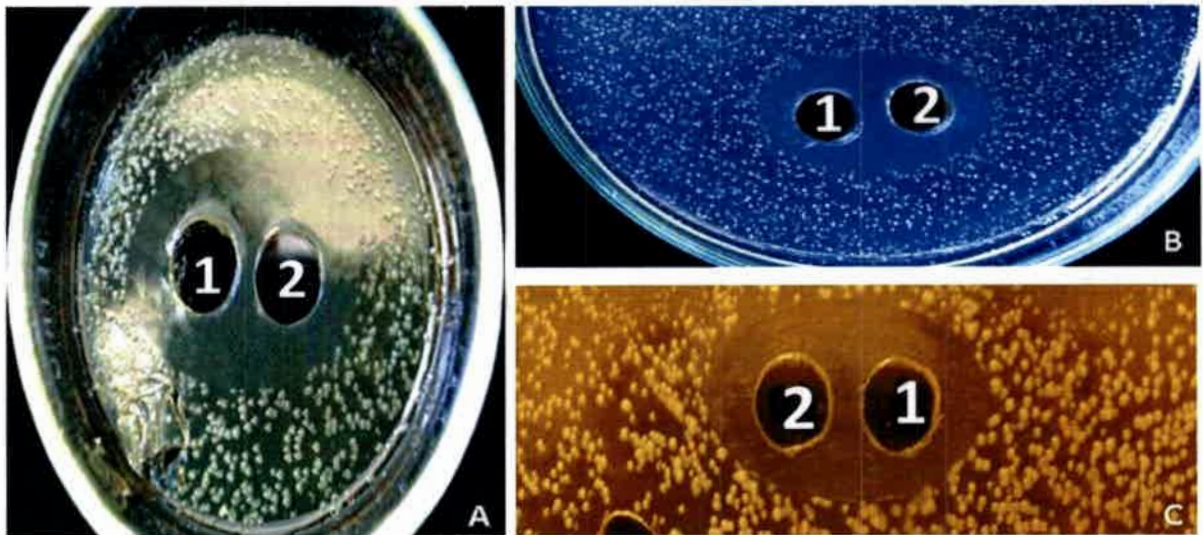


Figura 22. Efecto sinérgico entre las bacteriocinas L23 y L60 inhibiendo el desarrollo bacteriano de diferentes cepas de *Streptococcus agalactiae* (A, B, C). Referencias. 1: Bacteriocina L23 de *L. fermentum*, 2: Bacteriocina L60 de *L. rhamnosus*.

8.2. Técnica de interacción de bacteriocinas por pozo único

Al realizar la técnica cuantitativa de difusión en pozo en el agar, se encontró un 100% de sinergismo de potenciación entre las bacteriocinas sobre las 52 cepas sensibles de SGB. Los halos promedios de inhibición del crecimiento bacteriano de SGB producidos por la mezcla de bacteriocinas (18 mm) fueron mayores a los presentados por cada bacteriocina en forma independiente, mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (Figura 23). En concordancia al criterio empleado para definir la potenciación, todas las cepas sensibles mostraron un tamaño de halo de inhibición del crecimiento bacteriano con una diferencia ≥ 2 mm respecto a la sumatoria de los halos individuales producidos por las bacteriocinas L23 y L60 (Figura 23).

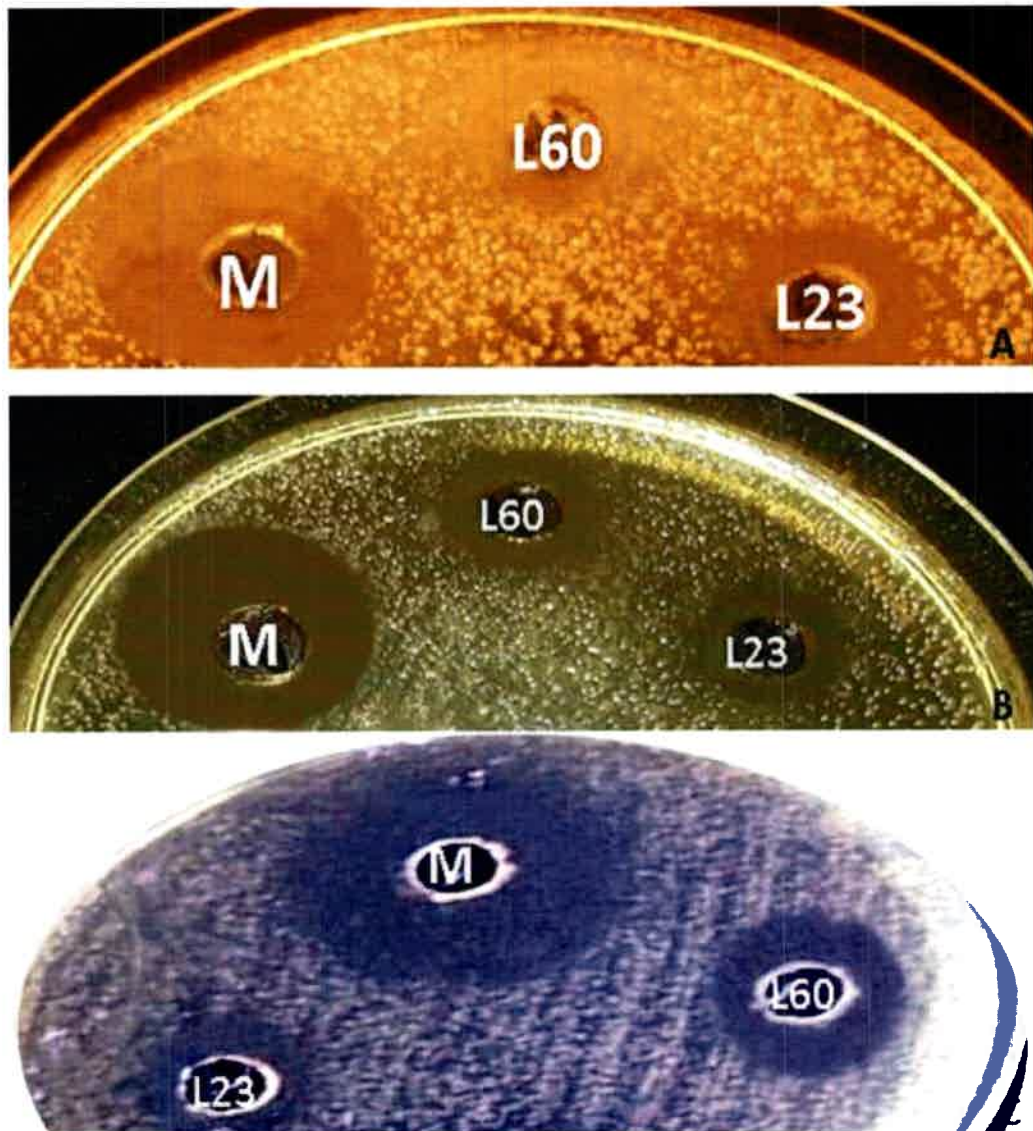


Figura 23. Inhibición del desarrollo microbiano de *Streptococcus agalactiae* producido por efecto del sinergismo de potenciación de las bacteriocinas L23 y L60 mediante la técnica de difusión en pozo único. Referencias. L23: bacteriocina L23 de *L. fermentum*, L60: bacteriocina L60 de *L. rhamnosus*, M: mezcla de bacteriocinas L23:L60 (1:1), A, B, C: diferentes cepas de *S. agalactiae*.

En la tabla 11 se presentan los tamaños de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano producidos por la mezcla de bacteriocinas, respecto a los halos de las bacteriocinas L23 y L60, definiendo el tipo de interacción encontrado.

Tabla 11. Valor promedio de los halos de inhibición del crecimiento de *Streptococcus agalactiae* por la acción de las bacteriocinas L23, L60 y de una mezcla de ambas.

Cepas de SGB	Halos de inhibición promedio en mm (media±SD)			Interacciones
	Bacteriocina L23	Bacteriocina L60	Mezcla de bacteriocinas (L23:L60)	
1	7,33±1,15	7,66±0,57	17,66±0,57	Sinergismo potenciación
2	7,00±0	7,33±0,57	18,33±1,15	Sinergismo potenciación
3	7,00±0	7,00±1,00	18,00±0	Sinergismo potenciación
4	6,66±0,57	6,33±0,57	16,66±0,57	Sinergismo potenciación
5	7,33±0,57	7,66±0,57	18,33±0,57	Sinergismo potenciación
6	7,33±0,57	6,33±0,57	17,66±0,57	Sinergismo potenciación
7	7,33±0,57	7,66±0,57	18,66±0,57	Sinergismo potenciación
8	8,00±0	8,33±0,57	18,33±0,57	Sinergismo potenciación
9	7,00±1,00	6,66±0,57	17,33±0,57	Sinergismo potenciación
10	7,00±0	7,66±0,57	17,66±0,57	Sinergismo potenciación
11	8,00±0	7,66±0,57	18,66±0,57	Sinergismo potenciación
12	7,00±0	7,33±0,57	17,66±0,57	Sinergismo potenciación
13	7,00±0	7,33±0,57	18,00±0	Sinergismo potenciación
14	8,00±0	8,66±0,57	20,66±0,57	Sinergismo potenciación
15	6,33±0,57	8,66±0,57	19,33±0,57	Sinergismo potenciación
16	6,66±0,57	7,00±1,00	18,33±0,57	Sinergismo potenciación
17	7,33±0,57	8,33±0,57	20,33±0,57	Sinergismo potenciación
18	7,00±0	7,33±0,57	18,33±0,57	Sinergismo potenciación
19	7,00±0	7,66±0,57	19,33±0,57	Sinergismo potenciación
20	8,00±0	7,33±0,57	21,00±0	Sinergismo potenciación
21	8,00±0	8,33±0,57	20,33±1,15	Sinergismo potenciación
22	8,00±0	6,66±0,57	19,66±0,57	Sinergismo potenciación
23	7,00±0	7,66±0,57	20,00±0	Sinergismo potenciación
24	7,66±0,57	6,33±0,57	18,66±0,57	Sinergismo potenciación
25	7,66±0,57	8,33±0,57	20,33±0,57	Sinergismo potenciación
26	6,33±0,57	7,66±0,57	19,00±0	Sinergismo potenciación
27	8,00±0	8,66±0,57	21,00±0	Sinergismo potenciación
28	7,00±0	7,33±0,57	18,66±0,57	Sinergismo potenciación
29	7,00±1,00	8,00±0	18,66±1,15	Sinergismo potenciación
30	7,66±0,57	6,66±0,57	19,33±2,08	Sinergismo potenciación
31	7,00±0	7,66±0,57	18,33±1,15	Sinergismo potenciación
32	8,00±0	8,33±0,57	20,00±1,00	Sinergismo potenciación
33	8,00±0	7,66±0,57	19,66±1,52	Sinergismo potenciación
34	7,00±0	6,66±0,57	18,33±0,57	Sinergismo potenciación
35	7,66±0,57	7,33±0,57	19,33±0,57	Sinergismo potenciación
36	8,00±0	8,33±0,57	18,33±0,57	Sinergismo potenciación
37	8,33±0,57	7,33±0,57	18,66±0,57	Sinergismo potenciación
38	6,33±0,57	7,00±0	17,33±0,57	Sinergismo potenciación
39	7,00±0	7,66±1,15	19,33±0,57	Sinergismo potenciación
40	7,00±0	7,66±0,57	17,66±0,57	Sinergismo potenciación
41	6,66±0,57	7,00±1,00	18,33±1,52	Sinergismo potenciación

(continuación Tabla 11)

Cepas de SGB	Halos de inhibición promedio en mm (media±SD)			Interacciones
	Bacteriocina L23	Bacteriocina L60	Mezcla de bacteriocinas (L23:L60)	
42	7,33±1,15	8,00±1,00	18,00±1,00	Sinergismo potenciación
43	7,33±0,57	7,66±0,57	19,66±0,57	Sinergismo potenciación
44	7,33±0,57	8,66±0,57	18,33±0,57	Sinergismo potenciación
45	8,00±1,00	8,33±0,57	19,00±1,00	Sinergismo potenciación
46	7,66±0,57	7,33±0,57	18,00±1,00	Sinergismo potenciación
47	8,00±0	9,00±1,00	20,33±0,57	Sinergismo potenciación
48	8,00±1,00	9,33±0,57	17,66±0,57	Sinergismo potenciación
49	7,66±0,57	8,00±1,00	18,66±0,57	Sinergismo potenciación
50	7,66±0,57	8,33±0,57	17,66±0,57	Sinergismo potenciación
51	7,66±0,57	7,33±0,57	18,66±0,57	Sinergismo potenciación
52	8,00±0	8,66±0,57	18,00±1,00	Sinergismo potenciación

En este ensayo no se encontraron otras interacciones entre las bacteriocinas, tales como: sinergismo aditivo, indiferencia ni antagonismo. Al realizar el análisis estadístico de los datos mediante la prueba de diferencias mínimas de Fisher (LSD de Fisher) se halló diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos individuales con las bacteriocinas L23 y L60 y la mezcla de bacteriocinas, sobre la inhibición del crecimiento bacteriano de *S. agalactiae* ($p < 0,05$). La figura 24 muestra los promedios de los halos de inhibición de las cepas sensibles de SGB ($n=52$) frente a las diferentes bacteriocinas individuales y a la mezcla de ambas, observándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Debido a la ausencia de bibliografía en el tema, estos resultados de sinergismo de potenciación entre bacteriocinas no pueden ser discutidos.

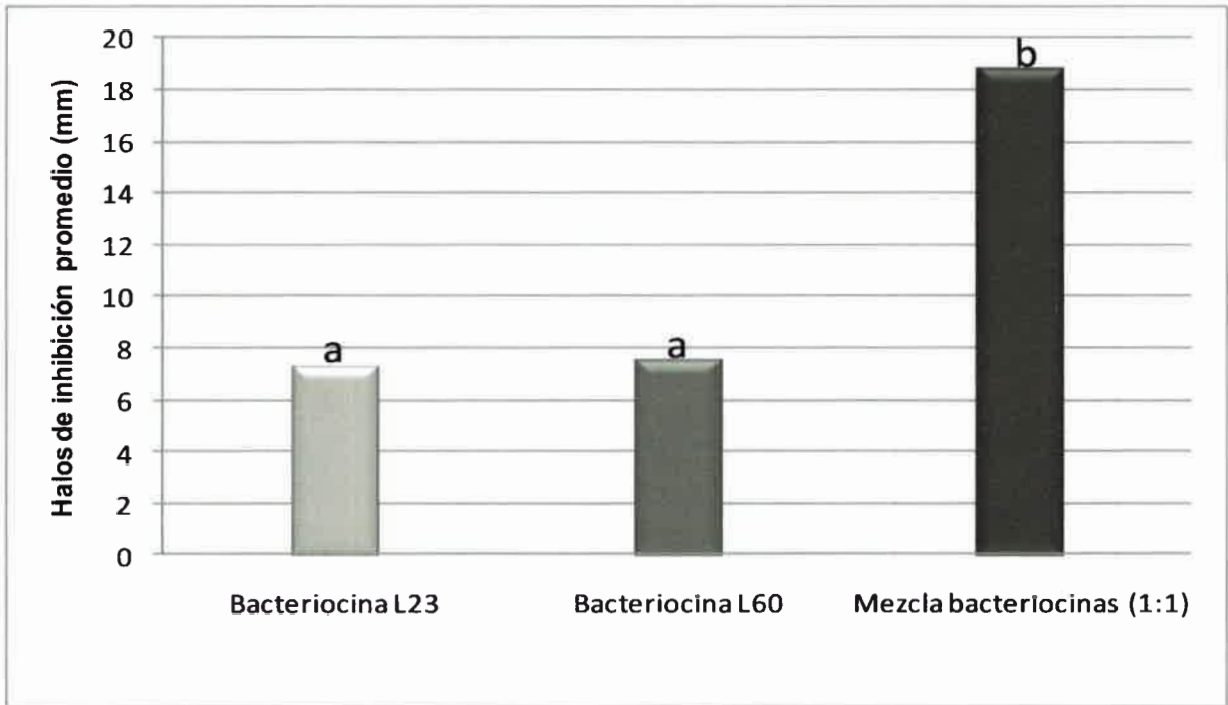


Figura 24. Actividad inhibitoria de las bacteriocinas L23, L60 y de una mezcla de ambas sobre el crecimiento de *Streptococcus agalactiae*. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$).

9. Concentración inhibitoria mínima (CIM) de las bacteriocinas L23 y L60 producidas por *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus rhamnosus* sobre *Streptococcus agalactiae*

Al evaluar la CIM de la bacteriocina L23 mediante la técnica de microdilución en placas sobre las 52 cepas sensibles de SGB, se determinó que en 21 de ellas (40,38%) la CIM fue de 80 UA/ml, mientras que para las 31 cepas restantes (59,62%) la CIM fue de 160 UA/ml. Para la bacteriocina L60 sobre 52 cepas de SGB, 34 cepas que representan el 65,38%, fueron inhibidas con una CIM de 160 UA/ml y para las otras 18 cepas (34,61%) la CIM fue de 320 UA/ml. En la figura 25 se muestran dos valores distintos de las CIMs de las bacteriocinas L23 y L60 sobre diferentes cepas de SGB. La figura 25 A muestra la máxima dilución de las bacteriocinas L23 y L60 que inhibieron el crecimiento microbiano de SGB en los pozos a3 y b3, cuya actividad fue de 160 UA/ml para ambos casos. En la figura 25 B se observa que la CIM para L23 es de 80 UA/ml (a4) y para L60 de 160 UA/ml (b3).

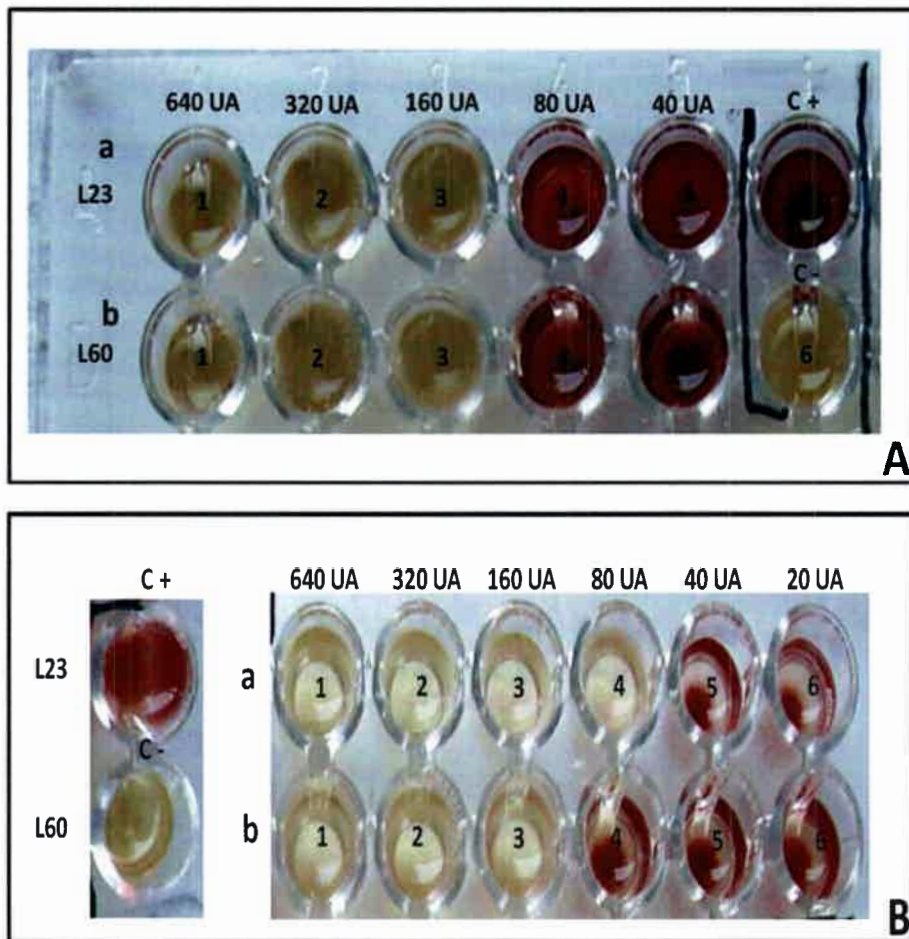


Figura 25. CIM de las bacteriocinas L23 y L60 sobre diferentes cepas de *Streptococcus agalactiae*.

Los valores de CIM de las bacteriocinas L23 y L60 sobre las cepas de SGB difieren de los hallados por Cleusix y col., (2007), quienes determinaron la CIM de otra bacteriocina producida por una cepa *L. reuteri*, reuterina y necesitaron elevadas concentraciones de dicha sustancia para impedir el desarrollo microbiano de un número reducido de especies del género enterococo y estreptococo. Contrariamente a lo observado con las bacteriocinas L23 y L60, en el trabajo de Fujita y col., (2007) quienes observaron que con la bacteriocina láctica Q, necesitaron altos valores de CIM para inhibir el desarrollo microbiano de cocos Gram positivos catalasa negativo.

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden parcialmente con los hallados por Mota-Meira y col., (2000, 2005) quienes determinaron la CIM de otra bacteriocina, mutacina B-Ny266, con el fin de comparar el efecto inhibitorio de esta sustancia con el obtenido con la nisina A y los antibióticos vancomicina y oxacilina, frente a diferentes microorganismos patógenos, entre ellos dos cepas de SGB. Estos autores obtuvieron un amplio espectro de actividad antimicrobiana de la bacteriocina mutacina B-Ny266 a bajos valores de CIM. De igual forma los bajos valores de CIM de las bacteriocinas L23 y L60 se correlacionan con los

hallados por Spinler y col., (2008), quienes observaron un elevado porcentaje de sensibilidad a reuterina, sintetizada por una cepa probiótica de *L. reuteri*, aún a bajas concentraciones sobre diversos patógenos entéricos.

10. Estudio de las interacciones entre las bacteriocinas L23 y L60 mediante la técnica del tablero de ajedrez

En este estudio la combinación de bacteriocinas presentó efecto sinérgico en un rango de valores de concentración inhibitoria fraccionaria (CIF) comprendido entre 0,131- 0,840 para las cepas estudiadas. Dicho valor se calculó con la concentración de cada bacteriocina (L23 o L60) expresada en UA/ml en la mezcla dividido por el valor de la CIM de esa sustancia en particular.

Dado que el valor obtenido estuvo por debajo de 1 y en concordancia a los criterios de otros autores (Nworu y Esimone, 2006, Adikwu y col, 2010) utilizando mezclas de antibióticos y metabolitos naturales sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y *E.coli*, la interacción entre las bacteriocinas L23 y L60 frente a las cepas de SGB fue considerada sinérgica. Mediante el empleo de esta técnica, con las bacteriocinas utilizadas en este trabajo no se detectaron interacciones tales como indiferencia, antagonismo ni adición. En la figura 26 se observa el resultado del estudio frente a una cepa de *S. agalactiae*. En la búsqueda bibliográfica no se encontraron trabajos donde se utilicen combinaciones de bacteriocinas de especies de lactobacilos, y menos aún evaluadas sobre cepas de *S. agalactiae* y *N. gonorrhoeae*, de esta manera no fue posible discutir estos resultados.

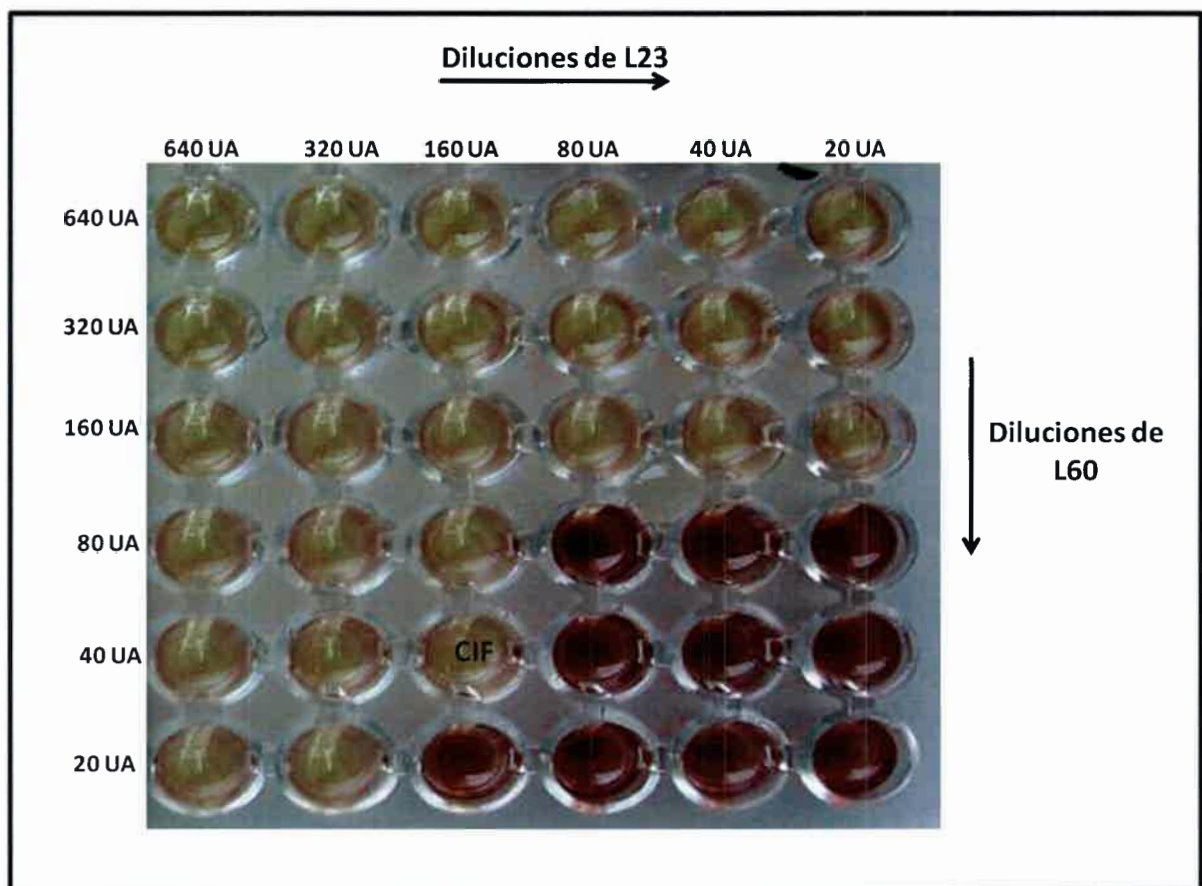


Figura 26. Concentración inhibitoria fraccionaria de la combinación de bacteriocinas sobre una cepa de *Streptococcus agalactiae*.

Estos resultados sobre el efecto sinérgico entre las bacteriocinas son muy alentadores porque al administrarlas en forma conjunta, proporcionan una potenciación de la actividad inhibitoria que las convierte en buenas competidoras para el desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas sin los efectos secundarios adversos que presentan los tratamientos convencionales.

11. Análisis de la secuencia del gen *ARNr 16S*

Los tamaños de los productos de PCR obtenidos con los primers para amplificar el gen del ARNr 16S fueron uniformes y de aproximadamente 1400 pb. Mediante el análisis del programa BLAST (disponible en la página web del NCBI) se procesaron las secuencias de las cepas seleccionadas de SGB y se determinó la pertenencia de las mismas al Dominio Bacteria, Phylum Firmicutes, Clase Bacilli, Orden Lactobacilales, Familia *Streptococcaceae*, Género *Streptococcus*, Especie *Streptococcus agalactiae*.

11.1. Análisis filogenético molecular

Los análisis filogenéticos se realizaron entre las secuencias de 2 cepas de *S. agalactiae* seleccionadas por ser las más sensibles a las bacteriocinas producidas por *L. fermentum* y *L. rhamnosus* y otras 22 secuencias nucleotídicas de los fragmentos 16S del ADNr de cepas de SGB provenientes de humanos, bovinos, equinos y peces disponibles en las bases de datos RDP y Genbank. Se utilizó este marcador molecular ya que constituye la herramienta más utilizada para el análisis taxonómico de bacterias.

El objetivo de este análisis fue conocer las relaciones filogenéticas en base a las similitudes o diferencias (consideradas como distancias evolutivas) de estos microorganismos susceptibles, en comparación con otras cepas de *S. agalactiae* y así, estimar la diversidad de las mismas con respecto a la relación microorganismo-huésped. Este análisis condujo a la construcción de dendrogramas o cladogramas, es decir a la representación esquemática de un árbol filogenético. Los mismos muestran de manera gráfica la magnitud relativa de las diferencias evolutivas entre varias especies que se cree que tuvieron una descendencia común, en este caso se realizó comparando la secuencia de un gen altamente conservado.

Los análisis heurísticos y de parsimonia de los datos combinados de los alineamientos de las 24 secuencias analizadas, correspondieron a 1561 caracteres totales, determinando 53 árboles parsimoniosos de 283 pasos de longitud (CI= 0,957; RI=0,952), basados en 167 caracteres informativos de parsimonia y excluyendo los caracteres no informativos (68 caracteres). Con estos datos se obtuvo un dendrograma que representó de manera más fidedigna, las distancias o relaciones entre los taxones. La figura 27 muestra uno de los 53 árboles más parsimoniosos generados a partir de los datos de las secuencias de SGB seleccionadas. Después del alineamiento de las secuencias del gen ADNr 16S, se observó que todas las cepas se dividieron en cuatro ramas a partir del nodo más cercano al grupo externo, representado por dos cepas de *Lactococcus lactis* (cv56 y NJODL1). Todas las cepas de SGB se alinearon muy próximas en una misma rama y a partir de la cual se distribuyeron en 4 pequeños *clusters*. Las cepas 20 y 14 de SGB seleccionadas en este informe, se posicionaron solas en un mismo *cluster* humano con un valor *bootstrap* de 64, indicando la probabilidad de que estas cepas humanas se encuentren efectivamente más relacionadas entre sí, que con el resto de las secuencias de igual origen (SGB NEM 316 seg 1 y 3; SGB CIP 82.45; SGB 2630 v/R; SGB ATCC13813, SGB 2630 v/R serotipo V; SGB A909).

Probablemente esta separación, sea debida a una mayor heterogeneidad en las otras secuencias humanas, ya que se observaron más cercanas a las cepas de origen bovino y equino, como se aprecia en 3 bloques de secuencias de origen humano-bovino y humano-equino, más arriba en el dendrograma ((SGB NEM316 seg1, SGB CIP82.45, SGB NEM316 seg3, SGB de bovino); (SGB 2630 v/R, SGB JCM5671) y (SGB 2603 v/R, SGB so304015, SGB ATCC13813).

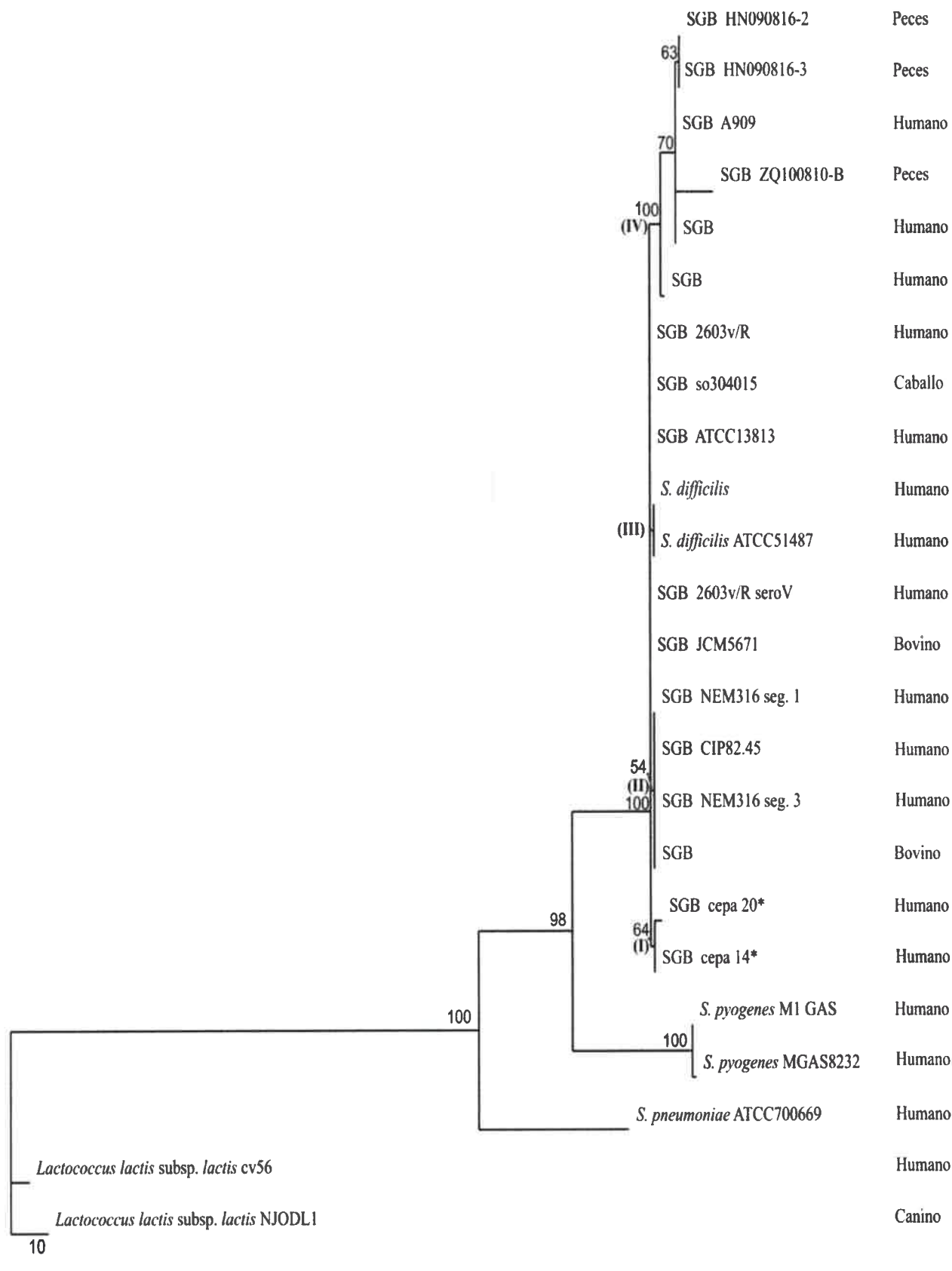


Figura 27. Dendrograma de las relaciones entre cepas de *Streptococcus agalactiae* sensibles a bacteriocinas y otras cepas de la Familia *Streptococcaceae* de diversos orígenes. Referencia: ___10, pasos evolutivos o distancias a recorrer en el dendrograma, los valores *bootstraps* se indican encima de cada línea, I, II, III, IV representan clusters dentro del grupo mayoritario SGB.

Estos resultados difieren con lo informado por Bisharat y col., (2004), quienes evaluando la diversidad genética de un grupo de cepas de SGB de origen humano y bovino mediante distintas técnicas moleculares, indicaron que las cepas humanas poseían una alta diversidad producto de la disparidad entre las secuencias y dado que un complejo de secuencias de SGB serotipo III, presentaron una estrecha relación con las secuencias de este *cluster* animal se asumió un ancestro bovino. En cambio en este trabajo si bien, se han analizado un número menor de secuencias, ambas cepas de SGB seleccionadas se agruparon separadamente de las cepas bovinas.

Con igual criterio, las cepas sensibles 20 y 14 de SGB humanas se mostraron aún más distantes de las cepas de SGB de peces (SGB HN090816-2, SGB HN090816-3, SGB ZQ100810-B) ubicadas en un *cluster* diferente donde se observa mayor relación con otras secuencias de *S. agalactiae* de origen humano (SGB A909). Los datos obtenidos con las cepas de este trabajo, no coinciden con los resultados de Evans y col., (2008), dado que en un análisis filogenético similar sobre secuencias de cepas de diversos orígenes tales como peces, delfines y humanos, determinaron que una subpoblación de cepas de SGB de estos animales podría causar infecciones en estos reservorios como así también en humanos, producto de las homologías presentes en las secuencias de peces con las cepas humanas y con el mismo patrón bioquímico. Si bien las secuencias de las cepas 20 y 14 fueron homólogas con la con el grupo *S. agalactiae*, se ubicaron muy distantes de las cepas de peces indicando probablemente escasa relación.

Las cepas sensibles de SGB aisladas de vagina humana (20 y 14) fueron homólogas pero distantes a las cepas de *S. difficilis/difficile* posicionadas dentro de este grupo mayoritario de *S. agalactiae*. Este resultado coincide parcialmente con lo hallado por Berridge y col., (2001), quienes demostraron la homología entre cepas de *S. difficile* y *S. agalactiae*, con un patrón bioquímico similar al presentado por los SGB serotipo Ib aislado de diferentes orígenes. Similarmente estos hallazgos son consistentes con los resultados recientes de Kawamura y col., (2005). Estos autores compararon cepas de *S. difficilis* productoras de meningoencefalitis en peces, con *S. agalactiae* y de igual modo, demostraron características fisiológicas, bioquímicas y genéticas indistinguibles con SGB. De esta manera, si bien las cepas de este trabajo se observaron en el mismo grupo con *S. difficile*, su ubicación en un *cluster* separado demuestra una menor homología interespecifica.

Este estudio permitió la correlación entre la identificación fenotípica realizada previamente por medio de pruebas bioquímicas y la amplificación y secuenciación del gen ADNr 16S, confirmando que estas cepas sensibles pertenecieron a la especie *S. agalactiae*. La similitud entre las secuencias de las cepas SGB 20 y 14 demostró la fuerte relación filogenética que poseen dado que se ubicaron en un *cluster* independiente humano en comparación a los otros miembros de la población de *S. agalactiae*.

12. Estudio de la actividad hemolítica de las diferentes sustancias activas de los SLCs de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus rhamnosus*

Este ensayo se realizó basándonos en las recomendaciones de organismos internacionales que para que una cepa sea considerada probiótica se debe demostrar que debe ser inocua para el nicho ecológico en el cual va a ser aplicada.

Por lo anteriormente expuesto se consideró importante estudiar la actividad hemolítica de los SLCs de estos lactobacilos. Para realizar el ensayo de actividad hemolítica se utilizaron las distintas sustancias contenidas en los SLCs de *L. fermentum* y *L. rhamnosus*. Previamente se informó la concentración máxima que presenta cada una de las bacteriocinas en el SLC, que correspondió a 640 UA/ml, concentraciones que se usaron para los ensayos de CIM y tablero de ajedrez. La actividad hemolítica de estos metabolitos se expresó en valores porcentuales de lisis sobre los glóbulos rojos de humano (GRH) y carnero (GRC). Para ello se realizó una curva de calibración de hemólisis total para cada especie de eritrocito y a partir de la cual se estimaron los porcentajes de hemólisis producidos por las sustancias con actividad biológica. En la tabla 12 se muestran las distintas absorbancias equivalentes a las hemolisis producidas por el agregado de diferentes diluciones de una solución de duodecil sulfato de sodio (SDS) a las suspensiones de glóbulos rojos humano y de carnero. Ya que el rango de absorbancias entre 1/2 a 1/16 no pudo ser leído con espectrofotómetro, debido a que los valores fueron superiores al valor máximo medido por el equipo, los primeros valores son tomados desde la dilución 1/32 del agente hemolítico (SDS).

Tabla 12. Valores de absorbancia para la realización de la curva de hemólisis total.

Diluciones de SDS	Hemólisis sobre GRH (A_{405})	Hemólisis sobre GRC (A_{405})
Sin diluir	ND	ND
1/2	ND	ND
1/4	ND	ND
1/8	ND	ND
1/16	ND	ND
1/32	2,028	1,601
1/64	1,173	0,908
1/128	0,536	0,451
1/256	0,281	0,245
1/512	0,132	0,126
1/1024	0,064	0,061
1/2048	0,029	0,031

Referencias. GRH: Glóbulos rojos humanos, GRC: Glóbulos rojos carnero, ND: No dosable ($A_{405} > 2$), SDS: Duodecil sulfato de sodio.

Para corroborar la linealidad entre las distintas concentraciones de SDS y la absorbancia de la hemólisis de los glóbulos rojos, se realizó una curva de regresión.

A continuación en la figura 28 se muestra la curva de regresión lineal obtenida con los resultados de hemólisis total de GRH.

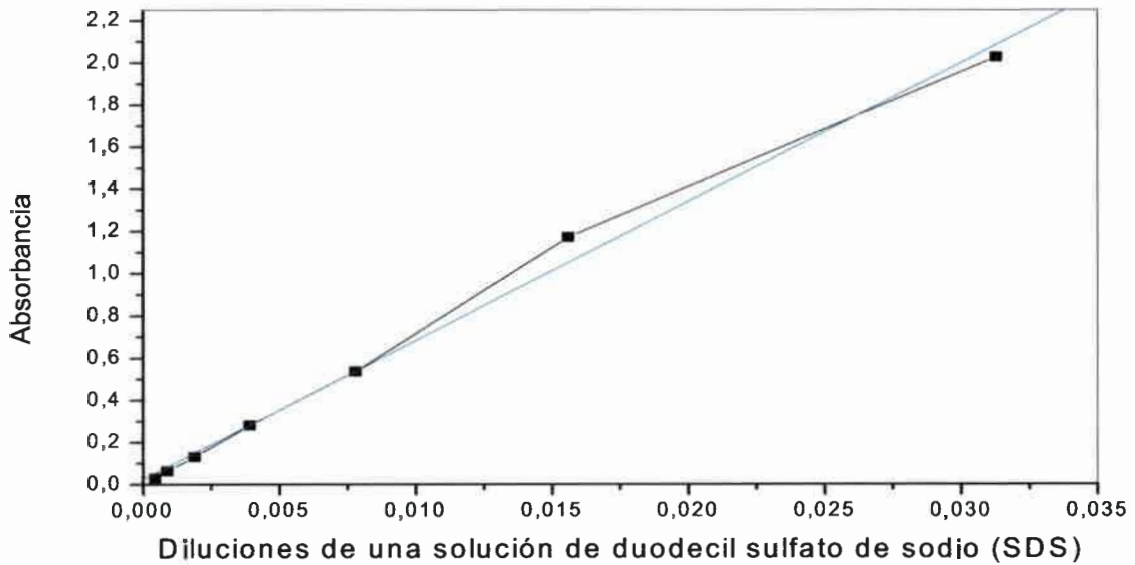


Figura 28. Curva de regresión lineal para los datos de hemólisis total de GRH.

Con estos datos se obtuvieron los parámetros y la ecuación lineal correspondiente para el cálculo de los porcentajes de hemólisis.

Regresión lineal: $Y = A + B (x)$

Parámetros	Valor	Error
A: intersección en Y	0,02408	0,03086
B: pendiente	65,87586	2,26092
R: regresión lineal	0,99707	
N: números de datos	7	
P: error de la prueba	<0,0001	
SD: desvío estándar	0,06222	

El ajuste de linealidad representado en la curva correspondió a $R = 0,99707$. Considerando un valor óptimo mayor a 0,70, se confirma la correlación que brinda la ecuación lineal entre absorbancia y concentración.

Para determinar el 100% de hemólisis en la suspensión de GRH sin diluir ($x=1$), se reemplazaron los valores de los parámetros A y B de la ecuación lineal ($Y = A + B(x)$).

$$Y = A + B (x)$$

$$Y = 0,024 + 65,87 (1)$$

$$Y = 65,9$$

Un valor Y de 65,9 fue considerado como el correspondiente a la hemólisis total, a partir del cual se realizaron los cálculos matemáticos para asignar el porcentaje de hemólisis producido por las distintas fracciones sobre los GRH.

Para obtener la ecuación y los parámetros correspondientes a la hemólisis sobre los GRC se siguió el procedimiento anteriormente descrito. En la figura 29 se muestra la regresión lineal obtenida para estimar el valor de hemólisis total de los eritrocitos de carnero.

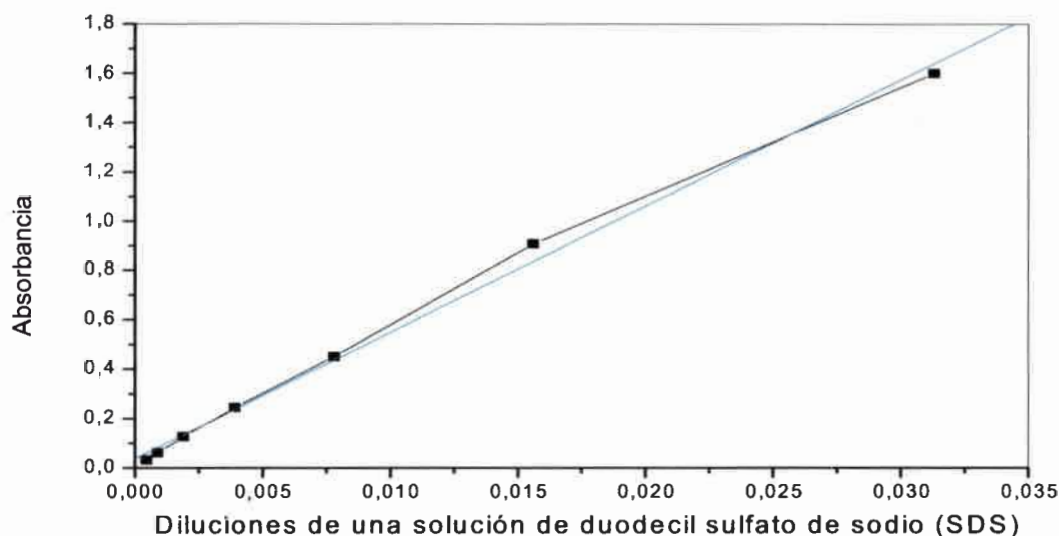


Figura 29. Curva de regresión lineal para los datos de hemólisis total de GRC.

Regresión lineal: $Y = A + B (x)$

Parámetros	Valor	Error
A: intersección en Y	0,03611	0,02032
B: pendiente	51,25631	1,48868
R: regresión lineal	0,9979	
N: números de datos	7	
P: error de la prueba	<0,0001	
SD: desvío estándar	0,04097	

El coeficiente de regresión lineal para GRC fue de 0,9979 lo cual indica una buena homogeneidad entre los resultados.

Utilizando la ecuación lineal se halló un valor de $Y = 51,29$ correspondiente al 100% de hemólisis de GRC.

$$Y = A + B (x)$$

$$Y = 0,036 + 51,25 (1)$$

$$Y = 51,29$$

Posteriormente, se realizaron los ensayos de hemólisis con los sobrenadantes libres de células sometidos a los distintos tratamientos sobre GRH y GRC. Los porcentajes de hemólisis encontrados para cada una de las fracciones se obtuvieron a partir de la transformación matemática de los valores de absorbancia correspondientes. En la tabla 13 se presentan los valores de hemólisis obtenidos con los distintas fracciones conteniendo las bacteriocinas L23 y L60 de *L. fermentum*, *L. rhamnosus* respectivamente y de una combinación de ellas, sobre los GRH y GRC. Además se informan los valores de los controles del blanco de reacción y de caldo Rogosa para demostrar que los valores hallados no se deben al medio de cultivo en ninguna de sus condiciones.

Tabla 13. Porcentaje de hemólisis de las distintas fracciones de los sobrenadantes libre de células tratados de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60.

SLCs de Lactobacilos	Eritrocitos humanos (GRH)		Eritrocitos de carnero (GRC)	
	Absorbancia (405nm)	Porcentaje de hemólisis (%)	Absorbancia (405nm)	Porcentaje de hemólisis (%)
SLC L23	0,197	0,30	0,123	0,24
SLCN L23	0,130	0,19	0,087	0,17
SLC L60	0,171	0,26	0,091	0,17
SLCN L60	0,161	0,24	0,083	0,16
SLCNP L60	0,133	0,20	0,050	0,09
SLC L23+L60	0,238	0,36	0,179	0,35
SLCN L23+L60	0,227	0,34	0,143	0,28
SLCNP L23+L60	0,220	0,33	0,069	0,13
CR (control)	0,039	0,06	0,025	0,05
CRAc (control)	0,059	0,09	0,036	0,07
PBS (control)	0,003	--	0,002	--

Referencias. sobrenadante libre de células (SLC); sobrenadante libre de células neutralizado (SLCN); sobrenadante libre de células neutralizado tratado con peroxidasa (SLCNP); caldo Rogosa (CR); caldo Rogosa acidificado (CRAc); valores de hemólisis < 0,05% (--).

Aplicando el análisis de la varianza (ANOVA) con los valores de hemólisis de los SLC L23 y L60 sobre GRH y GRC, se determinó que no existieron diferencias estadísticamente significativas en dicha actividad dentro de la misma especie de eritrocito ($p < 0,001$). Luego comparando los porcentajes de hemólisis de estas fracciones sobre ambos glóbulos rojos, para estimar si estos SLCs tuvieron especificidad hemolítica, no se hallaron diferencias significativas entre los datos ($p < 0,001$). A continuación las figuras 30 y 31 muestran la actividad hemolítica porcentual de las fracciones en GRH y GRC, respectivamente.

La actividad hemolítica hallada con la mezcla de los SLC de L23 y L60, si bien fue mayor que la hemólisis de las fracciones por separado para ambas especies, no mostró diferencias interespecíficas sobre los eritrocitos ensayados (Figura 30 y 31, columna 6).

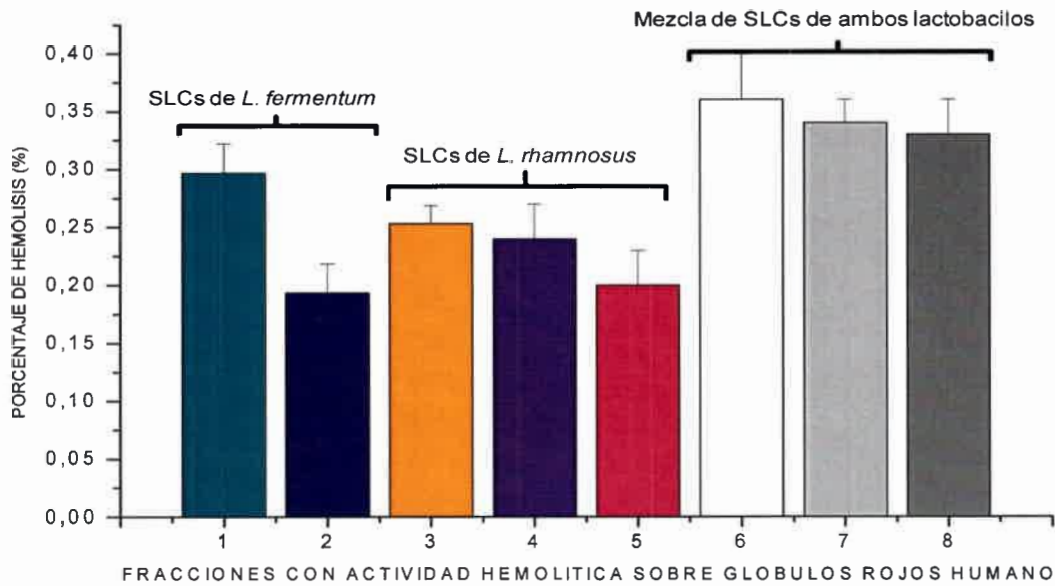


Figura 30. Porcentaje de actividad hemolítica de las distintas fracciones sobre GRH. Referencias. 1. SLC (sobrenadantes libre de células) L23; 2. SLCN (SLC neutralizado) L23; 3. SLC L60; 4. SLCN L60; 5. SLCNP (SLCN y tratado con peroxidasa) L60; 6. SLC L60+L23; 7. SLCN L60+L23; 8. SLCNP L60+SLCN L23.

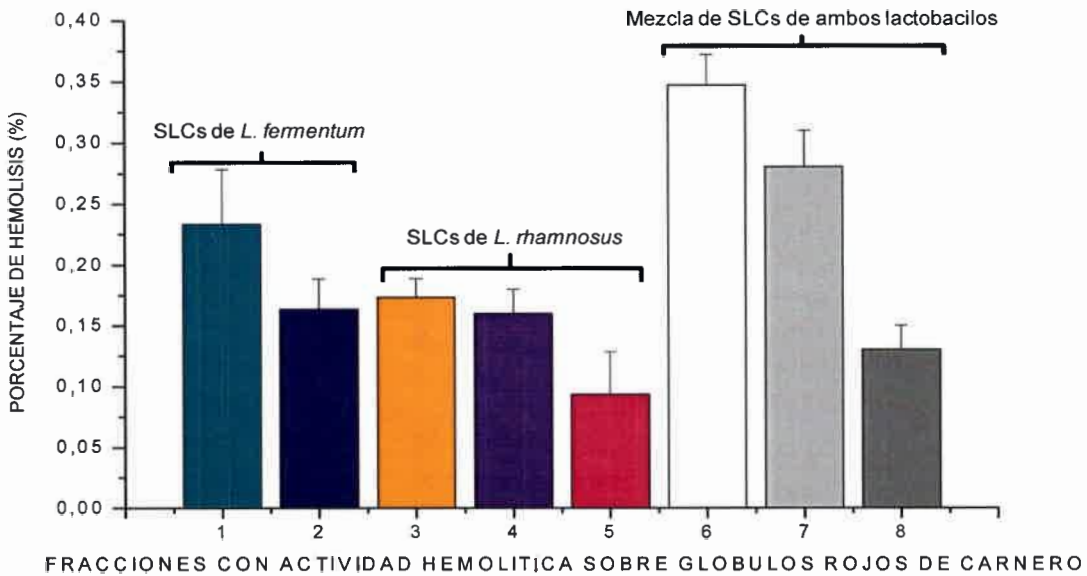


Figura 31. Porcentaje de actividad hemolítica de las distintas fracciones sobre GRC. Referencias. 1. SLC (sobrenadantes libre de células) L23; 2. SLCN (SLC neutralizado) L23; 3. SLC L60; 4. SLCN L60; 5. SLCNP (SLCN y tratado con peroxidasa) L60; 6. SLC L60+L23; 7. SLCN L60+L23; 8. SLCNP L60+SLCN L23.

Al evaluar la citotoxicidad de ambas bacteriocinas en los SLCN L23 y SLCNP L60 sobre los GRH se obtuvieron 0,19% y 0,20% de actividad hemolítica para la bacteriocinas L23 y L60, respectivamente (Figura 30, columnas 2 y 5). Dichos porcentajes no representaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$). Las mismas fracciones en los eritrocitos de carnero presentaron valores de hemólisis más pequeños que los observados sobre los GRH (Figura 31 columnas 2 y 5) con porcentajes de 0,17 y 0,09% de actividad hemolítica. Cuando se comparó el efecto hemolítico de la mezcla de bacteriocinas sobre eritrocitos humanos y de carnero se observó una diferencia porcentual superior sobre GRH (Figura 30 y 31, columna 8).

Observando los valores de hemólisis producidos por la mezcla de bacteriocinas (Figura 30, columna 8) y el efecto de la bacteriocina L23 y L60 independientemente (Figura 30, columnas 2 y 5) sobre GRH, se halló una actividad significativamente mayor en la mezcla ($p < 0,001$), mientras que en GRC no hubo diferencia estadística (Figura 31, columnas 2; 5 y 8). Sin embargo la diferencia encontrada en GRH no revestiría importancia considerando que el valor máximo de hemólisis encontrado no supera 0,36% en la mezcla.

El porcentaje de lisis de las diferentes fracciones de los SLCs sobre los GRC fue menor que el obtenido sobre GRH. Futuros estudios podrían aclarar si la diferencia en la sensibilidad de los GRC y GRH a las bacteriocinas, es debida a diferencias en la composición química de la membrana de los eritrocitos. Un ejemplo, lo constituye la β toxina producida por *Staphylococcus aureus*, que daña selectivamente la membrana celular de eritrocitos de carnero y en menor medida los eritrocitos humanos, ya que estos últimos poseen un 26% de esfingomiélinas en comparación al 55% hallado en los de glóbulos rojos de carnero. La diferencia en las susceptibilidades de los eritrocitos se podría justificar, basándonos en las interacciones entre las cargas netas de los lípidos de membrana de los mismos y la de estos polipéptidos antimicrobianos. En general, las bacteriocinas como ejemplos de polipéptidos antimicrobianos de origen bacteriano, son sustancias catiónicas y anfifílicas que pueden interaccionar con membranas ricas en fosfolípidos y con un potencial eléctrico de transmembrana negativo. Entonces, como los GRC poseen membranas con mayor porcentaje de fosfolípidos switeriónicos (carga neutra) que los GRH, se podría explicar el por qué de una menor hemólisis de ambas bacteriocinas sobre los eritrocitos de carnero (Tyler y col., 1995, Rocca y col., 1999, Reddy y col., 2004, Nissen-Meyer y col., 2009). Sin embargo otros tipos de estudios serían requeridos para demostrar esto. En las figuras 32 y 33 se estima el porcentaje correspondiente a las distintas sustancias con actividad antimicrobiana responsable de la hemólisis observada en los respectivos eritrocitos ensayados.

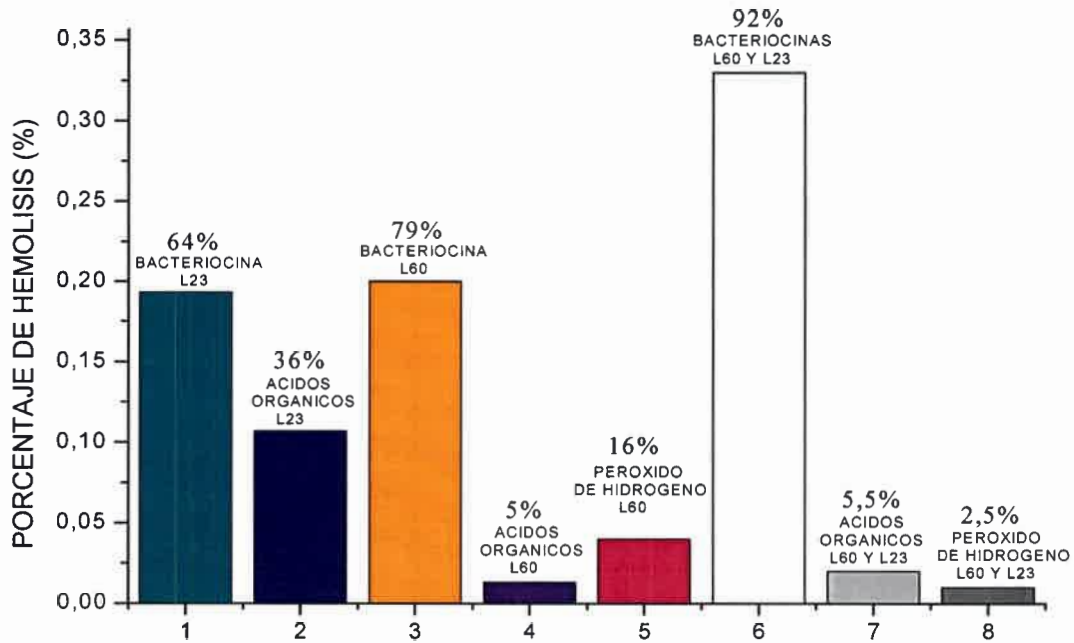


Figura 32. Porcentaje de actividad hemolítica de las bacteriocinas, ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno en GRH.

Comparando entre las diferentes fracciones con actividad antimicrobiana de L23 y L60 de forma independiente y en la mezcla, se demostró que las fracciones correspondientes a las bacteriocinas (Figura 32, columnas 1; 3 y 6 y Figura 33, columnas 1 y 3) fueron el principal metabolito responsable del mínimo efecto hemolítico encontrado en ambos tipos de eritrocitos. El mecanismo de acción de las bacteriocinas de bacterias Gram positivas basado en la formación de poros tipo tonel, podría explicar tal efecto. De este modo, estudios posteriores sobre el mecanismo molecular y químico de estas sustancias sobre las membranas eucariotas podrían dilucidar esta hipótesis.

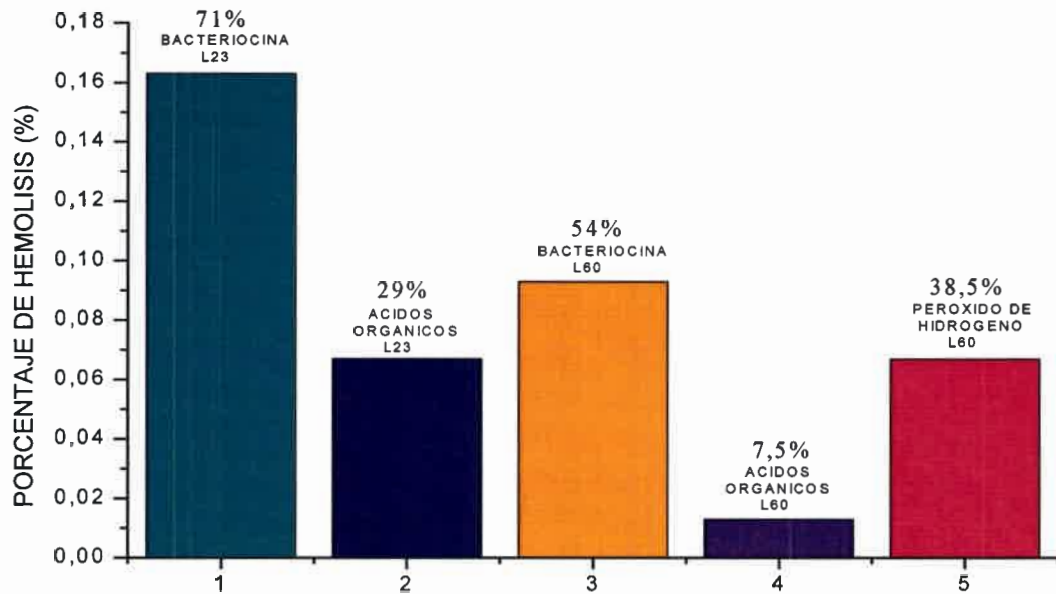


Figura 33. Porcentaje de actividad hemolítica de las bacteriocinas, ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno en GRC.

Es de destacar que los valores de hemólisis encontrados en todas las fracciones estudiadas sobre ambos tipos de eritrocitos son insignificantes, ya que en ninguno de los casos superó el 0,4% de actividad hemolítica. De hecho, también es importante señalar que los valores mínimos de hemólisis encontrados con las bacteriocinas L23, L60 y en la mezcla de ambas, representaron el efecto hemolítico de las máximas concentraciones de las bacteriocinas ensayadas (640 UA/ml). En consecuencia, menores concentraciones de estas sustancias, no tendrían efecto citotóxico sobre las membranas de estas células. Los resultados obtenidos con las bacteriocinas son similares a los determinados por Reddy y col., (2004) evaluando la actividad citotóxica de otra bacteriocina, nisina, sobre eritrocitos de carnero. Dichos autores encontraron que la nisina no produjo lisis a bajas concentraciones (5-320 µg/ml). Los valores de hemólisis mostrados con las bacteriocinas de esta tesis fueron significativamente menores a los porcentajes de actividad hemolítica informados por Dover y col., (2007), quienes utilizando otra bacteriocina, lactocina 160 sobre GRH observaron actividad hemolítica en un rango porcentual mayor (1,2-8,2%). De igual modo, la escasa hemólisis producida por las bacteriocinas L23 y L60 difiere de los resultados de Huang y col., (2009), quienes evaluando la actividad hemolítica de una variante de la bacteriocina subtilosina A, denominada subtilosina A1, encontraron hemólisis a bajas concentraciones de dicha sustancia. Estos hallazgos revisten notoriedad ya que no hay bibliografía previa que permita discutir estos resultados de actividad hemolítica de las distintas fracciones (SLC_S, SLCN y SLCNP) de cada uno de los lactobacilos y de la mezcla de ambos, con otras bacteriocinas producidas

específicamente por especies de *Lactobacillus* y dirigidas a evaluar la bioseguridad de su efecto vaginal, ya sea mediante la aplicación directa de las bacteriocinas o de los microorganismos productores. Asimismo, estos ensayos permitieron asignar un valor porcentual de lisis atribuible a cada metabolito antimicrobiano estudiado. La escasa actividad hemolítica de los metabolitos activos producidos por estos lactobacilos, junto al amplio espectro de actividad antimicrobiana y otras características esenciales para su selección como microorganismos probióticos, muestran la bioseguridad de estos lactobacilos para su potencial aplicación en humanos.

Ensayos *in vivo*

13. Microbiota vaginal de los animales de experimentación

Un total de 56 animales (n=56) divididos en grupos de 4 ratones hembras fueron utilizados por cada cepa de lactobacilo a ensayar en las distintas experiencias *in vivo*. Del análisis del desarrollo microbiano en placas con agar chocolate, Chapman y EMB se determinó por observación microscópica que los microorganismos presentaron una morfología de cocos Gram positivos, bacilos Gram negativos y bacilos bipolares con morfología típica de corineformes; con una frecuencia de recuperación del 49%, 42% y 9% respectivamente, sobre el total de ratones estudiados. La identificación por pruebas bioquímicas de los microorganismos encontrados mostró la siguiente frecuencia de aislamiento: 37% *Staphylococcus aureus*, 7% de otros estafilococos coagulasa negativos (SCN), 5% de *Enterococcus faecalis*, 38% *Proteus mirabilis*, 4% de otras enterobacterias distintas al género *Escherichia*. Los bacilos Gram positivos bipolares (9%) correspondieron al grupo corineforme. Durante los 4 días de estudio no se recuperaron microorganismos en placas de agar MRS, indicando la ausencia de especies de lactobacilos en la vagina de los ratones hembras BALB/c. De igual modo la identificación de los cocos Gram positivos, demostró la ausencia de *S. agalactiae* entre los miembros de la microbiota vaginal de estos ratones. Así, es de destacar que en estos lotes de animales estudiados, la ausencia en la biota vaginal de lactobacilos y SGB permitió validar el modelo animal de experimentación. Los microorganismos encontrados como miembros de la microbiota vaginal de los ratones BALB/c ensayados, coinciden parcialmente con lo obtenido por Garg, 2011 en un estudio reciente de la biota vaginal nativa de ratones con similar linaje donde encontró especies de estafilococos, enterococos y de *Proteus* spp. con una frecuencia de aislamiento particularmente elevada en las bacterias Gram negativas. Los resultados encontrados en este trabajo sobre la ausencia de lactobacilos y SGB nativos del modelo murino no coinciden con los estudios de Meysick y Garber, 1992 y Noguchi y col., 2003, quienes estudiaron la microbiota vaginal de ratones, ratas, hámster y otros animales y describieron una reducida presencia de lactobacilos y otras especies de estreptococos principalmente entre los roedores.

14. Colonización vaginal de las bacterias ácidos lácticas, *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 en ratones BALB/c

Las concentraciones iniciales (t0) respectivas de las cepas L23 y L60 para inocular vaginalmente en cada grupo de ratones, fueron de $2,51 \times 10^8$ UFC/ml y $2,45 \times 10^8$ UFC/ml respectivamente. A continuación, las tablas 14 y 15 mencionan los valores promedios de los recuentos de colonias y sus correspondientes valores de \log_{10} UFC/ml, los cuales se tomaron diariamente para cada una de las cepas, desde el primer día posinoculación con lactobacilo (t1) hasta 8 días después (t8). *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 inoculados

vía vaginal, colonizaron en cada grupo de animales con una única dosis. No se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) cuando se empleó el análisis estadístico de t-Student de dos vías sobre los valores de colonización de L23 y L60.

Tabla 14. Valores promedios de los recuentos de *Lactobacillus fermentum* L23 en la vagina de ratones BALB/c.

Tiempo (días)	<i>L. fermentum</i> (UFC/ml)	Log ₁₀ UFC/ml
0	$2,51 \times 10^8$	8,40
1	$1,41 \times 10^5$	5,15
2	$1,07 \times 10^5$	5,03
3	$6,30 \times 10^4$	4,80
4	$4,36 \times 10^4$	4,64
5	$8,32 \times 10^3$	3,92
6	$3,31 \times 10^3$	3,52
7	$1,44 \times 10^3$	3,16
8	$9,12 \times 10^2$	2,96

Tabla 15. Valores promedios de los recuentos de *Lactobacillus rhamnosus* L60 en la vagina de ratones BALB/c.

Tiempo (días)	<i>L. rhamnosus</i> (UFC/ml)	Log ₁₀ UFC/ml
0	$2,45 \times 10^8$	8,39
1	$1,96 \times 10^5$	5,29
2	$9,12 \times 10^4$	4,96
3	$4,46 \times 10^4$	4,65
4	$1,00 \times 10^4$	4,00
5	$4,46 \times 10^3$	3,65
6	$4,57 \times 10^2$	2,66
7	$3,38 \times 10^2$	2,53
8	$3,31 \times 10^2$	2,52

Las figuras 34 y 35 muestran la colonización vaginal de *L. fermentum* y *L. rhamnosus*. En las mismas se observa que ambos lactobacilos son capaces de permanecer y colonizar por 8 días la vagina de los ratones, tiempo en que se realizó la experiencia, con valores correspondientes a log₁₀ UFC/ml superiores a 2.

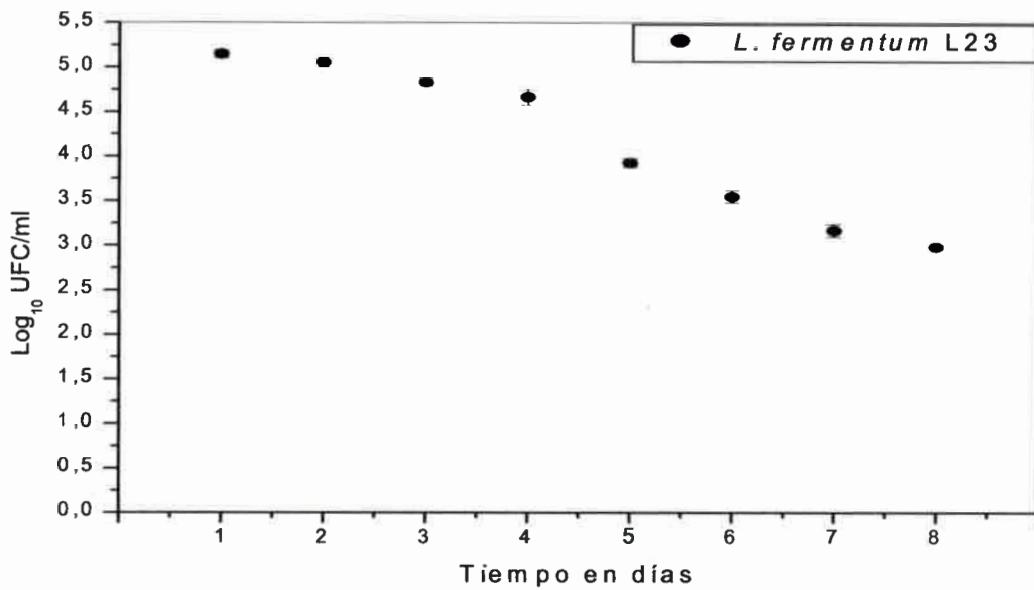


Figura 34. Colonización de la cepa *Lactobacillus fermentum* L23 en la vagina de ratones BALB/c.

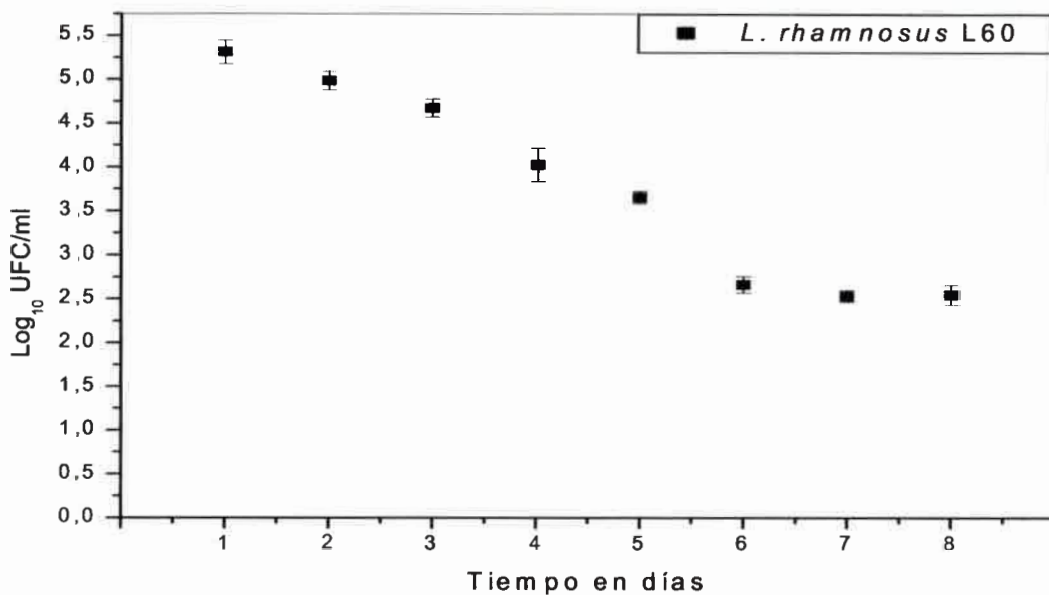


Figura 35. Colonización de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* L60 en la vagina de ratones BALB/c.

Los resultados sobre la colonización vaginal con ambas especies de lactobacilos fueron parcialmente similares a lo informado por Patton y col., 2003, quienes evaluaron la aplicación intravaginal de la especie *L. crispatus* CTV05 en otro modelo animal y obtuvieron un menor valor de colonización en el lote de animales estudiados con una única dosis a una concentración de lactobacilo de 10^8 UFC/ml. Es de destacar que en este trabajo de tesis, la administración de una sola dosis vaginal de lactobacilos fue suficiente para realizar los

ensayos de colonización en la que se observó que los lactobacilos se mantenían en la vagina de los ratones, a una concentración considerable (\log_{10} UFC/ml 2,96 y 2,52 respectivamente para L23 y L60 hasta el día 8 en que se realizó la última toma de muestra.

La efectividad de colonización demostrada con las cepas estudiadas en estos ratones también evidencia la versatilidad de estos bacilos ya que, en términos ecológicos, son lactobacilos exógenos compitiendo y permaneciendo en equilibrio con microorganismos autóctonos del nicho vaginal de ratones BALB/c.

14.1 Colonización vaginal de *Streptococcus agalactiae* en ratones BALB/c

La concentración inicial de la cepa de *S. agalactiae* a tiempo cero (t_0) determinada mediante recuento en placa fue de $5,37 \times 10^7$ UFC/ml. En la tabla 16 se detallan los recuentos consecutivos obtenidos desde t_1 a t_8 expresados en UFC/ml y sus valores equivalentes en logaritmos. *S. agalactiae* colonizó la vagina de los ratones con valores de logaritmo entre 5 y 2,08 de células viables/ml de secreción vaginal en el período en que se realizó el ensayo. Cuando se realizó la observación microscópica de frotis teñidos no se hallaron células tipo polimorfonucleares (PMN) indicadoras de respuesta inflamatoria. En el grupo control sin inocular no se encontraron en las placas de agar sangre de carnero al 5%, colonias aisladas de SGB que pudieran dar resultados erróneos. El recuento de SGB inoculado en la vagina de los ratones BALB/c se muestra en la figura 36

Tabla 16. Media de los recuentos de *Streptococcus agalactiae* y su expresión logarítmica en la vagina de ratones BALB/c.

Tiempo (días)	<i>S. agalactiae</i> (UFC/ml)	\log_{10} UFC/ml
0	$5,37 \times 10^7$	7,73
1	$1,41 \times 10^5$	5,15
2	$4,57 \times 10^4$	4,66
3	$4,26 \times 10^4$	4,63
4	$2,18 \times 10^4$	4,34
5	$3,84 \times 10^3$	3,58
6	$3,42 \times 10^2$	2,53
7	$1,25 \times 10^2$	2,09
8	$1,20 \times 10^2$	2,08

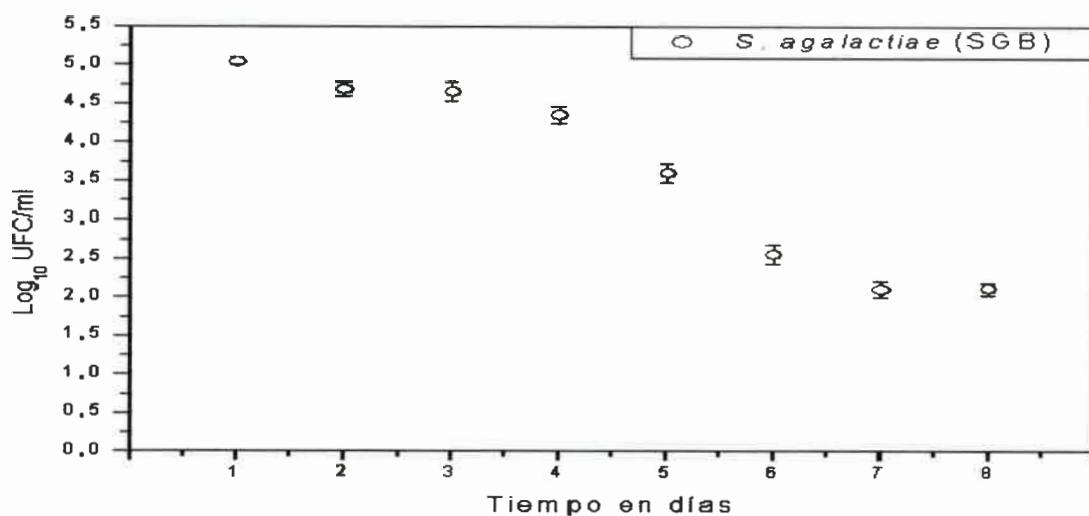


Figura 36. Colonización de la cepa *Streptococcus agalactiae* en la vagina de ratones BALB/c.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de colonización vaginal con SGB coinciden parcialmente con el estudio de Sheen y col., 2011, quienes desarrollaron una experiencia similar para determinar las estructuras bacterianas responsables de la colonización en un modelo murino y obtuvieron recuentos de SGB durante 8 a 12 días, aunque para ello, necesitaron una inoculación intraperitoneal previa de β -estradiol para asegurar la persistencia de la cepa humana de SGB en el modelo animal.

15. Efecto preventivo de *Lactobacillus fermentum* L23, *Lactobacillus rhamnosus* L60 y de una mezcla de L23+L60 sobre *Streptococcus agalactiae* en ratones hembras BALB/c

Al realizar la experiencia de efecto preventivo de cada uno de los lactobacilos se halló que la concentración a t0 de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 fue de $2,10 \times 10^8$ UFC/ml y $2,25 \times 10^8$ UFC/ml respectivamente. De igual modo la concentración inicial del SGB fue de $5,37 \times 10^7$ UFC/ml (Tabla 17, 18). Una única dosis de lactobacilo L23 y L60 fueron administrados vaginalmente en cada grupo de ratones. Al realizar la experiencia de efecto preventivo con *L. fermentum* L23, no se observó desarrollo de SGB en el t6, mostrando que L23 suprimió a SGB del tracto vaginal del modelo animal utilizado a las 96 h (Tabla 17), en comparación al grupo control de colonización de *S. agalactiae*, donde dicho microorganismo a igual tiempo, alcanzó un valor logarítmico superior a 2,5 (Tabla 16).

En la tabla 18 se observa que *L. rhamnosus* eliminó de la vagina de los ratones BALB/c a SGB en el t7 (120 h), demostrando el efecto preventivo de L60. Además es de destacar que la cepa L60 permaneció durante los 8 días en que se realizó el ensayo con un log₁₀ superior a 2 (Tabla 18). En la figura 38 se observan los resultados de esta experiencia.

Tabla 17. Promedio de los recuentos de *Lactobacillus fermentum* L23 y de *Streptococcus agalactiae* en la vagina de ratones BALB/c.

Tiempo (días)	<i>L. fermentum</i> (UFC/ml)	Log ₁₀ UFC/ml	<i>S. agalactiae</i> (UFC/ml)	Log ₁₀ UFC/ml
0	2,10x10 ⁸	8,32	-	-
1	1,07x10 ⁵	5,03	-	-
2	7,94x10 ⁴	4,90	5,37x10 ⁷	7,73
3	4,36x10 ⁴	4,64	1,62x10 ⁴	4,21
4	2,45x10 ⁴	4,39	1,15x10 ⁴	4,06
5	8,31x10 ³	3,92	2,14x10 ³	3,33
6	5,88x10 ³	3,77	No desarrollo	No desarrollo
7	9,12x10 ²	2,96	No desarrollo	No desarrollo
8	5,37x10 ²	2,73	No desarrollo	No desarrollo

Con respecto al ensayo con la cepa L23, esta permaneció en el nicho vaginal llegando al día 8 del ensayo con un log₁₀ de 2,7, valor superior al obtenido con L60 en la experiencia similar realizada con dicha cepa (Figura 37).

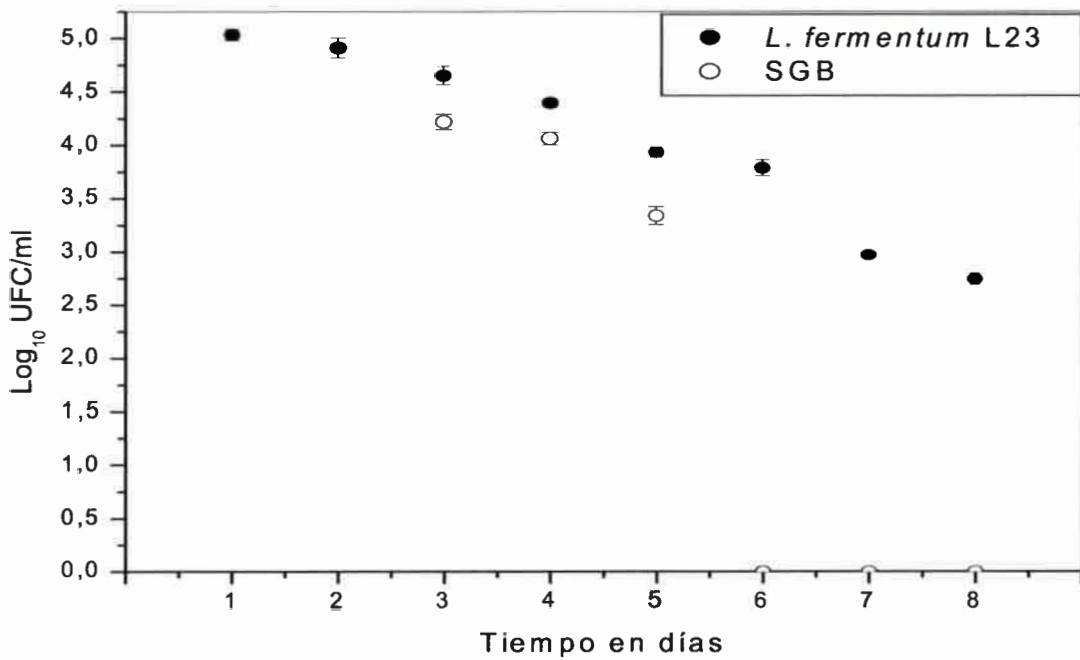


Figura 37. Efecto preventivo de *Lactobacillus fermentum* L23 sobre *Streptococcus agalactiae* en la vagina de ratones BALB/c.

Tabla 18. Recuentos promedios de *Lactobacillus rhamnosus* L60 y de *Streptococcus agalactiae* en la vagina de ratones BALB/c en la experiencia de prevención.

Tiempo (días)	<i>L. rhamnosus</i> (UFC/ml)	Log ₁₀ UFC/ml	<i>S. agalactiae</i> (UFC/ml)	Log ₁₀ UFC/ml
0	2,25 x10 ⁸	8,35	-	-
1	1,48x10 ⁵	5,17	-	-
2	2,13x10 ⁵	5,33	5,37x10 ⁷	7,73
3	1,00x10 ⁵	5,00	6,76x10 ⁴	4,83
4	6,76x10 ⁴	4,83	1,77x10 ⁴	4,25
5	3,90x10 ³	3,59	1,66x10 ³	3,22
6	3,80x10 ²	2,58	3,02x10 ¹	1,48
7	3,38x10 ²	2,53	No desarrollo	No desarrollo
8	3,16x10 ²	2,50	No desarrollo	No desarrollo

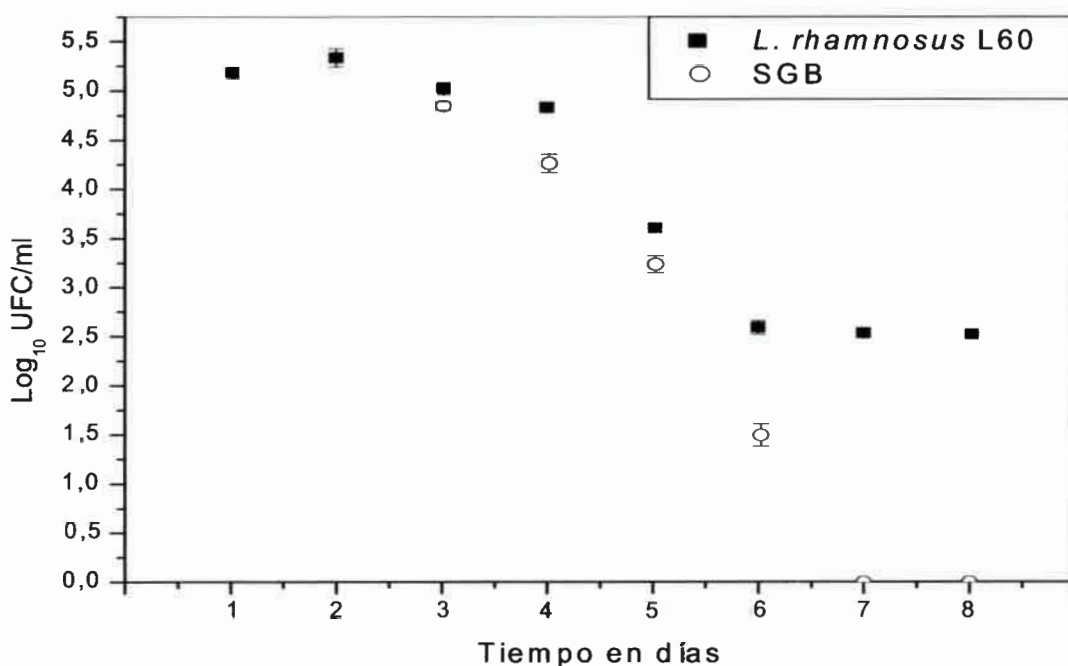


Figura 38. Efecto preventivo de *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre *Streptococcus agalactiae* en la vagina de ratones BALB/c.

Cuando el estudio de efecto preventivo se realizó con la mezcla de ambos lactobacilos (L23+L60), el recuento en el t0 fue de 2,55x10⁸ UFC/ml. En esta experiencia el recuento de SGB se realizó durante 2 días posinoculación, indicando que la mezcla de lactobacilos eliminó a SGB a las 72 h (t5) (Tabla 19).

Tabla 19. Valores promedios de los recuentos de la mezcla L23+L60 y *Streptococcus agalactiae* en vagina de ratones BALB/c en la experiencia de prevención.

Tiempo (días)	Mezcla de lactobacilos L23+L60 (UFC/ml)	Log ₁₀ UFC/ml	<i>S. agalactiae</i> (UFC/ml)	Log ₁₀ UFC/ml
0	2,55x10 ⁸	8,40	-	-
1	7,76x10 ⁵		-	-
2	2,75x10 ⁵	5,44	5,37x10 ⁷	7,73
3	1,00x10 ⁵	5,00	2,75x10 ⁴	4,44
4	2,57x10 ⁴	4,41	2,70x10 ³	3,43
5	1,95x10 ³	3,29	No desarrollo	No desarrollo
6	2,63x10 ²	2,42	No desarrollo	No desarrollo
7	1,77x10 ²	2,25	No desarrollo	No desarrollo
8	1,77x10 ²	2,25	No desarrollo	No desarrollo

Si comparamos con las experiencias con lactobacilos L23 y L60 en forma independiente, las cuales eliminaron a SGB en 96 h y 120 h respectivamente, se puede observar que el efecto preventivo obtenido con la mezcla de lactobacilos fue mejor ya que eliminó al SGB en 72 h (Figura 39). Estos hallazgos *in vivo* se correlacionan positivamente con los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* de interacción entre estos lactobacilos, donde se observó una potenciación del efecto antimicrobiano de estas cepas sobre el desarrollo de *S. agalactiae*.

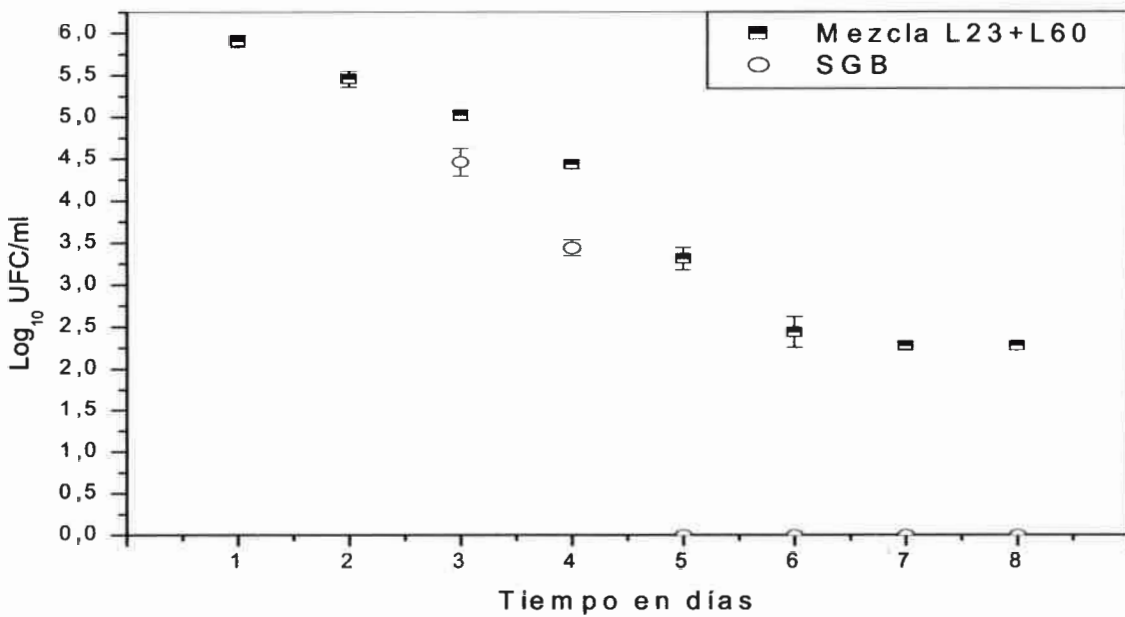


Figura 39. Efecto preventivo de la mezcla de lactobacilos L23+L60 sobre SGB en vagina de ratones BALB/c.

16. Efecto curativo de *Lactobacillus fermentum* L23, *Lactobacillus rhamnosus* L60 y de la mezcla de L23+L60 sobre *Streptococcus agalactiae* en vagina de ratones hembras BALB/c

La concentración de SGB inoculada al t0 en la vagina de los ratones fue de $5,37 \times 10^7$ UFC/ml. En los ensayos con cada cepa de lactobacilo y luego con la mezcla, se inoculó a SGB en la vagina de los ratones 48 h antes de la inoculación con los lactobacilos. La cepa L23 al t5 de la experiencia produjo un descenso de los recuentos de SGB (Tabla 20). A los 4 días de inoculación (t6) (96 h), la cepa *L. fermentum* L23 eliminó a la población de SGB de la vagina de ratones y permaneció con un \log_{10} UFC/ml de 2,90 al finalizar la experiencia. La figura 40 muestra la eliminación de los SGB por la administración vaginal de una suspensión de *L. fermentum* L23.

Tabla 20. Recuento de *Streptococcus agalactiae* y *Lactobacillus fermentum* L23 en la experiencia de efecto curativo.

Tiempo (días)	<i>S. agalactiae</i> (UFC/ml)	\log_{10} UFC/ml	<i>L. fermentum</i> (UFC/ml)	\log_{10} UFC/ml
0	$5,37 \times 10^7$	7,73	-	-
1	$2,63 \times 10^4$	4,42	-	-
2	$2,14 \times 10^4$	4,33	$2,15 \times 10^8$	8,33
3	$1,58 \times 10^4$	4,20	$3,80 \times 10^4$	4,58
4	$1,32 \times 10^4$	4,12	$2,45 \times 10^4$	4,38
5	$2,57 \times 10^3$	3,41	$1,55 \times 10^4$	4,19
6	No desarrollo	-	$4,26 \times 10^3$	3,63
7	No desarrollo	-	$2,04 \times 10^3$	3,31
8	No desarrollo	-	$7,94 \times 10^2$	2,90

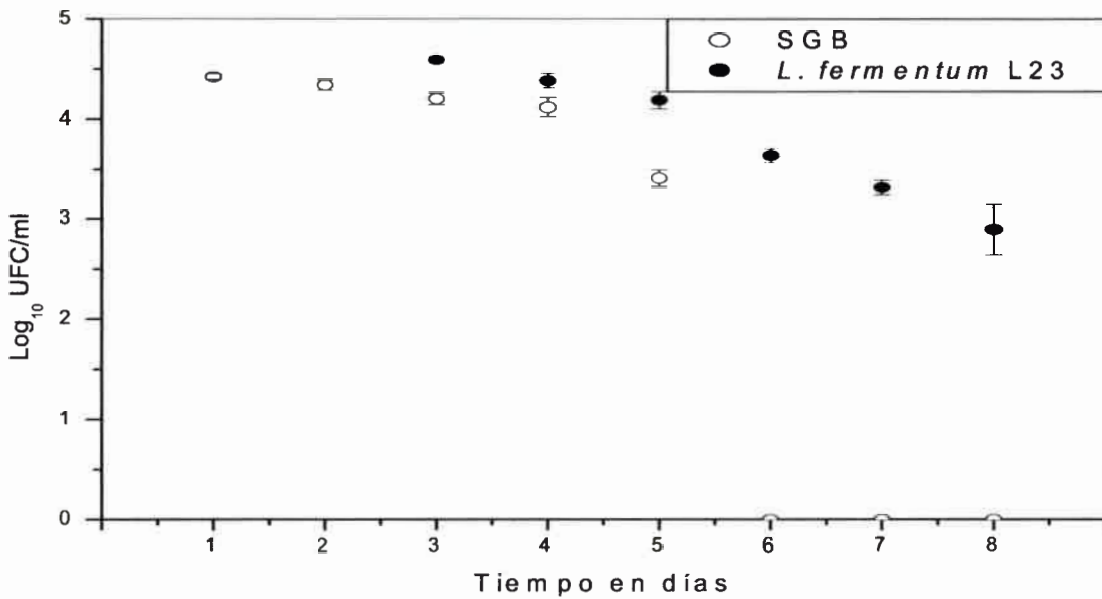
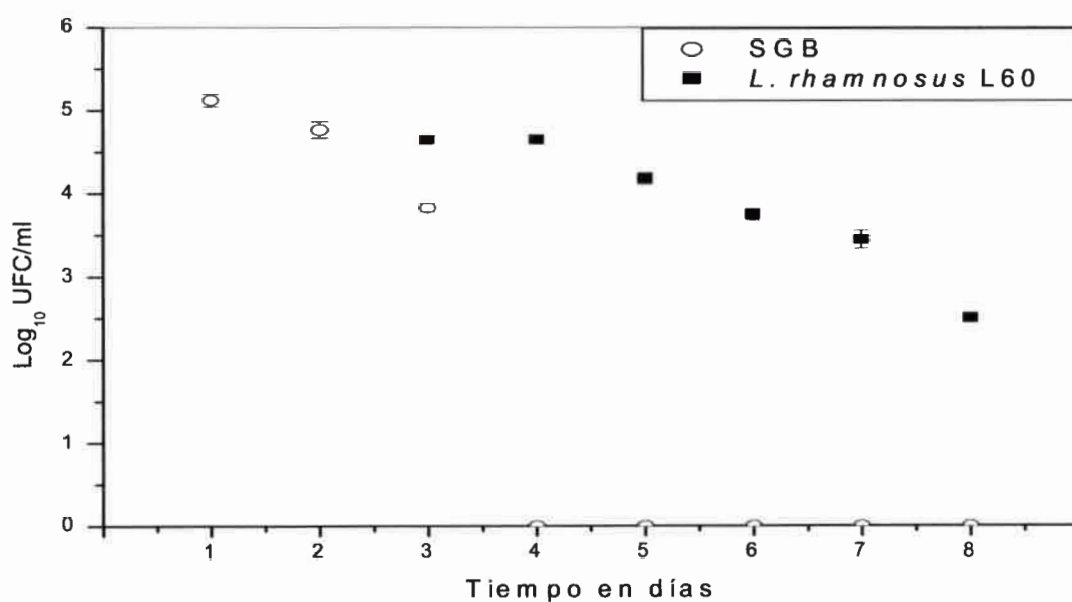


Figura 40. Efecto curativo de la cepa *Lactobacillus fermentum* L23 sobre *Streptococcus agalactiae* en el modelo animal.

A diferencia de lo hallado con la cepa L23, *L. rhamnosus* L60 eliminó a SGB 48 h después de su inoculación vaginal, correspondiendo al t4 de la experiencia. Este descenso en los recuentos de SGB producidos por la acción antimicrobiana de la cepa L60, fueron significativos cuando se compararon a los recuentos de SGB en el grupo control de colonización vaginal, donde al t4 corresponde un valor logarítmico mayor a 4. Asimismo, L60 permaneció hasta finalizar el ensayo con valores de logaritmo superiores a 2,5. Los recuentos promedios obtenidos diariamente para cada microorganismo se detallan en la tabla 21. La figura 41 muestra la remisión vaginal de SGB por acción de la cepa de *L. rhamnosus* L60.

Tabla 21. Valores promedios de la experiencia de efecto curativo de *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre *Streptococcus agalactiae*.

Tiempo (días)	<i>S. agalactiae</i> (UFC/ml)	Log ₁₀ UFC/ml	<i>L. rhamnosus</i> (UFC/ml)	Log ₁₀ UFC/ml
0	5,37x10 ⁷	7,73	-	-
1	1,29x10 ⁵	5,11	-	-
2	5,75x10 ⁴	4,76	2,35x10 ⁸	8,37
3	6,45x10 ³	3,81	4,26x10 ⁴	4,53
4	No desarrollo	-	4,47x10 ⁴	4,91
5	No desarrollo	-	1,51x10 ⁴	3,93
6	No desarrollo	-	5,37x10 ³	3,32
7	No desarrollo	-	2,70x10 ³	2,23
8	No desarrollo	-	3,16x10 ²	2,50

Figura 41. Efecto curativo de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre *Streptococcus agalactiae* en ratones hembras.

En el ensayo de efecto curativo con la mezcla L23+L60, *S. agalactiae* permaneció en la vagina de los ratones BALB/c durante dos días con valores log₁₀ UFC/ml 4,58 (t1) y 3,84 (t2). Al t3 la mezcla de lactobacilos con una concentración de 2,55x10⁸ UFC/ml eliminó a la población de SGB del nicho vaginal, 24 h posinoculación. Ambos lactobacilos permanecieron durante la experiencia llegando al t₈ con un log₁₀ UFC/ml de 3,10 (Tabla 22). Estos resultados fueron comparados con los ensayos donde se evaluó el efecto curativo

producido por cada cepa láctica en igual período de estudio, utilizando el análisis de la varianza (ANOVA).

Tabla 22. Valores promedios de los recuentos de *Streptococcus agalactiae* y mezcla de *Lactobacillus fermentum* L23 + *Lactobacillus rhamnosus* L60 (vol/vol) recuperados de vagina de ratones BALB/c.

Tiempo (días)	<i>S. agalactiae</i> (UFC/ml)	Log ₁₀ UFC/ml	Mezcla de L23+ L60 (UFC/ml)	Log ₁₀ UFC/ml
0	5,37x10 ⁷	7,73	-	-
1	3,77x10 ⁴	4,58	-	-
2	6,92x10 ³	3,84	2,55x10 ⁸	8,40
3	No desarrollo	-	3,23x10 ⁴	4,51
4	No desarrollo	-	5,88x10 ⁴	4,77
5	No desarrollo	-	4,22x10 ⁴	4,62
6	No desarrollo	-	6,02x10 ³	3,78
7	No desarrollo	-	3,31x10 ³	3,52
8	No desarrollo	-	1,26x10 ³	3,10

El efecto curativo de la mezcla de lactobacilos presentó diferencia estadísticamente significativa cuando fue comparado con los ensayos de las cepa *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 (p<0,01) de manera independiente. La mezcla L23+L60 eliminó más rápidamente a la población de estreptococos beta hemolíticos en comparación al efecto curativo visto con las cepas L23 y L60 de forma independiente (Figura 42).

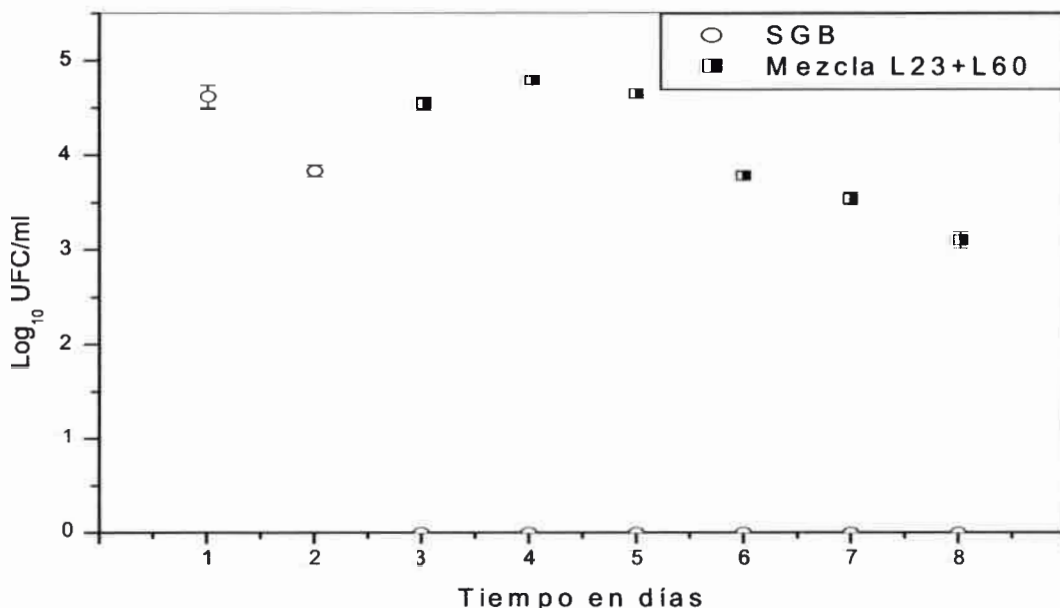


Figura 42. Efecto curativo de la mezcla de *Lactobacillus fermentum* L23 + *Lactobacillus rhamnosus* L60 (vol/vol) sobre *Streptococcus agalactiae* en vagina de ratones BALB/c.

Es importante señalar que en las experiencias de prevención y efecto curativo, ambas cepas de lactobacilos lograron desplazar a SGB de ese nicho ecológico con una única administración intravaginal de lactobacilos. Estos resultados coinciden parcialmente con los obtenidos por Fraga y col., 2005 en su experiencia de efecto preventivo donde emplearon una sola dosis de *L. murinus* a una concentración similar (10^8 UFC/ml) para eliminar a *P. mirabilis* de la vejiga de ratones. Sin embargo cuando estos autores evaluaron el efecto curativo de *L. murinus* en un grupo de ratones con infección urinaria, realizaron 4 inoculaciones con dicho lactobacilo logrando sólo disminuir el recuento del microorganismo patógeno, pero no la cura o remisión de la infección en el tracto urogenital murino. Por el contrario, en este trabajo de tesis el efecto curativo de cada una de las cepas probióticas y de la mezcla de ambas, lograron desplazar rápidamente a SGB de la vagina de los ratones BALB/c, requiriendo una única dosis de lactobacilos. En la bibliografía consultada no se hallaron estudios recientes que informen sobre la colonización vaginal de lactobacilos con potencial probiótico en ratones BALB/c, o evaluando los efectos preventivos y curativos de la aplicación intravaginal de estos microorganismos para resolver infecciones a *S. agalactiae*. De este modo, los resultados obtenidos en el presente trabajo no pudieron ser comparados con otros autores.

17. Ensayos de diferentes concentraciones de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre *Streptococcus agalactiae* en la vagina de ratones BALB/c

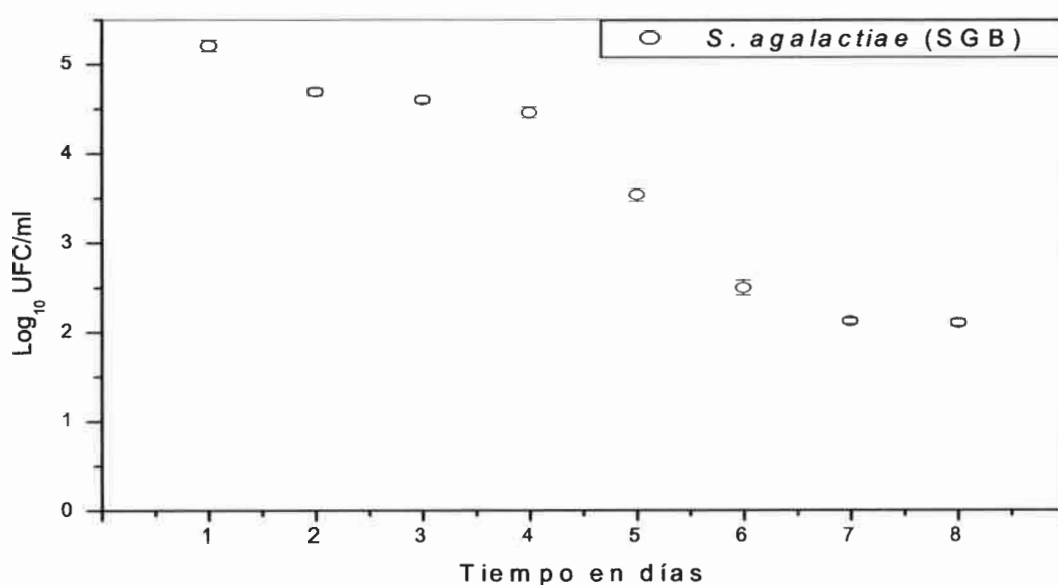
Esta experiencia se realizó siguiendo el modelo del efecto curativo de los lactobacilos durante 8 días. Se ensayaron 4 concentraciones diferentes de cada cepa de lactobacilos en distintos grupos de animales para evaluar el efecto curativo sobre SGB y se compararon con un grupo control. En el presente estudio primero se realizó la colonización de la cepa de SGB en el nicho vaginal murino y a las 48 h (t₂) se inocularon las cepas de lactobacilo L23 y L60 en cada grupo de ratones hembras en concentraciones del orden 10^9 , 10^8 , 10^6 y 10^4 UFC/ml, y se siguieron las observaciones diariamente hasta el día 8.

La concentración inicial (t₀) de SGB inoculada en la vagina de los ratones BALB/c del grupo control fue de $3,55 \times 10^7$ UFC/ml. En la tabla 23 se muestran los valores promedios de los recuentos de SGB expresados como UFC/ml y logaritmo decimal.

Tabla 23. Valores medios de la colonización de *Streptococcus agalactiae* en la vagina de ratones BALB/c.

Tiempo (días)	<i>S. agalactiae</i> UFC/ml	Log ₁₀ UFC/ml
0	3,55x10 ⁷	7,55
1	1,58x10 ⁵	5,20
2	4,78x10 ⁴	4,68
3	3,89x10 ⁴	4,59
4	2,82x10 ⁴	4,45
5	3,31x10 ³	3,52
6	3,02x10 ²	2,48
7	1,28x10 ²	2,11
8	1,23x10 ²	2,09

La cepa de *S. agalactiae* colonizó con valores logarítmicos entre 5,20 y 2,09 hasta terminado el ensayo (t8). La figura 43 muestra la colonización vaginal del SGB en el modelo animal.

Figura 43. Colonización de *Streptococcus agalactiae* en vagina de ratones BALB/c.

17.1. Ensayo de efecto curativo de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus rhamnosus* sobre *Streptococcus agalactiae* a una concentración inicial 10⁹ UFC/ml de cada cepa de lactobacilo

Al realizar la experiencia del efecto curativo de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 las concentraciones iniciales (t0) fueron de 2,34x10⁹ UFC/ml y 1,74x10⁹ UFC/ml respectivamente. Ambas cepas de lactobacilos lograron eliminar a *S. agalactiae* de la vagina de los ratones 48 h posteriores a su inoculación. A continuación en las tablas 24 y 25 se

presentan los recuentos y logaritmos de las poblaciones de SGB, *L. fermentum* y *L. rhamnosus* recuperados de los ratones BALB/c.

Tabla 24. Promedio de los recuentos de *Streptococcus agalactiae* y *Lactobacillus fermentum* L23 a una concentración de 10^9 UFC/ml en la vagina de ratones BALB/c.

Tiempo (días)	<i>S. agalactiae</i> UFC/ml	Log ₁₀ UFC/ml	<i>L. fermentum</i> UFC/ml	Log ₁₀ UFC/ml
0	$2,75 \times 10^7$	7,44		
1	$1,25 \times 10^5$	5,10		
2	$2,24 \times 10^4$	4,35	$2,34 \times 10^9$	9,37
3	$1,86 \times 10^4$	4,27	$3,38 \times 10^6$	6,53
4	No desarrollo	-----	$1,00 \times 10^6$	6,00
5	No desarrollo	-----	$2,75 \times 10^5$	5,44
6	No desarrollo	-----	$1,31 \times 10^5$	5,12
7	No desarrollo	-----	$4,26 \times 10^4$	4,63
8	No desarrollo	-----	$6,02 \times 10^3$	3,78

Tabla 25. Promedio de los recuentos de *Streptococcus agalactiae* y *Lactobacillus rhamnosus* L60 a una concentración de 10^9 UFC/ml en la vagina de ratones BALB/c.

Tiempo (días)	<i>S. agalactiae</i> UFC/ml	Log ₁₀ UFC/ml	<i>L. rhamnosus</i> UFC/ml	Log ₁₀ UFC/ml
0	$2,51 \times 10^7$	7,40		
1	$3,61 \times 10^4$	4,55		
2	$2,02 \times 10^4$	4,30	$1,74 \times 10^9$	9,24
3	$5,15 \times 10^2$	2,71	$4,57 \times 10^6$	6,66
4	No desarrollo	-----	$1,70 \times 10^6$	6,23
5	No desarrollo	-----	$2,34 \times 10^5$	5,37
6	No desarrollo	-----	$1,86 \times 10^4$	4,27
7	No desarrollo	-----	$1,38 \times 10^3$	3,14
8	No desarrollo	-----	$5,12 \times 10^2$	2,71

Al día 8 de la experiencia la cepa L23 alcanzó un valor de logaritmo de 3,78, superior al hallado con la cepa L60 que resultó ser de 2,71 en similar ensayo. En las figuras 44 y 45 se observan los efectos de ambas cepas de lactobacilos sobre la colonización del SGB en el nicho vaginal.

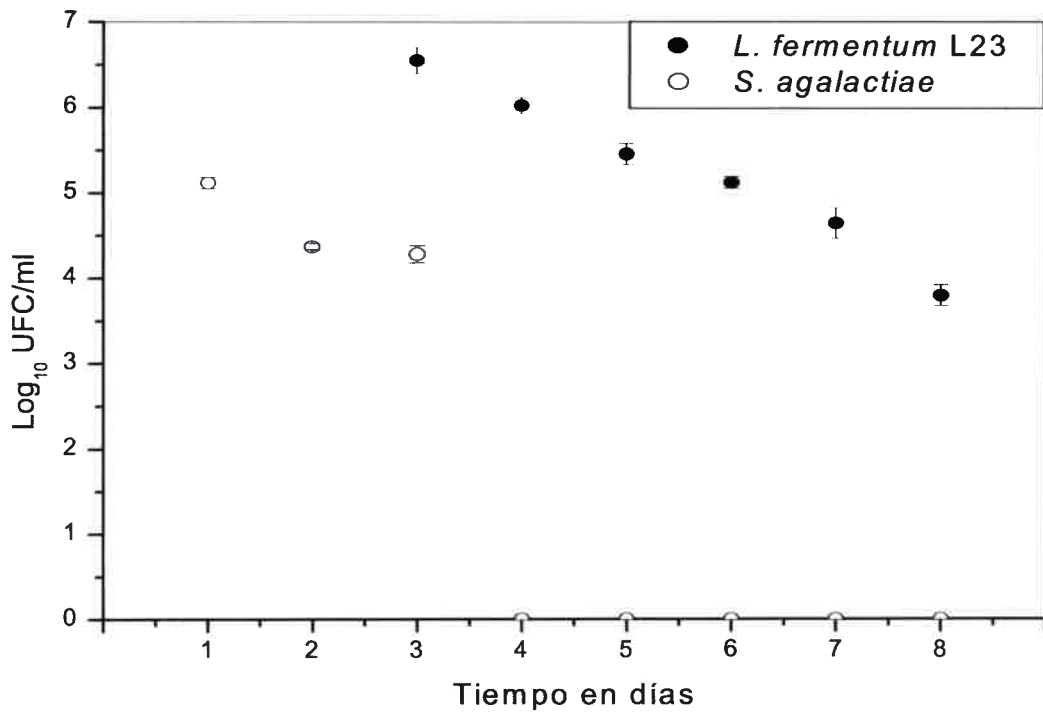


Figura 44. Efecto curativo de *Lactobacillus fermentum* con concentración inicial del orden 10^9 UFC/ml sobre la colonización de *Streptococcus agalactiae* en vagina de ratones BALB/c.

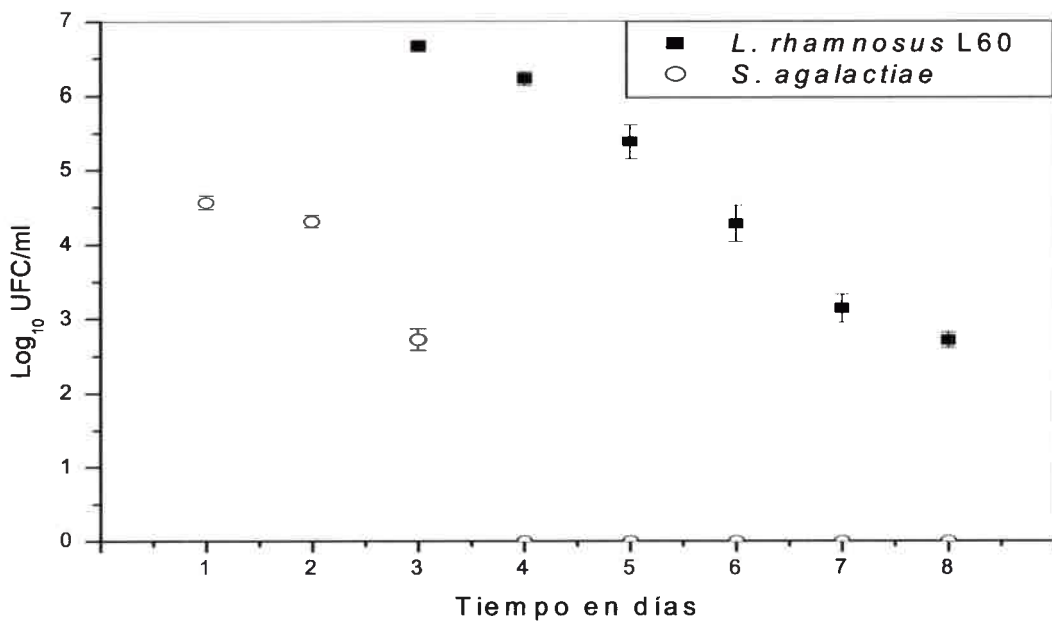


Figura 45. Efecto curativo de la administración vaginal de *Lactobacillus rhamnosus* en una concentración inicial del orden 10^9 UFC/ml sobre la colonización de *Streptococcus agalactiae* en ratones BALB/c.

Se puede apreciar que con la inoculación a t2 de las cepas L23 a una concentración del orden de 10^9 UFC/ml, al día 3 del ensayo no se produjo una reducción importante en el número de SGB, como ocurrió con la cepa L60 en otro grupo de ratones, donde hubo una disminución de 1,88 en el logaritmo de los estreptococos, en comparación a los valores de recuentos de SGB del grupo control en igual tiempo de la experiencia. Al 4^{to} día de ambos ensayos, las cepas L23 y L60, lograron la eliminación de SGB en la vagina de los ratones, comparado al valor de recuento en el grupo control. Dado que los lactobacilos fueron inoculados en la vagina de ratones BALB/c 48 h posteriores a la inoculación de SGB es importante destacar que en sólo 2 días de haber sido inoculados L23 y L60 desplazaron completamente a los estreptococos de la vagina del modelo animal, con valores logarítmicos que oscilaron entre 6,00 para el t4 a 3,78 para el día 8 (t8) con L23 y de 6,23 a 2,71 en el caso de L60. Estos resultados obtenidos a la concentración 10^9 UFC/ml con ambas cepas de lactobacilos no coinciden con los hallados por Zárate y col., (2007) quienes empleando un pretratamiento hormonal con estradiol y administrando vaginalmente dos dosis de *L. paracasei* CRL 1289 a la misma concentración ensayada en este estudio, observaron que dicha cepa no pudo inhibir a *Staphylococcus aureus* inoculado a una concentración de 10^7 UFC/ml. Por otro lado, los hallazgos Cheng y col., (2005) coinciden parcialmente con los demostrados aquí sobre la actividad antimicrobiana *in vivo*, ya que para resolver la infección producida por *Citrobacter rodentium* en un grupo de ratones BALB/c, necesitaron varias dosis de una cepa de *L. acidophilus* a esta misma concentración, para reducir el número de bacterias patógenas en ese modelo animal.

17.2. Efecto curativo de las dos cepas de lactobacilos sobre *Streptococcus agalactiae* a una concentración de 10^8 UFC/ml

Al realizar la misma experiencia, pero con una concentración de 10^8 UFC/ml de ambos lactobacilos se observó nuevamente la eliminación del patógeno SGB a las 48 h posinoculación de los lactobacilos. Las tablas 26 y 27 muestran cómo L23 y L60 eliminaron a SGB al día 4 del ensayo.

Tabla 26. Recuentos promedios de *Streptococcus agalactiae* y *L. fermentum* L23 a una concentración de 10^8 UFC/ml recuperados de vagina de ratones BALB/c.

Tiempo (días)	<i>S. agalactiae</i> UFC/ml	Log ₁₀ UFC/ml	<i>L. fermentum</i> UFC/ml	Log ₁₀ UFC/ml
0	$2,08 \times 10^7$	7,32		
1	$2,85 \times 10^4$	4,45		
2	$1,94 \times 10^4$	4,28	$4,07 \times 10^8$	8,61
3	$1,43 \times 10^4$	4,15	$1,07 \times 10^5$	5,03
4	No desarrollo	-----	$9,31 \times 10^4$	4,96
5	No desarrollo	-----	$4,28 \times 10^4$	4,63
6	No desarrollo	-----	$1,69 \times 10^4$	4,22
7	No desarrollo	-----	$3,79 \times 10^3$	3,57
8	No desarrollo	-----	$1,26 \times 10^3$	3,10

Tabla 27. Media de los recuentos bacterianos de *Streptococcus agalactiae* y *Lactobacillus rhamnosus* L60 a una concentración de 10^8 UFC/ml aislados de la vagina de los ratones BALB/c.

Tiempo (días)	<i>S. agalactiae</i> UFC/ml	Log ₁₀ UFC/ml	<i>L. rhamnosus</i> UFC/ml	Log ₁₀ UFC/ml
0	$1,73 \times 10^7$	7,24		
1	$1,17 \times 10^5$	5,07		
2	$4,57 \times 10^4$	4,66	$2,63 \times 10^8$	8,42
3	$5,01 \times 10^3$	3,70	$3,98 \times 10^4$	4,60
4	No desarrollo	-----	$6,30 \times 10^4$	4,80
5	No desarrollo	-----	$8,51 \times 10^3$	3,93
6	No desarrollo	-----	$2,63 \times 10^3$	3,42
7	No desarrollo	-----	$6,60 \times 10^2$	2,82
8	No desarrollo	-----	$3,54 \times 10^2$	2,55

Con la concentración 10^8 UFC/ml, la cepa L23 al ser inoculada en el nicho vaginal mostró valores de logaritmo decimal de 8,61, al día 4 cuando eliminó a SGB de la vagina, el lactobacilo permaneció con un valor de log₁₀ de 4,96 y al t8 de 3,10. De manera similar la cepa L60 alcanzó un rango de log₁₀ de 4,80 a 2,55 en igual período de tiempo. Las figuras 46 y 47 muestran la disminución y posterior eliminación del *S. agalactiae* mediante la inoculación vaginal de los lactobacilos en estudio.

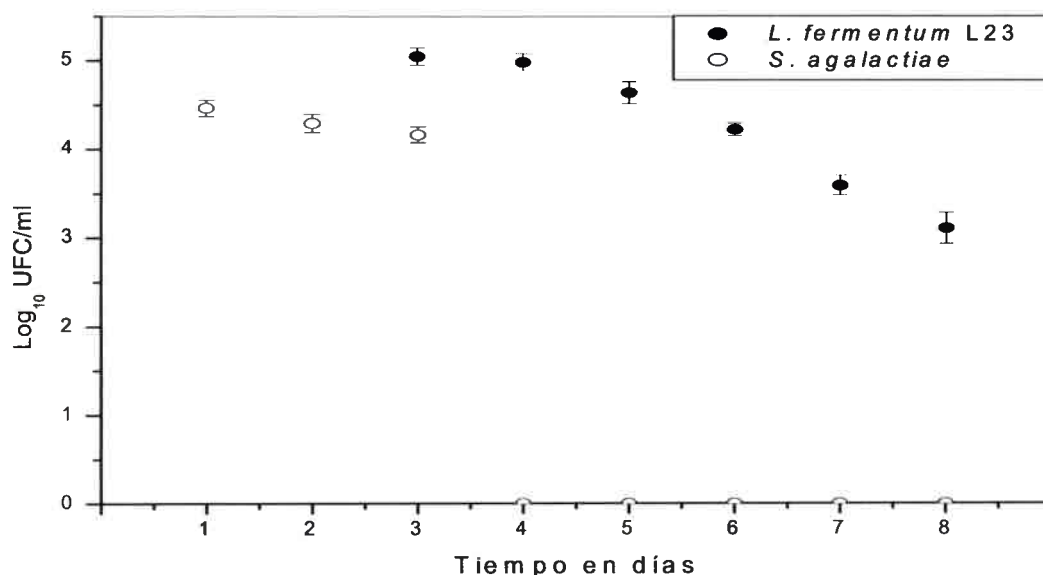


Figura 46. Efecto curativo de *Lactobacillus fermentum* con concentración inicial del orden 10^8 UFC/ml sobre la colonización de *Streptococcus agalactiae* en vagina de ratones BALB/c.

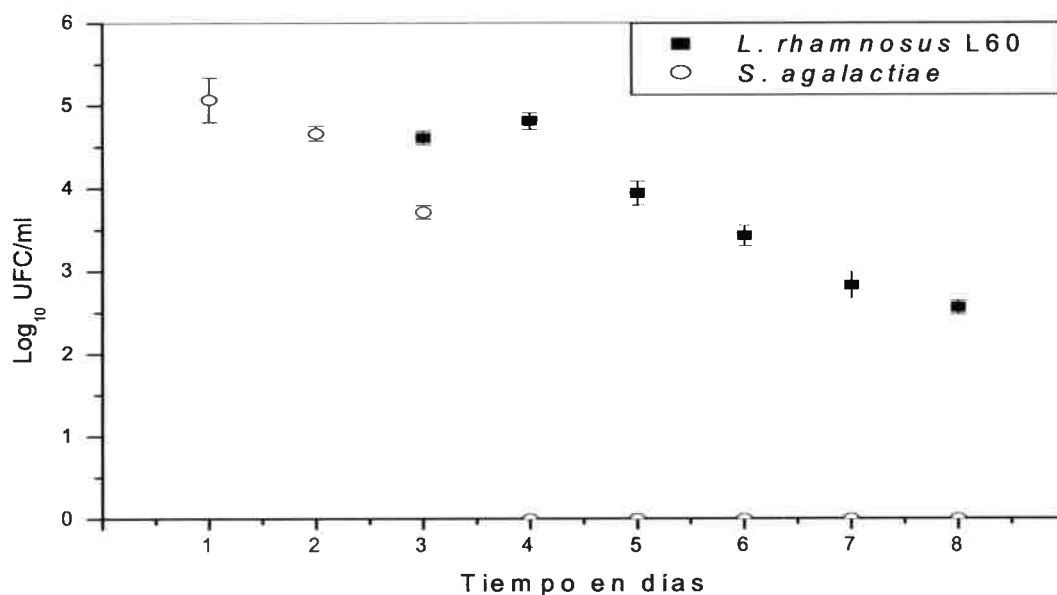


Figura 47. Efecto curativo de la administración vaginal de *Lactobacillus rhamnosus* a una concentración inicial del orden 10^8 UFC/ml sobre la colonización de *Streptococcus agalactiae* en ratones BALB/c.

Los resultados obtenidos en la experiencia del efecto curativo con las cepas L23 y L60 a la concentración de 10^8 UFC/ml no coinciden con lo informado por Asahara y col., (2001) quienes para lograr un efecto terapéutico similar frente a la infección producida por *E. coli* en el tracto urogenital, necesitaron múltiples aplicaciones diarias del lactobacilo *L. casei* Shirota a esta concentración, para reducir el número de bacterias viables en los

ratones. En otro estudio realizado en un modelo murino de infección por *Salmonella* spp., con varias aplicaciones de una cepa de *L. fermentum* ME-3 a esta concentración, no pudieron erradicar a este microorganismo (Truusalu y col., 2004), más tarde cuando se realizó la inoculación de dicha cepa combinada con un antibiótico (ofloxacina) (Truusalu y col., 2008), se logró eliminar al microorganismo, cabe destacar que para ello estos autores necesitaron combinarlos con antibióticos. En este trabajo de tesis se eliminó a SGB del nicho vaginal con una única inoculación de las cepas de lactobacilos en estudio.

17.3. Ensayo curativo de las cepas de lactobacilos sobre *Streptococcus agalactiae* a una concentración de 10^6 y 10^4 UFC/ml

La administración vaginal de los lactobacilos L23 y L60 a concentraciones de 10^6 UFC/ml a las 48 h posteriores a la inoculación de SGB en el modelo animal, eliminaron a estreptococos a las 120 h posinoculación. En las tablas 28 y 29 se presentan los valores de recuentos promedios de SGB y de las cepas de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 respectivamente. Considerando que los recuentos iniciales de las BAL probióticas fueron 10 veces menores al recuento inicial de SGB se destaca la competencia de L23 y L60 sobre los estreptococos. La cepa de lactobacilo L23 desde la inoculación (t2) hasta las 96 h (t6) consiguió una disminución en los logaritmos de 2,33 sobre los valores de SGB y 24 h posteriores (t7), logró la eliminación de SGB y permaneció el lactobacilo en la vagina con un logaritmo de 2,61 al finalizar el ensayo (t8).

Tabla 28. Valores medios de los recuentos de *Streptococcus agalactiae* y *Lactobacillus fermentum* L23 a una concentración de 10^6 UFC/ml aislados en la vagina de los ratones BALB/c.

Tiempo (días)	<i>S. agalactiae</i> UFC/ml	Log ₁₀ UFC/ml	<i>L. fermentum</i> UFC/ml	Log ₁₀ UFC/ml
0	$2,04 \times 10^7$	7,31		
1	$6,02 \times 10^4$	4,78		
2	$3,93 \times 10^4$	4,59	$6,60 \times 10^6$	6,82
3	$2,60 \times 10^4$	4,41	$6,51 \times 10^4$	4,81
4	$1,09 \times 10^4$	4,04	$4,11 \times 10^4$	4,61
5	$1,65 \times 10^3$	3,21	$2,17 \times 10^4$	4,33
6	$1,81 \times 10^2$	2,26	$4,94 \times 10^3$	3,69
7	No desarrollo	-----	$1,59 \times 10^3$	3,20
8	No desarrollo	-----	$4,13 \times 10^2$	2,61

Tabla 29. Promedio de los recuentos y valores de logaritmos decimales de *Streptococcus agalactiae* y *Lactobacillus rhamnosus* L60 a una concentración de 10^6 UFC/ml en la vagina de ratones BALB/c.

Tiempo (días)	<i>S. agalactiae</i> UFC/ml	Log ₁₀ UFC/ml	<i>L. rhamnosus</i> UFC/ml	Log ₁₀ UFC/ml
0	$2,04 \times 10^7$	7,31		
1	$5,24 \times 10^4$	4,72		
2	$3,80 \times 10^4$	4,58	$1,78 \times 10^6$	6,25
3	$1,54 \times 10^4$	4,19	$5,01 \times 10^4$	4,70
4	$6,45 \times 10^3$	3,81	$2,08 \times 10^4$	4,32
5	$2,19 \times 10^3$	3,34	$1,28 \times 10^4$	4,11
6	$2,34 \times 10^2$	2,37	$9,33 \times 10^2$	2,97
7	No desarrollo	-----	$4,89 \times 10^2$	2,69
8	No desarrollo	-----	$2,34 \times 10^2$	2,37

De igual modo, la cepa de *L. rhamnosus* L60 inhibió el número de SGB entre los días 2 y 6 de la experiencia presentando una diferencia logarítmica de 2,21. A las 120 h posteriores a la inoculación del L60 se observó la eliminación de SGB de la vagina murina en comparación al grupo control y L60 alcanzó un valor de logaritmo de 2,37 al finalizar el ensayo. Las figuras 48 y 49 describen diariamente las variaciones de la población de SGB y de ambos lactobacilos en la mucosa vaginal.

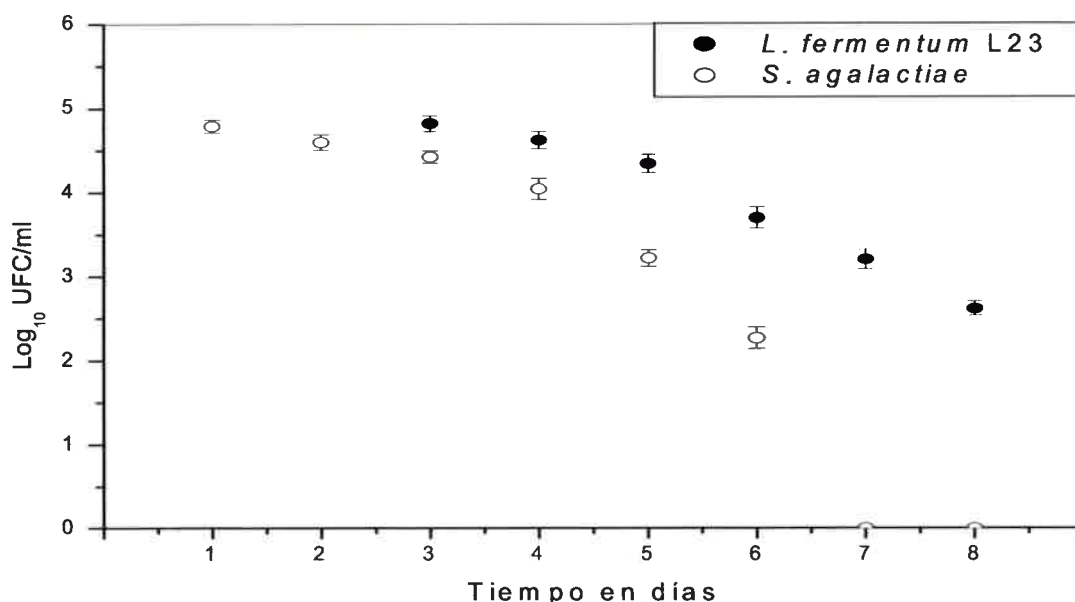


Figura 48. Efecto curativo de *Lactobacillus fermentum* con concentración inicial del orden 10^6 UFC/ml sobre la colonización de *Streptococcus agalactiae* en vagina de ratones BALB/c.

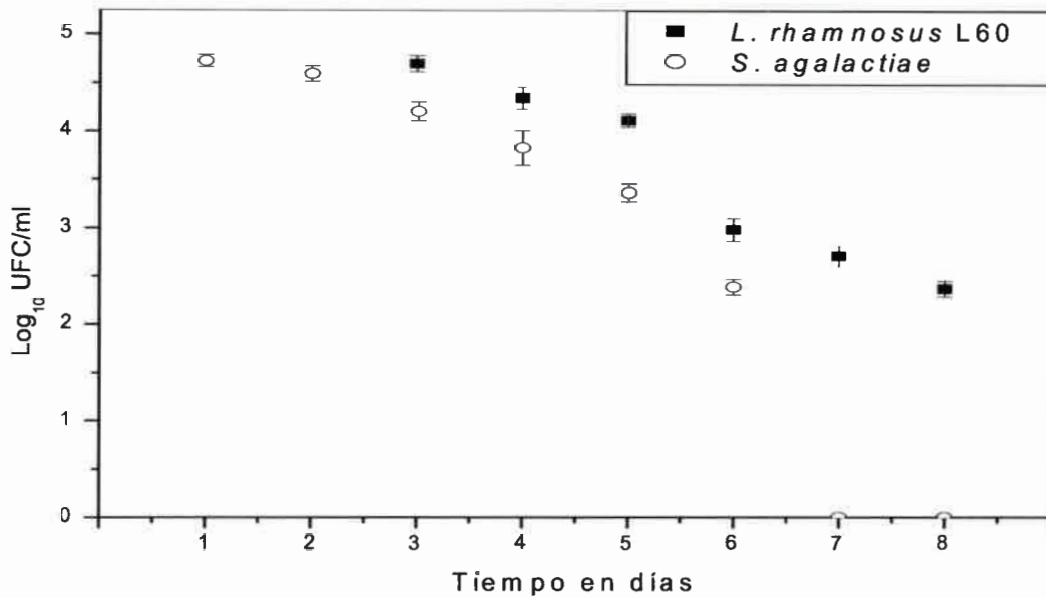


Figura 49. Efecto curativo de la administración vaginal de *Lactobacillus rhamnosus* en una concentración inicial del orden 10^6 UFC/ml sobre la colonización de *Streptococcus agalactiae* en ratones BALB/c.

Los resultados del efecto curativo encontrados con ambas cepas de lactobacilos a la concentración de 10^6 UFC/ml no pudieron ser discutidos con otros trabajos ya que en la búsqueda bibliográfica no se hallaron ensayos donde se evalúen concentraciones terapéuticas menores a 10^8 - 10^7 UFC/ml de bacterias lácticas para el tratamiento de infecciones en los tractos urogenitales de animales y de humanos (Silva de Ruíz y col, 2001, Shu y col, 2002, Osman y col, 2004, Anukam, 2006).

Al evaluar el efecto curativo de ambas cepas de lactobacilos a concentraciones iniciales del orden 10^4 , las cepas L23 y L60 no pudieron eliminar a SGB de la vagina del modelo animal. Las figuras 50 y 51 muestran el comportamiento de las cepas *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 a concentraciones de 10^4 UFC/ml sobre la colonización vaginal de SGB en los ratones BALB/c.

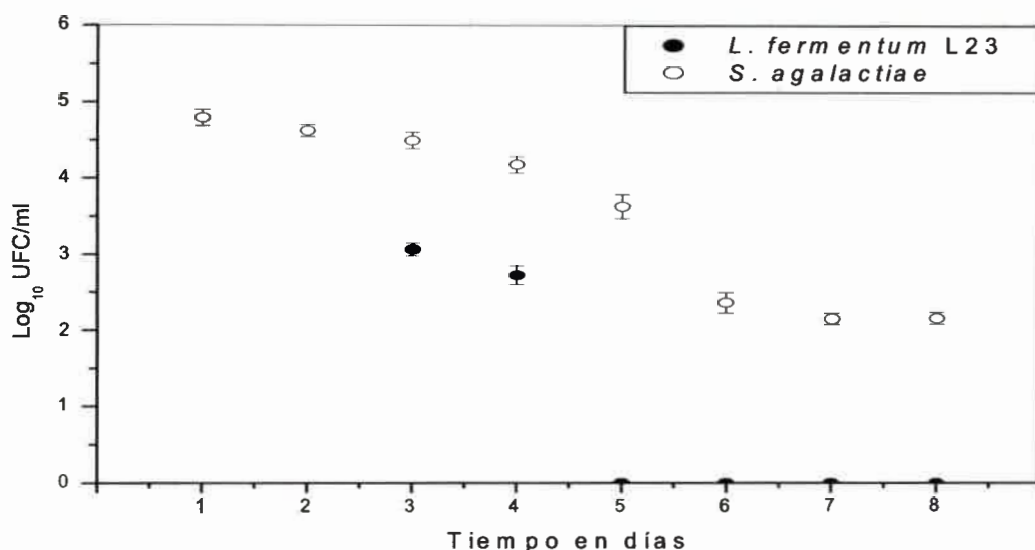


Figura 50. Efecto de *Lactobacillus fermentum* a una concentración inicial de 10^4 UFC/ml sobre la colonización de *Streptococcus agalactiae* en vagina de ratones BALB/c.

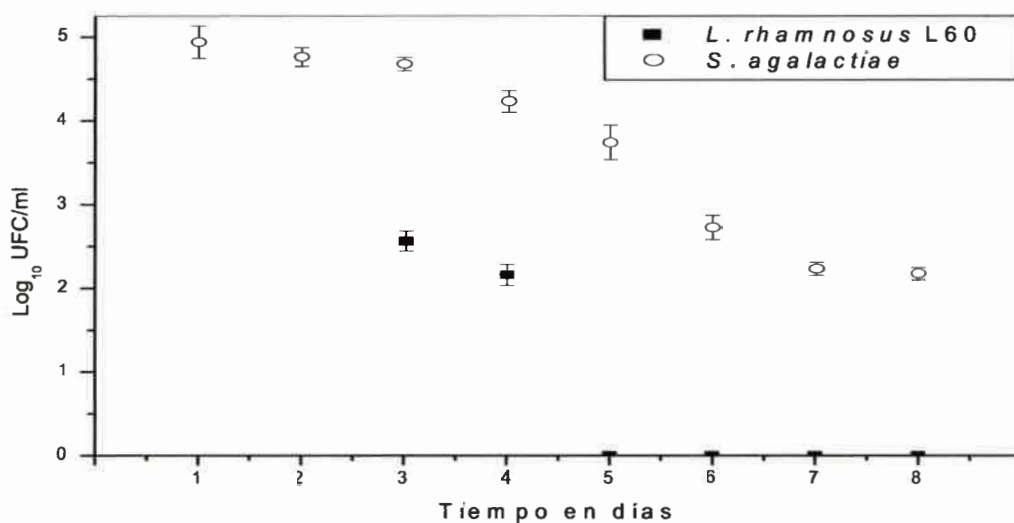


Figura 51. Inoculación vaginal de *Lactobacillus rhamnosus* a una concentración inicial del orden 10^4 UFC/ml sobre la colonización de *Streptococcus agalactiae* en ratones BALB/c.

Las cepas L23 y L60 fueron inoculadas vaginalmente a concentraciones de $6,61 \times 10^4$ y $5,24 \times 10^4$ UFC/ml respectivamente, en ambos grupos de ratones BALB/c. L23 alcanzó un valor de \log_{10} de 3,06, 24 h posteriores a su inoculación (t3) y disminuyó a 2,70 al día 4 de la experiencia. A las 72 h posinoculación no fue recuperada la cepa L23 de la vagina de los ratones BALB/c (Tabla 30).

Tabla 30. Recuentos medios de *Streptococcus agalactiae* y *Lactobacillus fermentum* a una concentración de 10^4 UFC/ml y valores de logaritmo decimal recuperados de la vagina de los ratones BALB/c.

Tiempo (días)	<i>S. agalactiae</i> UFC/ml	Log ₁₀ UFC/ml	<i>L. fermentum</i> UFC/ml	Log ₁₀ UFC/ml
0	2,09x10 ⁷	7,32		
1	6,10x10 ⁴	4,78		
2	4,10x10 ⁴	4,61	6,61x10 ⁴	4,82
3	3,04x10 ⁴	4,48	1,15x10 ³	3,06
4	1,45x10 ⁴	4,16	5,10x10 ²	2,70
5	4,15x10 ³	3,61	No desarrollo	-----
6	2,21x10 ²	2,34	No desarrollo	-----
7	1,40x10 ²	2,14	No desarrollo	-----
8	1,37x10 ²	2,13	No desarrollo	-----

La cepa L60 permaneció por 48 h en la vagina de los ratones con valores de logaritmo entre 4,72 y 2,14 al día 2 y 4 del ensayo. Al igual que con L23, la cepa L60 no presentó desarrollo a las 72 h posinoculación. En la tabla 31 se presentan los valores promedios de los recuentos de estreptococos y la cepa de lactobacilo L60 con sus correspondientes logaritmos decimales.

Tabla 31. Promedios de los recuentos de *Streptococcus agalactiae* y *Lactobacillus rhamnosus* L60 a una concentración de 10^4 UFC/ml aislados de la vagina del modelo murino utilizado.

Tiempo (días)	<i>S. agalactiae</i> UFC/ml	Log ₁₀ UFC/ml	<i>L. rhamnosus</i> UFC/ml	Log ₁₀ UFC/ml
0	1,82x10 ⁷	7,26		
1	8,51x10 ⁴	4,93		
2	5,49x10 ⁴	4,74	5,24x10 ⁴	4,72
3	4,57x10 ⁴	4,66	3,54x10 ²	2,55
4	1,62x10 ⁴	4,21	1,38x10 ²	2,14
5	5,25x10 ³	3,72	No desarrollo	-----
6	5,12x10 ²	2,71	No desarrollo	-----
7	1,62x10 ²	2,21	No desarrollo	-----
8	1,41x10 ²	2,15	No desarrollo	-----

En la búsqueda bibliográfica consultada, no se encontraron trabajos que utilicen diferentes concentraciones de lactobacilos para eliminar a los microorganismos estudiados. Los únicos aportes hallados son los realizados por investigaciones de diversos autores, quienes utilizaron una única concentración de lactobacilos para inhibir al microorganismo exógeno, como así también esos trabajos presentaron hallazgos de inhibición por cepas BAL probióticas con varias inoculaciones para lograr el efecto deseado en el modelo animal

(Asahara y col., 2001, Silva de Ruíz y col., 2001, Shu y col., 2002, Osman y col., 2004, Trusalu y col., 2004, Cheng y col., 2005, Anakum y col., 2006, Zárate y col., 2007, Trusalu y col., 2008).

Con estos resultados se realizaron análisis estadísticos comparando la respuesta de SGB a la actividad antimicrobiana producida *in vivo* por *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 a una misma concentración, respecto a los valores de colonización encontrados en el grupo control. Dicho análisis se realizó empleando la prueba de diferencias mínimas de Fisher (LSD de Fisher) con un nivel de significancia de 0,05. Los valores de SGB para realizar la prueba de Fisher se tomaron entre los días 3 y 8 de las experiencias. De esta manera se intentó deducir cuál de las BAL, consideradas aquí como tratamiento 1 (L23) y tratamiento 2 (L60), resultó más efectiva para eliminar al microorganismo patógeno SGB en función a las diferentes concentraciones estudiadas.

En la figura 52 el análisis estadístico de los tratamientos a concentraciones de 10^9 (A) y 10^8 UFC/ml (B) comparados con los valores del grupo control, demostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos 1 y 2 y el control, al día 3 del estudio, siendo cada vez mayores en los subsiguientes días del ensayo. Sobre cada barra las letras distintas representan diferencias estadísticas. Dentro de esas diferencias, cuanto mayor distancia hubo entre letras distintas, más importante fue el contraste. La comparación entre los tratamientos 1 y 2 al día 3 presentaron diferentes valores estadísticamente significativos mostrando una inhibición pronunciada con el tratamiento 2 en relación al grupo control, en la concentración 10^9 y en menor medida con la concentración 10^8 ($p < 0,05$). En los días siguientes, el tratamiento 1 con la cepa L23 mostró el mismo efecto antimicrobiano producido con L60 sobre SGB sin diferencia estadística entre ellos. Así, las cepas de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 a las concentraciones de 10^9 y 10^8 UFC/ml fueron igualmente eficaces sobre los SGB en la vagina de los ratones BALB/c.

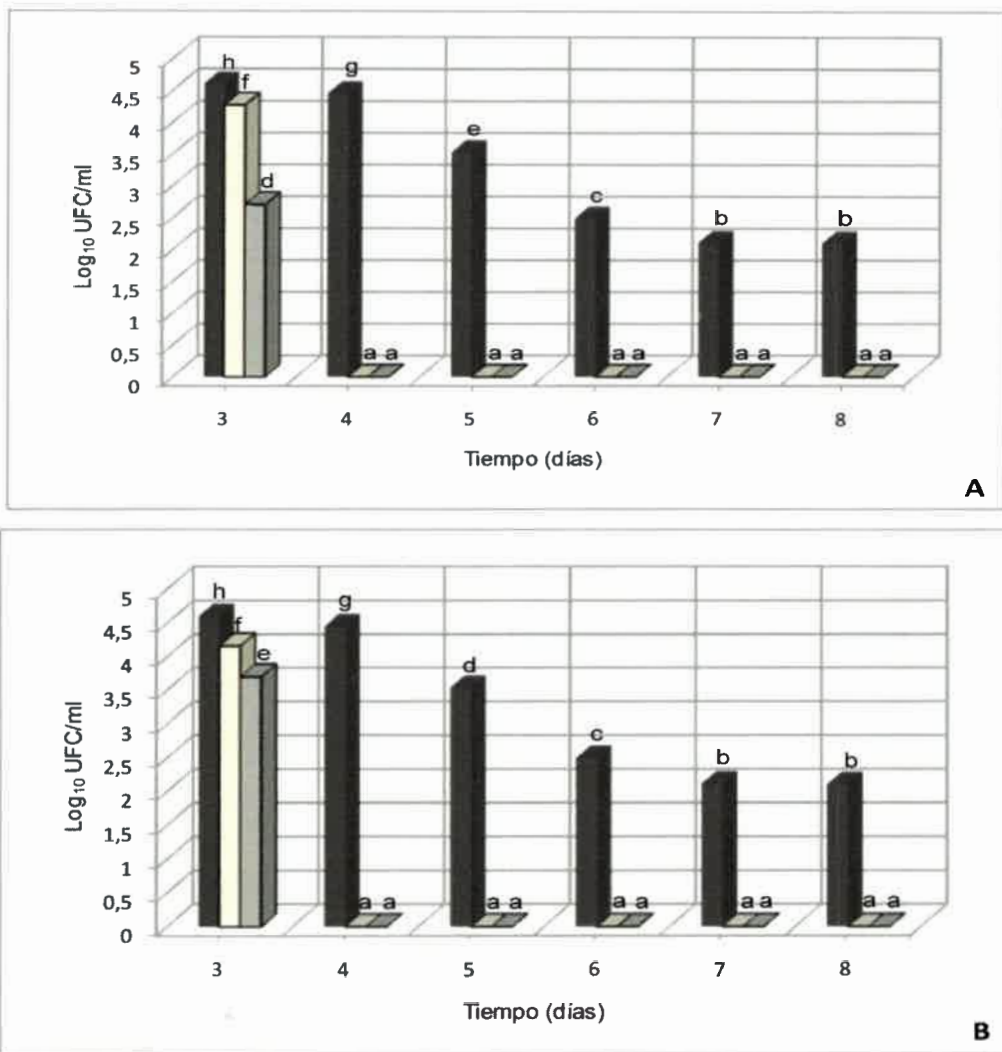


Figura 52. Valor curativo de las concentraciones 10⁹ UFC/ml (A) y 10⁸ UFC/ml (B) de las cepas de lactobacilos sobre la población de *Streptococcus agalactiae* en la vagina de los ratones BALB/c. Control colonización de SGB ■, Tratamiento 1 con cepa L23 □, Tratamiento 2 con la cepa L60 ▒. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (p<0,05).

Cuando los tratamientos se evaluaron a la concentración 10⁶ UFC/ml y se compararon con el control, se observaron mayores diferencias estadísticas en los días 5 y 6 entre el control y tratamiento 1 que con el tratamiento 2 (p<0,05). Las diferencias entre los tratamientos 1 y 2, aunque significativas, fueron más próximas que las encontradas entre el tratamiento y control (Figura 53). En esta concentración la cepa *L. fermentum* L23 fue más efectiva que L60 ya que logró una mayor reducción sobre SGB durante dos días previos a producirse la completa eliminación del estreptococo, por ambos lactobacilos a las 120 h.

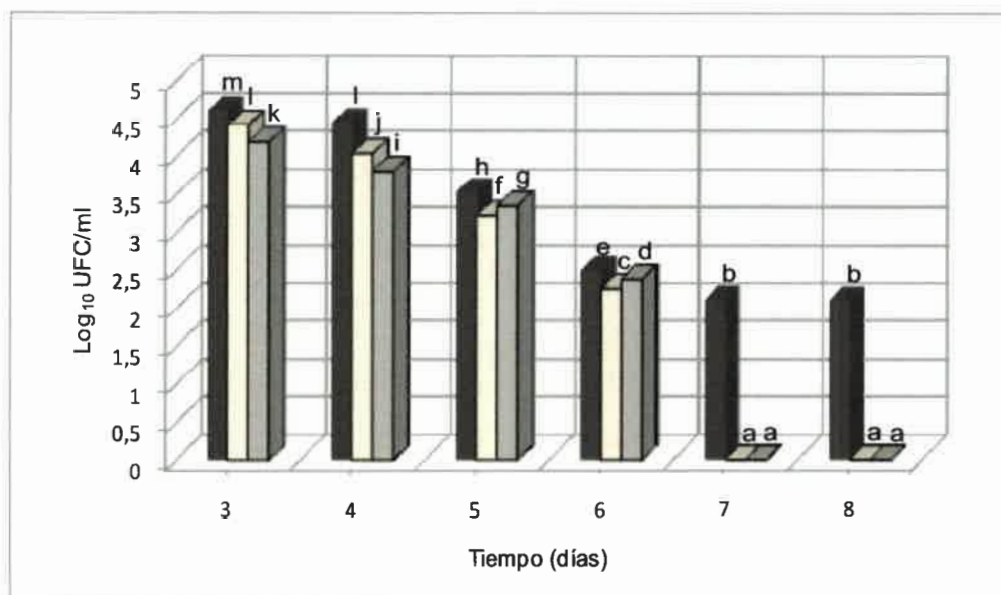


Figura 53. Valoración de la concentración 10^6 UFC/ml de ambos lactobacilos sobre *Streptococcus agalactiae* en la vagina de los ratones BALB/c. Control colonización de SGB ■, Tratamiento 1 con cepa L23 □, Tratamiento 2 con la cepa L60 □. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

Cuando se valoró el efecto antimicrobiano producido por los lactobacilos a la concentración 10^4 UFC/ml y se comparó con el control, los lactobacilos ensayados no pudieron eliminar a los estreptococos del modelo animal. En la figura 54 se observa que los tratamientos no presentaron diferencias estadísticas significativas entre ellos ni con el grupo control en el transcurso del tiempo, demostrando que no fueron efectivos en la reducción del número de SGB a esa concentración ensayada.

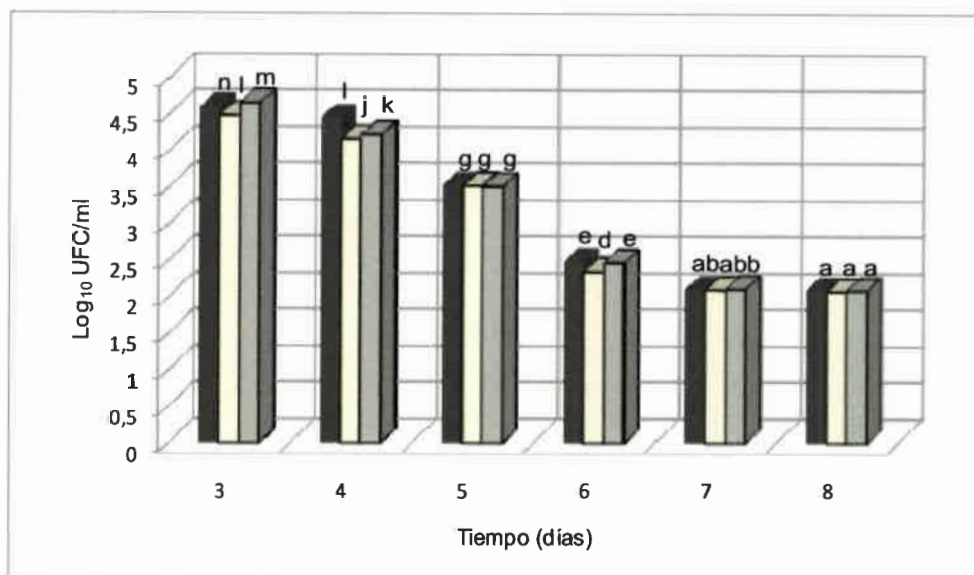


Figura 54. Valoración de la concentración 10^4 UFC/ml de ambos lactobacilos sobre la colonización de *Streptococcus agalactiae* en la vagina de los ratones BALB/c. Control colonización de SGB ■, Tratamiento 1 con cepa L23 ▤ Tratamiento 2 con la cepa L60 ■. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

En la experiencia del efecto curativo el análisis estadístico permitió conocer cuál fue la mejor cepa de lactobacilo que persistió en la vagina del modelo animal. En la figura 55 (A y B) se muestran las variaciones de la colonización diaria de ambos lactobacilos en las concentraciones 10^9 y 10^8 UFC/ml.

Ambos lactobacilos en concentraciones de 10^9 UFC/ml mostraron diferencias significativas diarias en el recuento de los mismos en la vagina de los ratones. La cepa L23 presentó mayores diferencias estadísticas con L60 entre los días 6 y 8 del estudio ($p < 0,05$). Así, la cepa de *L. fermentum* fue más efectiva que *L. rhamnosus* ya que permaneció en la vagina a una concentración mayor. En la figura B correspondiente a la concentración 10^8 UFC/ml de ambos lactobacilos, se observó que la cepa L23 colonizó mas efectivamente que la cepa L60 durante todos los días del ensayo, siendo mayores las diferencias estadísticas en los días 5, 6, 7 y 8 de la experiencia ($p < 0,05$). Finalmente aunque ambas cepas fueron igualmente eficaces a estas concentraciones en la eliminación de SGB, L23 logró mantenerse en la mucosa vaginal a mayores valores de \log_{10} UFC/ml.

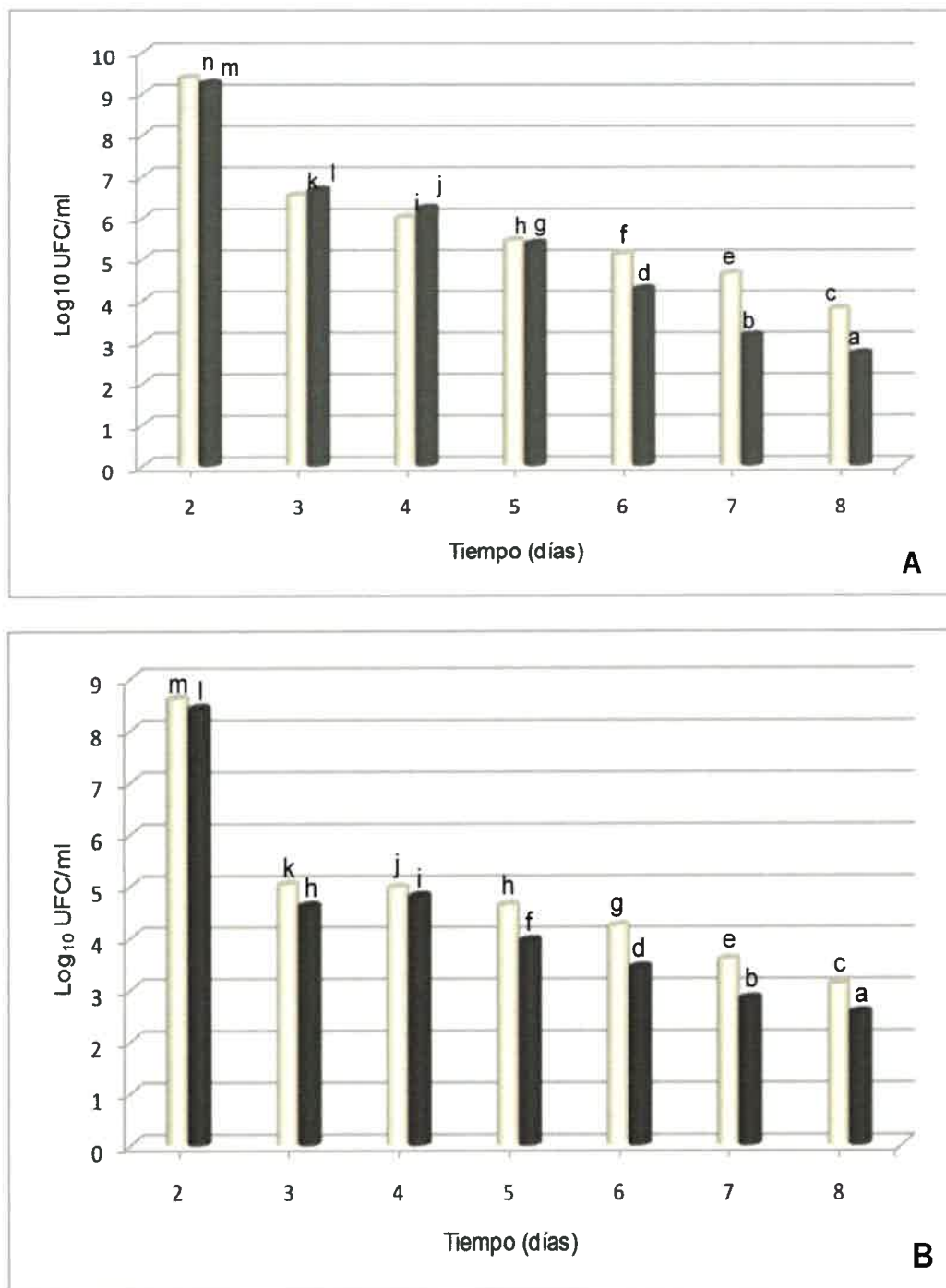


Figura 55. Persistencia de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 en el modelo murino de infección vaginal en las concentraciones 10⁹ (A) y 10⁸ (B) UFC/ml. Colonización con cepa L23 □, Colonización con la cepa L60 ■. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (p<0,05).

Quando la concentración de lactobacilos utilizada fue de 10⁶ UFC/ml, los resultados obtenidos fueron similares a los hallados con las concentraciones 10⁸ y 10⁹ UFC/ml, con diferencias estadísticas significativas durante los días que duró el ensayo (p<0,05). La figura 56 representa comparativamente las variaciones diarias en la población de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* a concentraciones iniciales de 10⁶ UFC/ml en la vagina de los ratones.

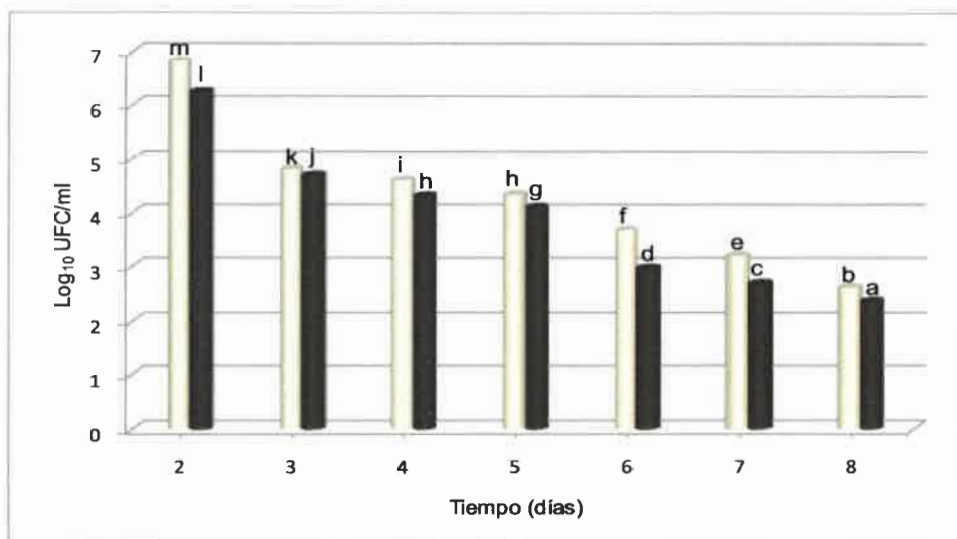


Figura 56. Comportamiento de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 colonizando la vagina del modelo murino en la concentración del orden 10⁶ UFC/ml. Colonización con cepa L23 □ Colonización con la cepa L60 ■ Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (p<0,05).

Al realizar los ensayos con la concentración 10⁴ UFC/ml de los lactobacilos, se observó que L23 alcanzó valores estadísticos superiores a los hallados con la cepa L60 durante los días 3 y 4 (p<0,05) (Figura 57). Pero posteriormente ambas cepas de lactobacilos no pudieron permanecer en la vagina de los ratones hembras hasta el final de la experiencia.

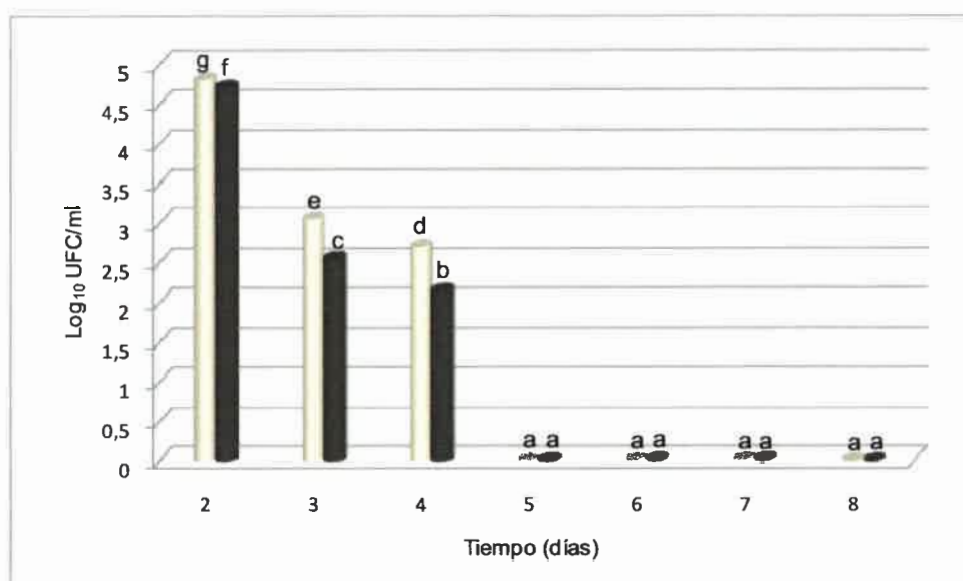


Figura 57. Comportamiento de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus rhamnosus* inoculados en concentraciones del orden 10⁴ UFC/ml en la vagina del modelo murino. Colonización con cepa L23 □, Colonización con la cepa L60 ■ Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (p<0,05).

Este trabajo de tesis destaca la eliminación de SGB de la vagina de ratones BALB/c, a distintas concentraciones de lactobacilos y fundamentalmente lo novedoso, es que fue logrado con una única administración de cada cepa de lactobacilo estudiado, sin tratamiento hormonal previo para asegurar la persistencia de los microorganismos en el nicho vaginal y en un corto período de tiempo.

La eficacia curativa de la inoculación de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* después de la infección por SGB en la vagina de los ratones BALB/c desde concentraciones de 10^9 a 10^6 UFC/ml son resultados de importancia significativa ya que sumados a futuros estudios en humanos, podrían presentar similar efecto benéfico en el nicho ecológico vaginal, contribuyendo no sólo como agentes de control biológico normalizadores de la microbiota vaginal de las mujeres en edad reproductiva sino también para el tratamiento de las infecciones del tracto urogenital femenino.

Conclusiones

- Los metabolitos biológicamente activos presentes en los sobrenadantes libres de células de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* inhibieron a todas las cepas de gonococo y a SGB estudiadas.
- La principal sustancia con actividad antimicrobiana que inhibió el crecimiento de las cepas de *N. gonorrhoeae* ensayadas fueron las bacteriocinas de *L. fermentum* y *L. rhamnosus*.
- Las bacteriocinas producidas por *L. fermentum* y *L. rhamnosus* mostraron una muy buena actividad antimicrobiana sobre las cepas de SGB.
- La acción conjunta de las bacteriocinas L23 y L60 demostraron una interacción sinérgica sobre las cepas de *N. gonorrhoeae* y *S. agalactiae*.
- El efecto inhibitorio *in vitro* por la acción combinada de las bacteriocinas L23 y L60 demostró sinergismo de potenciación sobre las cepas de SGB.
- Las bacteriocinas L23 y L60 y la mezcla de ambas, no presentaron una actividad hemolítica significativa sobre los eritrocitos humanos y de carnero.
- Se observó que el efecto sinérgico hallado con ambas bacteriocinas no se correlacionó con un efecto sinérgico sobre la actividad hemolítica.
- La ausencia de actividad hemolítica de los sobrenadantes libres de células de L23 y L60 y la mezcla de ambos representan una característica importante para la utilización de estas bacterias probióticas productores de bacteriocinas en el tracto vaginal humano.
- El análisis filogenético de las cepas de *S. agalactiae* sensibles a las bacteriocinas de ambos lactobacilos no presentaron diferencia taxonómica con otras cepas de SGB y confirmaron su pertenencia al *cluster* humano.

Este trabajo de tesis destaca la capacidad antimicrobiana de estas bacterias biocontroladoras naturales, *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60, con probadas propiedades probióticas, las cuales podrían ser consideradas una estrategia biológica complementaria al tratamiento antibiótico comúnmente utilizado en las infecciones genitales. Es de destacar, el efecto terapéutico que presentan estas bacterias productoras de bacteriocinas y sus interacciones sinérgicas, las cuales constituirían una alternativa terapéutica y/o preventiva potencial, cuando son administradas de forma conjunta para la remisión de las infecciones genitales. Estas bacterias probióticas si bien no representan una solución mágica, cada vez es mayor el interés de aplicarlas para la restauración y mantenimiento de la microbiota vaginal.

Perspectivas Futuras

Los resultados relevantes obtenidos en este trabajo de tesis doctoral con respecto a la actividad antimicrobiana observada en las dos cepas de lactobacilos estudiadas, resaltan la potencialidad probiótica de las mismas y permiten el desarrollo de nuevas estrategias de control biológico de los procesos infecciosos producidos por diversos microorganismos. Debido a los escasos estudios disponibles sobre el efecto inmunomodulador de estos microorganismos probióticos a nivel de tracto genital y gastrointestinal humano, es que una de las perspectivas futuras de este trabajo de tesis será evaluar el efecto inmune de los lactobacilos mediante la expresión de citoquinas características estudiando la regulación de la respuesta inmune Th1 y Th2 fundamentalmente. El efecto inmunomodulador de *L. fermentum*, *L. rhamnosus* y de una mezcla de ambos lactobacilos se evaluará *in vitro* mediante cultivo de linfocitos periféricos.

Es sabido que microorganismos patógenos y bacterias nosocomiales son responsables de causar infecciones agudas y crónicas por su habilidad de formar biofilms. La formación de biofilm ha sido considerada como un factor de virulencia en general y uno de los marcadores de virulencia más importantes asociados con la patogénesis de microorganismos como estreptococos del grupo B en humanos. Es de destacar que las infecciones causadas por microorganismos productores de biofilms normalmente no son fácilmente eliminadas y generan episodios recurrentes. A menudo la formación de biofilm se considera como la principal causa de falla en los tratamientos con agentes antimicrobianos. Algunos probióticos como *L. fermentum* y *L. rhamnosus* podrían considerarse una alternativa bioterapéutica para controlar la producción y ruptura del biofilm formado por microorganismos patógenos en diferentes infecciones.

Finalmente, con el propósito de desarrollar un probiótico vaginal potencialmente útil para reconstituir la microbiota y promover una mejora en la calidad de vida de las mujeres, se prevé estudiar diferentes formulaciones farmacológicas para seleccionar aquella que permita recuperar del ovulo vaginal, la cepa probiótica a diferentes tiempos con viabilidad y conservando en su totalidad la capacidad de producir sustancias antimicrobianas.



Bibliografía

- Abarzúa F, Arias A, García P, Ralph C, Cerda J, Riedel I, Gárate C. *Streptococcus agalactiae* increase in resistance to erythromycin and clindamycin in vaginal-anal colonization in third quarter of pregnancy in one decade of universal screening. *Rev Chilena Infectol.* 2011;28(4):334-7.
- ABCS (Active Bacterial Core Surveillance) Report Emerging Infections Program Network Group B *Streptococcus*, 2010. <http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/surveys/gbs10.pdf>
- ABCS (Active Bacterial Core Surveillance) Report Emerging Infections Program Network Group B *Streptococcus*, 2009. <http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/surveys/gbs09.html>
- Abo-Amer AE. and Shobrak MY. Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus salivarius* isolated from oral cavity of desert foxes. *AJMR.* 2012; 6(36): 6589-6599.
- Adékambi T, Drancourt M, Raoult D. The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends Microbiol.* 2009; 17:37-45.
- Adikwu M, Jackson C, Esimone C. Evaluation of in vitro antimicrobial effect of combinations of erythromycin in *Euphorbia hirta* leaf extract against *Staphylococcus aureus*. *Res Pharm Biotech.* 2010; 2(2): 22-24.
- AEG (Antibiotic Expert Group). Therapeutic guidelines: antibiotic Version 14. Melbourne: Therapeutic Guidelines Limited 2010. ISBN 9780980476477 <http://www.tg.org.au/index.php?sectionid=41>
- AGSP (Australian Gonococcal Surveillance Programme). Annual report of the Australian gonococcal surveillance programme, 2008. *CDI.* 2009; 33(3): 268-275.
- Alakomi, H-L.; Skytta, E.; Saarela, M.; Mattila-Sandholm, T.; Latva-Kala, K.; Helander, I.M. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 2001–2005.
- Allen SJ, Jordan S, Storey M, Thornton CA, Gravenor M, Garaiova I, Plummer SF, Wang D, Morgan G. Dietary Supplementation with lactobacilli and bifidobacteria Is Well Tolerated and Not Associated with Adverse Events during Late Pregnancy and Early Infancy. *J Nutr.* 2010; 140(3): 483–488.
- Al-Sweiha NA, Khana S, Rotimi VO. The prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections among men with urethritis in Kuwait. *Journal of Infection and Public Health.* 2011; 4, 175-179.
- Amant D, Valentin-Bon IE, Jerse AE. Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by *Lactobacillus* species that are commonly isolated from the female genital tract. *Infection and Immunity.* 2002;70(12):7169-7171.
- Amit-Romach E, Uni Z, Reifen R. Multistep mechanism of probiotic bacterium, the effect on innate immune system. *Mol Nutr Food Res.* 2009; 54(2): 277-284.
- Amyes SGB, Walsh FM and Bradley JS. Best in class: a good principle for antibiotic usage to limit resistance development? *J Antimicrob Chem.* 2007; 59: 825–826.
- Andersch-Bjorkman Y, Thomsson KA, Holmen Larsson JM, Ekerhovd E, Hansson GC. Large scale identification of proteins, mucins, and their O-glycosylation in the endocervical mucus during the menstrual cycle. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6(4): 708-716.

- ANMAT (Administración Nacional De Medicamentos, Alimentos Y Tecnología Médica), SAGyP (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca). CAA (Código alimentario Argentino). Artículo 1389: Definición de Probiótico y protocolo de Evaluación de un Probiótico como ingrediente para Alimentos. Resolución Conjunta 261/2011 y 22/2011. http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Legislacion/Alimentos/Resolucion_Conjunta_2612011_y22-2011.pdf
- Antikainen J, Kupannen V, Lähteenmäki K and Korhonen TK. pH-Dependent association of enolase and glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase of *Lactobacillus crispatus* with the cell wall and lipoteichoic acids. *J Bacteriol.* 2007; 189: 4539–4543.
- Anukam KC, Osazuwa E, Osemene GI, Ehigiagbe F, Bruce AW, Reid G. Clinical study comparing probiotic *Lactobacillus* GR-1 and RC-14 with metronidazole vaginal gel to treat symptomatic bacterial vaginosis. *Microb Infect.* 2006; 8(12-13):2772-2776.
- Anukam KC, Osazuwa EO, Ahonkhai I, and Reid G. 16S rRNA gene sequence and phylogenetic tree of *Lactobacillus* species from the vagina of healthy Nigerian women. *AJB.* 2005; 4(11), 1222–1227.
- Asaduzzaman SM, and Sonomoto K. Lantibiotics: Diverse activities and unique modes of action. *J Biosci Bioeng.* 2009; 107(5): 475–487.
- Asahara T, Nomoto K, Watanuki M, and Yokokura T. Antimicrobial activity of intraurethrally administered probiotic *Lactobacillus casei* in a murine model of *Escherichia coli* urinary tract infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 1751-1760.
- Atassi F, Brassart D, Grob P, Graf F, Servin AL: *Lactobacillus* strains isolated from the vaginal microbiota of healthy women inhibit *Prevotella bivia* and *Gardnerella vaginalis* in coculture and cell culture. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 48(3), 424–432.
- Azcárate-Peril MA, Sikes M, Bruno-Bárcena JM. The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011; 301(3):G401-24.
- Bădescu AC, Duca E, Brănișteanu DE, Dobre C, Solovăstru LG, Stătescu L, Stoleru G, Vasîlca A, Vâță D, Petrescu Z. Clinico-epidemiological features and antimicrobial resistance pattern in gonococcal infection. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 2011; 115(4): 1237-42.
- Baeten JM, Hassan WM, Chohan V, Richardson BA, Mandaliya K, Ndinya-Achola JO, Jaoko W, and McClelland RS. Prospective study of correlates of vaginal *Lactobacillus* colonization among high-risk HIV-1 seronegative women. *Sex Transm Infect.* 2009. 85(5): 348–353.
- Bal EB, Isevi T, Bal MA. Characterization of an anti-listerial enterocin from wheat silage based *Enterococcus faecium*. *J Basic Microbiol.* 2011. doi: 10.1002/jobm.201100235
- Balakrishnan A, Wang L, Li X, Ohman-Strickland P, Malatesta P, Fan H. Inhibition of chlamydial infection in the genital tract of female mice by topical application of a peptide deformylase inhibitor. *Microbiol Res.* 2009; 164(3): 338-46.
- Barcaite E, Bartusevicius A, Tameliene R, Kliucinskas M, Maleckiene L, Nadisauskiene R. Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in European countries. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008; 87(3): 260-71.
- Barcia Hernandez E, Negro Alvarez S. Fundamentos de las interacciones Farmacodinámicas (I). *Anal Real Acad Farm.* 2002; 68 (2): 126-172.

- Barrons R, Tassone D. Use of *Lactobacillus* probiotics for bacterial genitourinary infections in women: a review. *Clin Ther.* 2008; 30(3):453-68.
- Barry PM, and Klausner JD. The use of cephalosporins for gonorrhea: The impending problem of resistance. *Expert Opin Pharmacother.* 2009; 10(4): 555–577.
- Bechinger B, Lohner K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 1758: 1529–1539.
- Beerepoot MAJTG, Nys S, Vanderwal WM, De Borgie CAJM, De Reijke TM, Prins JM, Koijers JJ, Verbon A, Stobberingh EE, Geerlings SE. *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. reuteri* RC-14 versus trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP/SMX) in the prevention of recurrent urinary tract infections (rUTIs) in postmenopausal women: A randomized double-blind noninferiority trial. *ICAAC.* 2009; L1–1656a.
- Begley M, Hill C, and Gahan CGM. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *App Environ Microbiol.* 2006; 72(3): 1729–1738.
- Bendali F, Madi N, Sadoun D. Beneficial effects of a strain of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* in *Staphylococcus aureus*-induced intestinal and colonic injury. *Int J Infect Dis.* 2011; 15(11): e787-94.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume Three. The *Firmicutes*. Paul De Vos, George M. Garrity, Dorothy Jones, Noel R. Krieg, Wolfgang Ludwig, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer and William B. Whitman. 2nd Ed. Springer Dordrecht Heidelberg London, New York. 2009a; 656-711. e-ISBN 978-0-387-68489-5.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume Three: The Firmicutes. Paul Vos, George Garrity, Dorothy Jones, Noel R. Krieg, Wolfgang Ludwig, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer, William B. Whitman, Eds. Second Edition, Springer, 2009b; pp 464-510, 655-710. ISBN:978-0-387-95041-9.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria. Staley JT, Brenner DJ, Krieg NR, Eds. Second Edition, Springer, 2005; pp 774-797. ISBN:0387241450, 9780387241456.
- Berridge BR, Bercovier H, and Frelrier PF. *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficile* 16S-23S intergenic rRNA: genetic homogeneity and species-specific PCR. *Vet Microbiol.* 2001; 78, 165-173.
- Bierbaum G, Sahl HG. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Curr Pharm Biotechnol.* 2009; 10(1): 2-18.
- Biggs WS and Williams RM. Common gynecologic infections. *Primary Care.* 2009; 36(1): 33–51.
- Bisharat N, Crook DW, Leigh J, Harding R, Ward P, Coffey T, Maiden M, Peto T, Jones N. Hyperinvasive neonatal group B *Streptococcus* has arisen from a bovine ancestor. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(5):2161-2167.

- Bleich AT, Sheffield JS, Wendel GD Jr, Sigman A, Cunningham FG. Disseminated gonococcal infection in women. *Obstet Gynecol.* 2012; 119(3): 597-602.
- Bohbot JM and Cardot JM. Vaginal Impact of the Oral Administration of Total Freeze-Dried Culture of LCR 35 in Healthy Women. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2012, 4 pages. doi:10.1155/2012/503648.
- Borchers AT, Selmi C, Meyers FJ, Keen CL, and Gershwin ME. Probiotics and immunity. *J Gastroenterol* 2009; 44: 26–46.
- Boris, S., Suárez, J.E., Vázquez, F. and Barbe´s, C. Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infection and Immunity.* 1998; 66, 1985–1989.
- Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W, Marteau P, Schrezenmeir J, Vaara M, Valtonen V. Safety of probiotics that contain lactobacilli or Bifidobacteria. *Clin Infect Dis.* 2003; 36: 775-780.
- Boswihi SS, Udo EE, Al-Sweih N. Serotypes and antibiotic resistance in Group B streptococcus isolated from patients at the Maternity Hospital, Kuwait. *J Med Microbiol.* 2012; 61(Pt 1):126-31.
- Bouksaim M, Lacroix C, Bazin R, Simard RE. Production and utilization of polyclonal antibodies against nisin in an ELISA and for immunolocation of nisin in producing and sensitive bacterial strains. *J Appl Microbiol.* 1999; 87:500-510.
- Boyle RJ, Bath-Hextall FJ, Leonardi-Bee J, Murrell DF, Tang ML. Probiotics for treating eczema. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008a; 8(4): CD006135.
- Boyle RJ, Mah LJ, Chen A, Kivivuori S, Robins-Browne RM, Tang ML. Effects of *Lactobacillus* GG treatment during pregnancy on the development of fetal antigen-specific immune responses. *Clin Exp Allergy.* 2008b; 38(12):1882–90.
- Breukink E, and Kruijff B. Lipid II as a target for antibiotics. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5: 321-332.
- Brochet M, Couvé E, Zouine M, Vallaeyts T, Rusniok C, Lamy MC, Buchrieser C, Trieu-Cuot P, Kunst F, Poyart C, Glaser P. *Microb & Infect.* 2006; 8: 1227-1243.
- Brosius J, Palmer ML, Kennedy PJ, and Noller HF. Complete nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978; 75,4801-4805.
- Brotman RM, Ghanem KG, Klebanoff MA, Taha TE, Scharfstein DO, Zenilman JM. The effect of vaginal douching cessation on bacterial vaginosis: a pilot study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2008; 198:628.e1–7.
- Brotman RM, Ravel J, Cone RA, Zenilman JM. Rapid fluctuation of the vaginal microbiota measured by Gram stain analysis. *Sex. Transm. Infect.* 2010; 86:297–302.
- Brotman RM. Vaginal microbiome and sexually transmitted infections: an epidemiologic perspective. *J Clin Invest.* 2011; 121(12): 4610-7.

- Brumfitt W, Salton M, Hamilton-Miller J. Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotic: activity against metillicin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 50:731-734.
- Buvé A, Gourbin C, and Laga M. 2008. Gender perspectives and sexually transmitted diseases, p. 151–164. In K. K. Holmes, P. F. Sparling, W. E. Stamm, P. Piot, J. N. Wasserheit, L. Corey, M. S. Cohen, and D. H. Watts (ed.), *Sexually transmitted diseases*, 4th ed. McGraw-Hill, New York, NY.
- Cabo ML, Murado MA, Gonzalez MP, Pastoriza L. A method for bacteriocin quantification. *J Appl Microbiol.* 1999. 87: 907-914.
- Cadieux PA, Burton JP, Devillard E, Reid G. Lactobacilli by products inhibit the growth and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *JPP.* 2009; 60(6):13-18.
- Camisassa L, Fando E. *Streptococcus agalactiae*, estudio de portación en embarazadas y ley nacional nº 26.369/2008. Una estrategia de prevención. Hospital Domingo Funes, Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba. Villa Caeiro, Córdoba, Argentina. 2011. www.cobico.com.ar
- Carnicer-Pont D, Smithson A, Fina-Homare E, Bastida MT. The Gonococcus Antimicrobial Resistance Surveillance Working Group: Casabona J, Ciruela P, Gonzalez V, Quesada D. First cases of *Neisseria gonorrhoeae* resistant to ceftriaxona in Catalonia, Spain, May 2011. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012; 30(4): 215–222.
- Case RJ, Boucher Y, Dahllo I, Holmström C, Ford Doolittle W, and Kjelleberg S. Use of 16S rRNA and *rpoB* Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *App Environ Microbiol.* 2007; 73(1): 278-288.
- Castells S, Hernandez Perez M. Interacciones Farmacodinámicas. En *Farmacología enfermería*. 2º Ed Elsevier, España SA. Cap 5. 2007. ISBN: 978-84-8174-993-9.
- Castor ML, Whitney CG, Como-Sabetti K. Antibiotic resistance patterns in invasive group B streptococcal isolates. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2008; 727505.
- Castro LA, De Roveto C. Probióticos: Utilidad Clínica. *Colombia medica.* Colombiamedica.univalle.edu.co. 2006; 37(4): 308-14.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Active Bacterial Core Surveillance Report, Emerging Infections Program Network, Group B Streptococcus, 2010. 2012. <http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/gbs10.pdf>
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). CDC update on gonorrhea: Expand treatment to limit resistance. *JFP.* 2011b; 60(12): 736-740
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Cephalosporin susceptibility among *Neisseria gonorrhoeae* isolates—United States 2000-2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2011a; 60: 873–877.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010. *MMWR* 2010a; 59, RR-12:1-116.
- CDC. Update to CDC's Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2006: Fluoroquinolones No Longer Recommended for Treatment of Gonococcal Infections. *MMWR.* 2007; 56(14); 332-336.

- CDC. Verani, JR, McGee L., and Schrag SJ. Prevention of perinatal group B streptococcal disease-revised guidelines from CDC, 2010b. *MMWR Recommend. Rep.* 59:1–36.
- Cecchini L, Pereyra R, Ottaviano S. Prevalencia y sensibilidad de *Streptococcus agalactiae* (S. AG) aislados en mujeres embarazadas en el Hospital Zonal de Ezeiza (HZE). *Rev. Argentina de Microbiología.* 2012; 44(1): 70-71.
- Cepeda C, Santos Y Rapid and low-level toxic PCR-based method for routine identification of *Flavobacterium psychrophilum*. *Int Microbiol.* 2000; 3: 235–238
- Chaiwarith R, Jullaket W, Bunchoo M, Nuntachit N, Sirisanthana T and Supparatpinyo K. *Streptococcus agalactiae* in adults at Chiang Mai University hospital: a retrospective study. *BMC Infect Dis.* 2011; 11: 149.
- Chen CC, Louie S, Shi HN, and Walker WA. Preinoculation with the probiotic *Lactobacillus acidophilus* early in the life effectively inhibits murine *Citrobacter rodentium* colitis. *Pediatr Res.* 2005; 58(6): 1185-1191.
- Chinsembu KC. Sexually Transmitted Infections in Adolescents. *The Open Infectious Diseases Journal.* 2009; 3: 107-117.
- Chow PKH, Ng RTH, Ogden BE. Using Animal Models in Biomedical Research: A Primer for the Investigator. World Scientific, 2008. chapter 1. ISBN13-978-981-270-663-8, ISBN10 981-270-663-1.
- Chung YW, Choi JH, Oh TY, Eun CS, Han DS. *Lactobacillus casei* prevents the development of dextran sulphate sodium-induced colitis in Toll-like receptor 4 mutant mice. *Clin Exp Immunol.* 2008; 151(1): 182-9.
- Cirac AD, Moiset G, Mika JT, Kocer A, Salvador P, Poolman B, Marrink SJ, Sengupta D. The molecular basis for antimicrobial activity of pore-forming cyclic peptides. *Biophys. J.* 2011; 100: 2422–2431.
- Claesson MJ, van Sinderen D and O'Toole PW. *Lactobacillus* phylogenomics—towards a reclassification of the genus. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008; 58: 2945–2954.
- Claesson MJ, van Sinderen D and O'Toole PW. The genus *Lactobacillus* – a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiol Lett.* 2007; 269: 22–28.
- CLAP/SMR (Centro Latinoamericano de Perinatología / Salud de la Mujer y Reproductiva), OPS/OMS (Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud). INFECCIONES PERINATALES Transmitidas por la madre a su hijo. 2008. Publicación Científica CLAP/SMR 1567. ISBN: 978-92-75-32942-9.
- Clarridge III JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17:840-862.
- Cleusix V, Lacroix C, Vollenwider S, Duboux M and Le Blay G. Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiol.* 2007; 7: 1-9. Doi: 10.1186/1471-2180-7-101.

- Clifford V, Heffernan HM, Grimwood K, Garland S; Australasian GBS Resistance Study Group. Variation in erythromycin and clindamycin resistance patterns between New Zealand and Australian group B *Streptococcus* isolates. Aust N Z J Obstet Gynaecol. 2011; 51(4): 328-32.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) Interpretive Criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing; Approved Guideline. CLSI Document MM18A (ISBN:1-56238-664-6) Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2008.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Information Supplement. CLSI document M100-S17, vol 27 (1). (ISBN 1-56238-625-5). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007.
- Coffin LS, Newberry A, Hagan H, Cleland CM, Des Jarlais Don C, and Perlman David C. Syphilis in Drug Users in Low and Middle Income Countries. Int J Drug Policy. 2010; 21(1): 20–27.
- Cole AM. Innate host defense of human vaginal and cervical mucosae. Curr Top Microbiol Immunol. 2006, 306:199-230.
- Cole MJ, Chisholm SA, Hoffmann S, Stry A, Lowndes CM, Ison CA, et al. European surveillance of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Sex Transm Dis. 2010; 86:427-32.
- Collado M.C., Isolauri E., Salminen S., Sanz Y. The impact of probiotic on gut health. Curr Drug Metab. 2009; 10:68-78.
- Collado MC, Gueimonde M, Hernández M, Sanz Y, Salminen S. Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. J Food Prot. 2005; 68(12): 2672-78.
- Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: *in vitro* evaluation of different methods. J Microbiol Methods. 2007; 71(1): 71-74.
- Conly JM, Johnston BL. Coming full circle: From antibiotics to probiotics and prebiotics. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2004;15(3):161-163.
- Corr SC, Li Y, Riedel CU, O'Toole PW, Hill C, Gahan CG. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. Proc Natl Acad Sci. USA. 2007; 104, 7617–2761.
- Corvec S, Illiaquer M, Touchais S, Boutoille D, van der Mee-Marquet N, Quentin R, Reynaud A, Lepelletier D, Bémer P; Bone and Joint Infection Study Group. Clinical features of group B *Streptococcus* prosthetic joint infections and molecular characterization of isolates. J. Clin. Microbiol. 2011; 49: 380–382.
- Cotter PD, Hill C, Ross RP Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature Rev Microbiol. 2005; 3:777–788.
- Cribby S, Taylor M, and Reid G. Vaginal Microbiota and the Use of Probiotics. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2008, 1- 9. doi:10.1155/2008/256490.

- Culter RR, Wilson P, Clarke FV. Evaluation of a radiometric method for studying bacterial activity in the presence of antimicrobial agents. *J Appl Bacteriol.* 1989; 66: 515-522.
- Czaja CA, Stapleton AE, Yarova-Yarovaya Y, and Stamm WE. Phase I Trial of a *Lactobacillus crispatus* Vaginal Suppository for Prevention of Recurrent Urinary Tract Infection in Women. *Infec Dis Obstet Gynecol.* 2007; ID 35387, doi:10.1155/2007/35387.
- Dahesh S, Hensler ME, Van Sorge NM, Gertz RE Jr, Schrag S, Nizet V, Beall BW. Point mutation in the group B streptococcal *pbp2x* gene conferring decreased susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2915–8.
- Dalié DKD; Deschamps AM and Richard-Forget F. (2010). Lactic acid bacteria Potencial for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food control.* 21: 370-380.
- Daniele M, Ruíz F, Pascual L, Barberis L. Ureaplasma urealyticum and Micoplasma hominis sensitivity to bacteriocins produced by two Lactobacilli strains. *Current Microbiol.* 2011; 63:360-365.
- de Arellano AR, Sánchez M, Vera R, Jara S, González M, Castro E. Effect of orally-administered *Lactobacillus plantarum* LPLM-O1 strain in an immunosuppressed mouse model of urinary tract infection. *Benef Microbes.* 2012; 3(1): 51-9.
- De Gregorio PR, Juárez Tomás MS, Santos V, Nader-Macias ME. Beneficial lactobacilli: effects on the vaginal tract in a murine experimental model. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2012. DOI10.1007/s10482-012-9752-9.
- De Keersmaecker SCJ, Braeken K, Verhoeven TLA, Perea Vélez M, Lebeer S, Vanderleyden J, and Hols P. Flow cytometric testing of green fluorescent protein-tagged *Lactobacillus rhamnosus* GG for response to defensins. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72:4923–4930.
- Degnan FH. The US Food and Drug Administration and Probiotics: Regulatory Categorization. *Clinical Infectious Diseases.* 2008; 46: S133–6.
- Deguchi T, Nakane K, Yasuda M, Maeda S. Emergence and spread of drug resistant Neisseria gonorrhoeae. *J Urol.* 2010;184(3):851-8.
- Delcenserie V, Martel D, Lamoureux M, Amiot J, Boutin Y, Roy D. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Curr Issues Mol Biol.* 2008; 10: 37-54.
- Delucchi L, Fraga M, Perelmuter K, Cidade E, Zunino P. Vaginal lactic acid bacteria in healthy and ill bitches and evaluation of in vitro probiotic activity of selected isolates. *Can Vet J.* 2008; 49: 991-994.
- Denney JM, Culhane JF. Bacterial vaginosis: a problematic infection from both a perinatal and neonatal perspective. *Sem Fetal Neonatal Med.* 2009; 14: 200–203.
- Deshpande G, Rao S, Patole S, Bulsara M. Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates. *Pediatrics.* 2010;125(5):921-30.
- Deshpande G, Rao S, Patole S. Probiotics for prevention of necrotising enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet* 2007; 369:1614-20.
- Desriac F, Defer D, Bourgougnon N, Brillet B, Le Chevalier P, and Fleury Y. Bacteriocin as Weapons in the Marine Animal-Associated Bacteria Warfare: Inventory and Potential Applications as an Aquaculture Probiotic. *Mar. Drugs.* 2010; 8: 1153-1177.

- Devi SM, Halami PM. Detection and characterization of pediocin PA-1/AcH like bacteriocin producing lactic acid bacteria. *Curr Microbiol.* 2011; 63(2): 181-5.
- Dezwaan DC, Mequio MJ, Littell JS, Allen JP, Rossbach S, Pybus V. Purification and characterization of enterocin 62-6, a two-peptide bacteriocin produced by a vaginal strain of *Enterococcus faecium*: Potential significance in bacterial vaginosis. *Microb Ecol Health Dis.* 2007; 19(4): 241-250.
- Di Bartolomeo S, Gentile M, Priore G, Valle S, Di Bella A. *Streptococcus agalactiae* en embarazadas. Prevalencia en el Hospital Nacional Alejandro Posadas. *Rev. Argent. Microbiol.* 2005; 37 (3).
- Didelot X. 2010. "Sequence-Based Analysis of Bacterial Population Structures" (<http://books.google.com/books?id=gPVjfsWnGCcC&pg=PA46>). In D. Ashley Robinson, Daniel Falush, Edward J. Feil. *Bacterial Population Genetics in Infectious Disease*. John Wiley and Sons. p. 46–47. ISBN 978047042474.
- Diep DB, Skaugen M, Salehian Z, Holo H, and Nes IF. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *PNAS.* 2007; 104(7): 2384-2389.
- Dimitonova SP, Bakalov BV, Aleksandrova-Georgieva RN, Danova ST. Phenotypic and molecular identification of lactobacilli isolated from vaginal secretions. *J Microbiol Immunol Infect.* 2008; 41:469–77.
- Dobrogosz WJ, Peacock TJ, Hassan HM. Evolution of the probiotic concept from conception to validation and acceptance in medical science. *Adv Appl Microbiol.* 2010;72:1-41.
- Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocin production: a probiotic trait? *App Environ Microbiol.* 2012; 78(1): 1-6.
- Donders GG, Van Calsteren C, Bellen G, Reybrouck R, Van den Bosch T, Riphagen I, Van Lierde S. Association between abnormal vaginal flora and cervical length as risk factors for preterm birth. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2010; [Epub ahead of print]
- Donders GG, Van Calsteren K, Bellen G, Reybrouck R, Van den Bosch T, Riphagen I, Van Lierde S. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal Flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. *BJOG: Int J Obstet Gynecol* 2009; 116: 1315–1324.
- Donders GGG, Bellen G, Rozeberga D. Aerobic vaginitis in pregnancy. *BJOG: Int J Obstet Gynecol.* 2011, 118:1163–1170.
- Donohue DC. Safety of probiotics. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2006; 15(4): 563-569.
- Donohue DC. 2004. Safety of novel probiotic bacteria. In Salminen S, von Wright A, Ouwehand A. *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*. Marcel Dekker, Inc. New York, pp453-506.
- Dover S, Aroucheva A, Faro S, Chikindas M. Safety study of an antimicrobial Lactocin 160, produced by the vaginal *Lactobacillus rhamnosus*. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2007; doi:10.1155/2007/78248.
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2010. Stockholm: ECDC; 2010. ISSN 1830-6160.

- Edmond KM, Kortsalioudaki C, Scott S, Schrag SJ, Zaidi AK, Cousens S, Heath PT. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2012; 379(9815):547-56.
- Edwards MS, Baker CJ: Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis* 2005, 41:839-47.
- Edwards MS, Nizet V, Baker CJ. Group B Streptococcal Infections. In: Group B Streptococcal Infections, 6th ed, Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Baker CJ (Eds), Elsevier Saunders, Philadelphia 2006. p.403.
- Edwards MS, Nizet V. Group B streptococcal infections. En Remington JS, Klein, JO, Wilson CB, Nizet V, Maldonado YA, editores. *Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. 7th edition. Philadelphia: Elsevier, 2011; 419-69.
- EFFCA (European Food and Feed Cultures Association). Guidelines for Probiotics in Food and Dietary Supplements. European Food and Feed Culture Association, 2008. <http://bbs.bio668.com/simple/index.php?t35919.html>
- EFSA (European Food Safety Authority) Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific opinion on the substantiation of health claims related to live yoghurt cultures and improved lactose digestion (ID 1143, 2976) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA J*. 2010; 8:1763.
- EFSA (European Food Security Authority). Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *The EFSAJ*.2007;587:116.
www.efsa.europa.eu/cs/blobServer/Scientific_Opinion/sc_op_ej587_qps_en.pdf
- Ehrström S, Daroczy K, Rylander E, Samuelsson C, Johannesson U, Anzén B, Pålsson C. Lactic acid bacteria colonization and clinical outcome after probiotic supplementation in conventionally treated bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis. *Microb Infect* . 2010; 12: 691–699.
- Ekmekci H, Aslim B, Ozturk S. Characterization of vaginal lactobacilli coaggregation ability with *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol*. 2009; 53(2): 59-65.
- El-Aila NA, Tency I, Claeys G, Saerens B, De Backer E, Temmerman M, Verhelst R and Vaneechoutte M. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci) isolated from vaginal and rectal swabs of women at 35-37 weeks of pregnancy. *BMC Infect Dis*. 2009; 9:153 doi:10.1186/1471-2334-9-153.
- Elbaradie SM, Mahmoud M, Farid M Maternal and neonatal screening for Group B streptococci by SCP B gene based PCR: a preliminary study. *Indian J Med Microbiol*. 2009; 27: 17-21.
- Elias J, Bozzo P, and Einarson A. Are probiotics safe for use during pregnancy and lactation? *Can Fam Physician*. 2011; 57(3): 299–301.
- Erdoğan O, Tanyeri B, Torun E, Gönüllü E, Arslan H, Erenberk U, Oktem F. The comparison of the efficacy of two different probiotics in rotavirus gastroenteritis in children. *J Trop Med*. 2012; 2012: 787240.
- Ermolenko, E. I., A. I. Chernysh, I. V. Martsinkovskaia, and A. N. Suvorov. Influence of probiotic enterococci on the growth of *Streptococcus agalactiae*. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2007: 73-77.

- Evans JJ, Bohnsack JF, Klesius PH, Whiting AA, Garcia JC, Shoemaker CA, and Takahashi S. Phylogenetic relationships among *Streptococcus agalactiae* isolated from piscine, dolphin, bovine and human sources: a dolphin and piscine lineage associated with a fish epidemic in Kuwait is also associated with human neonatal infections in Japan. *J Med Microbiol.* 2008; 57, 1369–1376.
- Evans JJ, Klesius PH, Glibert PM, Shoemaker CA, Al Sarawi MA, Landsberg J, Duremdez R, Al Marzouk A, and Al Zenki S. Characterization of b-haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* (L.), and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. *J Fish Dis.* 2002; 25: 505–513.
- Evans JJ, Pasnik DJ, Klesius PH and Al-Ablani S. First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Wildl Dis* 2006; 42: 561–569.
- Falagas ME, Rosmarakis ES, Avramopoulos I, Vakalis N. *Streptococcus agalactiae* infections in non-pregnant adults: single center experience of a growing clinical problem. *Med Sci Monit.* 2006; 12: CR447-51.
- FAO (Food and Drug Administration). Development & approval process (drugs). [updated 2009 Oct 14; cited 2010 Jun 24]. <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/default.htm>
- FAO (Food and Drug Administration). Guidance for Industry on Complementary and Alternative Medicine Products and their Regulation 31. by the Food and Drug Administration. Draft Guidance. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, 2006.
- FAO/FFDCA (Food and Drug Administration. Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FD&C Act)). 21 U.S.C. 321. Sect 201. 2004. [updated 2009 Oct 14; cited 2010 Jun 24]. <http://www.fda.gov/regulatoryinformation/legislation/federalfooddrugandcosmeticactfdcaact/default.htm>
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of United Nations and World Health Organization) 2001. Posting Date Regulatory and Clinical Aspects of Dairy Probiotics. Food and Agriculture Organization of United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. Food and Agriculture Organization of United Nations and World Health Organization Working Group. (online).
- FAO/WHO Food and Agriculture Organization of United Nations and World Health Organization. 2002. Posting Date Guidelines for the evaluation of probiotic in food. Food and Agriculture Organization of United Nations and World Health Organization Working Group Report. (online).
- FAO/WHO. 2006. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. *FAO Food Nutr. Pap.* 85
- FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joints FAO/WHO Working Group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>, accessed 18 April 2008.
- Farage MA, Maibach H. Lifetime changes in the vulva and vagina. *Arch Gynecol Obstet.* 2006; 273:195–202.

- Farage MA, Miller KW and Sobel JD. Dynamics of the Vaginal Ecosystem-Hormonal Influences. *IDRT*. 2010; 3:1–15.
- Felsenstein J. 2004. *Inferring Phylogenies* (vol 2). Sunderland: Sinauer Associates, Inc. pp. 168.
- Fernandez-Cuenca. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004; 22(6): 355-60.
- FFDCA (Federal Food, Drug, and Cosmetic Act). US Code title 21, section 201(p), 2007a. www.fda.gov/regulatoryinformation/legislation/federalfooddrugandcosmeticactfdca/default.htm
- FFDCA (Federal Food, Drug, and Cosmetic Act). US Code title 21, section 321(p), 2007b. www.fda.gov/regulatoryinformation/legislation/federalfooddrugandcosmeticactfdca/default.htm
- Fimland G, Johnsen L, Dalhus B, Nissen-Meyer J. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *J Pept Sci*. 2005; 11: 688–696.
- Fimland N, Rogne P, Fimland G, Nissen-Meyer J, Kristiansen PE. Three-dimensional structure of the two peptides that constitute the two-peptide bacteriocin plantaricin EF. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1784(11): 1711-9.
- Forhan SE, Gottlieb SL, Sternberg MR, Xu F, Datta SD, McQuillan GM, Berman SM, Markowitz LE. Prevalence of sexually transmitted infections among female adolescents aged 14 to 19 in the United States. *Pediatrics*. 2009; 124: 1505–12.
- Foxman B, Gillespie BW, Manning SD, Marrs CF. Risk factors for group B streptococcal colonization: potential for different transmission systems by capsular type. *Ann Epidemiol* 2007; 17: 854-862.
- Fracchia L, Cavallo M, Allegrone G, and Martinotti MG. A Lactobacillus-derived biosurfactant inhibits biofilm formation of human pathogenic *Candida albicans* biofilm producers. *Curr Res, Tech & Education Topics in Appl Microbiol and Microbial Biotech*. 2010; 827-837.
- Fraga M, Scavone P, Zunino P. Preventive and therapeutic administration of an indigenous *Lactobacillus* sp. strain against *Proteus mirabilis* ascending urinary tract infection in a mouse model. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2005; 88: 25-34.
- Franken C, Haase G, Brandt C, Weber-Heynemann J, Martin S, Lammler C, Podbielski A, Luticken R, Spellerberg B. Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing *scpB* and *lmb*. *Mol Microbiol*. 2001; 41:925-935.
- Freire Bastos MC, Gonçalves Coutinho B and Varella Coelho ML. Lysostaphin: A Staphylococcal Bacteriolysin with Potential Clinical Applications. *Pharmaceuticals*, 2010, 3, 1139-1161. doi:10.3390/ph3041139
- Fuertes G, Giménez D, Esteban-Martín S, Sánchez-Muñoz OL, Salgado J. A lipocentric view of peptide-induced pores. *Eur Biophys J*. 2011; 40(4):399-415.
- Fujita K, Ichimasa S, Zendo T, Koga S, Yoneyama F, Nakayama J, Sonomoto K. Structural analysis and characterization of lacticin Q, a novel bacteriocin belonging to a new family

- of unmodified bacteriocins of gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73(9): 2871-7.
- Furuya R, Tanaka M. *Neisseria gonorrhoeae* infections. *Nihon Rinsho.* 2009; 67(1):129-35.
- Galarza P, Pagano I, Oviedo C, Reggiane S, Piccoli L, Mendez E, Gonzalez S, Fernandez Caniggia L, Montibello S, Flores M, Vilches V, Blazquez N, Di Bartolomeo S, Turco M, Carranza C, Pereyra N, Machain M, Togneri A, Pereyra A, Padlog R, Almuzara M, Yoya N, Cervetto M, Morano S, Hasuoka R, Casimiro A, Vargas A. Evaluación de la sensibilidad a gentamicina en cepas de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas en Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2012; 44(1): 11.
- Galhardo CL, Soares JM, Simões RS, Haidar MA, Rodrigues de Lima G, Baracat EC. Estrogen effects on the vaginal pH, flora and cytology in late postmenopause after a long period without hormone therapy. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2006; 33:85-9.
- Gallo MF, Warner L, Macaluso M, Stone KM, Brill I, Fleenor ME, Hook EW 3rd, Austin HD, Lee FK, Nahmias AJ. Risk factors for incident herpes simplex type 2 virus infection among women attending a sexually transmitted disease clinic. *Sex Transm Dis.* 2008; 35(7): 679-685.
- García Rodríguez JA, García Sánchez JE, Gómez Lus ML, Martínez Martínez L, Rodríguez Avial C, Vila J. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En: *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2001. Cap 12. www.seimc.org
- García S, Mateo M, Armitano R, Perazzi B, De Mier C, Vay C, Famiglietti A, Catalano M. Polimorfismos de *por* y *opa* y relación genética de los aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* resistente a fluorquinolonas. *Rev Arg Microbiol.* 2012b; 44(1): 67.
- García S, Quiroga MP, Perazzi B, De Mier C, Vay C, Famiglietti A, Centrón D. Caracterización genotípica de la resistencia a macrólidos en *N. gonorrhoeae*. *Rev Arg Microbiol.* 2012a; 44(1): 66-67.
- García-Rodríguez JA, Picazo JJ. 1999. Relación Huésped-Bacteria. *Compendio de Microbiología Médica.* Elsevier España. Pp 792.
- Gardner A, Stuart W, Angus Buckling. Bacteriocins, spite and virulence. *Proc R Soc Lond.* 2004; 271: 1529-1535. DOI 10.1098/rspb.2004.2756.
- Garg M. Characterization of group B *Streptococcus* vaginal niche establishment. Master Thesis, 2011. Faculty of San Diego State University, US. URI: <http://hdl.handle.net/10211.10/1088>.
- Gargis SR, Heath HE, Heath LS, LeBlanc PA, Simmonds RS, Abbott BD, Timkovich R, Sloan GL. Use of 4-Sulfophenyl Isothiocyanate Labeling and Mass Spectrometry to Determine the Site of Action of the Streptococcolytic Peptidoglycan Hydrolase Zoocin A. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75: 72-77.
- Garland SM, Cottrill E, Markowski L, Pearce C, Clifford V, Ndisang D, Kelly N, and Daley AJ for the Australasian Group for Antimicrobial Resistance-GBS Resistance Study Group. Antimicrobial resistance in group B streptococcus: the Australian experience. *JMM.* 2011; 60, 230-235.

- Garrity GM, and Holt JG. 2001. The road map to the manual, p.119–166. In G. M. Garrity (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer-Verlag, New York, N.Y.
- Gascuel O, Steel M. "Neighbor-joining revealed". Mol Biol Evol. 2006; 23(11): 1997–2000. doi:10.1093/molbev/msl072. PMID 16877499.
- Gil NF, Martinez RCR, Gomes BC, Nomizo A, De Martinis ECP. Vaginal lactobacilli as potential probiotics against *Candida* spp. Bra J Microbiol. 2010; 41: 6-14.
- Gillor O and Ghazaryan L. Recent advances in bacteriocin application as antimicrobials. Recent Pat Antiinfect Drug Discov. 2007; 2(2): 115-122.
- Gillor O, Nigro LM, Riley MA. Genetically Engineered Bacteriocins and their Potential as the Next Generation of Antimicrobials. Curr Pharmaceut Design. 2005; 11(8): 1067-1075(9).
- Gillor O. Bacteriocins' Role in Bacterial Communication. In Bacteriocins: Ecology and Evolution. Berlin Springer- Riley M.A. and Chavan M.A. 2007; 135-145.
- Giovannini M, Agostoni C, Riva E, Salvini F, Ruscitto A, Zuccotti GV, Radaelli G. A randomized prospective double blind controlled trial on effects of long-term consumption of fermented milk containing *Lactobacillus casei* in pre-school children with allergic asthma and/or rhinitis. Pediatr Res. 2007; 62: 215–20.
- Giraffa G, Neviani E, Veneroni A. Use of conductance to detect bacteriocina activity. J Food Prot. 1990; 53:772-776.
- Girald Paulo C, Araújo ED, Junior JE, Gomes do Amaral RL, Passos MRL, and Goncalves AK. The Prevalence of Urogenital Infections in Pregnant Women Experiencing Preterm and Full-Term Labor. Infect Dis Obst Gynecol. 2012, 4 pages. doi:10.1155/2012/878241.
- Giusti AP, Ramos CF, Morano ST, Nagel A, Mendez EA. *Streptococcus agalactiae*: impacto en la detección de este microorganismo en urocultivos de embarazadas. Rev. Argentina de Microbiología. 2012; 44(1): 16-17.
- Goldin BR, Gorbach SL. Clinical indications for probiotic: an overview. Clin Infect Dis. 2008; 46 Suppl 2:S96-100.
- Golparian D, Hellmark B, Fredlund H, Unemo M. Emergence, spread and characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with in vitro decreased susceptibility and resistance to extended-spectrum cephalosporins in Sweden. Sex Transm Infect. 2010; 86(6): 454-60.
- Goold PC, Bignell CJ. No way back for quinolones in the treatment of gonorrhea. Sex Transm Infect. 2006; 82 : 225-6.
- Gordon DM, Oliver E, Littlefield-Wyer J. The diversity of bacteriocins in Gram-negative bacteria. Bacteriocins: ecology and evolution Berlin: SpringerRiley MA, Chavan M. 2007; 5-18.
- Granato, D., G. F. Branco, A. G. Cruz, J. A. F. Faria and N. P. Shah. Probiotic dairy products as functional foods. Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety. 2010; 9: 455-470.
- Gratz SW, Mykkanen H, El-Nezami HS. Probiotics and gut health: A special focus on liver diseases. World J Gastroenterol. 2010; 16(4): 403-410.
- Graver MA, Wade J. The role of acidification in the inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by vaginal lactobacilli during anaerobic growth. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2011; 10:1-8.

- Guaschino S, Benvenuti C; SOPHY Study Group. SOPHY project: an observational study of vaginal pH and lifestyle in women of different ages and in different physiopathological conditions. Part I. *Minerva Ginecol.* 2008; 60(2):105-14.
- Gudiña EJ, Rocha V, Teixeira JA, and Rodrigues LR, Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. *Lett Appl Microbiol.* 2010a. 50(4), 419–424.
- Gudiña EJ, Teixeira JA, and Rodrigues LR. Biosurfactant-producing lactobacilli: Screening, production, profiles and effect of medium composition. *Applied and Environmental Soil Sciences.* 2011, 9 pages. doi:10.1155/2011/201254
- Gudiña EJ, Teixeira JA, and Rodrigues LR. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. *Colloids and Surfaces B.* 2010b; 76(1): 298–304.
- Guillor O, Etzion A, Riley MA. The dual role of bacteriocins as anti and probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008; 81: 591-606.
- Gupta V, Garg R. Probiotics. *Indian J Med Microbiol.* 2009; 27(3): 202-9.
- Gustafsson RJ, Ahrné S, Jeppsson B, Benoni C, Olsson C, Stjernquist M and Ohlsson B. The *Lactobacillus* flora in vagina and rectum of fertile and postmenopausal healthy Swedish women. *BMC women's health.* 2011,11:17.
- Guyonnet D, Fremaux C, Cenatiempo Y, Berjeaut J. Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66: 1744–1748.
- Hajela N, Nair GB, Abraham P and Ganguly NK. Health impact of probiotics - vision and opportunities. *Gut Pathogens.* 2012, 4:1.
- Hakansson A and Molin G. Gut Microbiota and Inflammation. *Nutrients.* 2011, 3: 637-682; doi:10.3390/nu3060637.
- Hale JDF, Ting Y-T, Jack RW, Tagg JR, Heng NCK Bacteriocin (mutacin) production by *Streptococcus mutans* genome sequence reference strain UA159: elucidation of the antimicrobial repertoire by genetic dissection. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71:7613–7617.
- Hammami R, Zouhir A, Hamida JB and Fliss I. BACTIBASE: a new web-accessible database for bacteriocin characterization. *BMC Microbiology.* 2007; 7:89. doi:10.1186/1471-2180-7-89.
- Hao Q, Lu Z, Dong BR, Huang CQ, Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011; 7(9):CD006895.
- Harmsen D, and Karch H. 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. *ASM News.* 2004; 70:19–24.
- Harriott MM, Lilly EA, Rodriguez TE, Fidel PL Jr, Noverr MC. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. *Microbiology.* 2010; 156: 3635–3644.
- Hasper HE, Kramer NE, Smith JL, Hillman JD, Zachariah C, Kuipers OP, de Kruijff B, Breukink E. An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. *Science.* 2006; 313(5793): 1636-7.

- Heath PT, Schuchat A. Perinatal group B streptococcal disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2007; 21:411-24.
- Heilpern D, Szilagyi A. Manipulation of intestinal microbial flora for therapeutic benefit in inflammatory bowel diseases: review of clinical trials of probiotics, pre-biotics and synbiotics. *Rev Recent Clin Trials.* 2008; 3(3):167-84.
- Heng NCK, Burtenshaw GA, Jack RW, Tagg JR. Sequence analysis of pDN571, a plasmid encoding novel bacteriocin production in M-type 57 *Streptococcus pyogenes*. *Plasmid.* 2004; 52: 225–229.
- Heng NCK, Ragland NL, Swe PM, Inglis MA, Baird HJ, Tagg JR, Jack RW. Dysgalacticin: a novel, plasmid-encoded bacteriocin produced by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Microbiology.* 2006; 152: 1991–2001.
- Heng NCK, Wescombe PA, Burton JP, Jack RW, Tagg JR: The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. *Bacteriocins: ecology and evolution* Berlin: Springer Riley MA, Chavan M. 2007; 45-92.
- Hertle R, Hilger M, Weingardt-Kocher S, and Walev I. Cytotoxic Action of *Serratia marcescens* hemolysin on Human Epithelial cells. *Infect & Immun.* 1999; 67(2):817-825.
- Heymans R, Bruisten SM, Golparian Daniel, Unemo M, de Vries HJC, and van Dama AP. Clonally Related *Neisseria gonorrhoeae* Isolates with Decreased Susceptibility to the Extended-Spectrum Cephalosporin Cefotaxime in Amsterdam, the Netherlands. *AAC.* 2012; 56 (3): 1516–1522.
- Hibberd PL, and Davidson L. Probiotic Foods and Drugs: Impact of US Regulatory Status on Design of Clinical Trials. *Clinical Infectious Diseases.* 2008; 46:S137–40.
- Hickson M, D'Souza AL, Muthu N, Rogers TR, Want S, Rajkumar C, Bulpitt CJ. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ.* 2007; 335(7610):80.
- Hill JB, Sheffield JS, McIntire DD, Wendel GD Jr. Acute pyelonephritis in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2005; 105(1): 18–23.
- Hjelmevoll SO, Golparian D, Dedi L, Skutlaberg DH, Haarr E, Christensen A, Jørgensen S, Nilsen ØJ, Unemo M, Skogen V. Phenotypic and genotypic properties of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Norway in 2009: antimicrobial resistance warrants an immediate change in national management guidelines. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; 31(6):1181-6.
- Hoffman FA. Development of Probiotic as Biologic Drugs. *Clin Infect Dis.* 2008; 46(2): S125-7.
- Hook EW, and Handsfield HH. 2008. Gonococcal infections in the adult, p. 627–646. *In* K. K. Holmes, P. F. Sparling, W. E. Stamm, P. Piot, J. N. Wasserheit, L. Corey, M. S. Cohen, and D. H. Watts (ed.), *Sexually transmitted diseases*, 4th ed. McGraw-Hill, New York, NY. http://icmr.nic.in/guide/PROBIOTICS_GUIDELINES.pdf
- Hraoui M, Boutiba-Ben Boubaker I, Rachdi M, Slim A, Ben Redjeb S. Macrolide and tetracycline resistance in clinical strains of *Streptococcus agalactiae* isolated in Tunisia. *J Med Microbiol.* 2012; 61(Pt 8):1109-13.

- Hsieh MH, and Versalovic J. The human microbiome and probiotics: implications for pediatrics.. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2008; 38(10): 309-327.
<http://www.fda.gov/regulatoryinformation/legislation/federalfooddrugandcosmeticactfdca/default.htm>
- Huang T, Geng H, Miyyapuram VR, Sit CS, Veredas JC, and Nakano MM. Isolation of a variant of subtilisin A with haemolytic activity. *J Bacteriol*. 2009; 191(18):5690-5696.
- Huang Y, Huang J, Chen Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein Cell*. 2010; 1(2): 143-52.
- Huffnagle GB, Wernick S. *The probiotics revolution*. Bantam Dell, NY, USA. 2007.
- Hume ME. Historic perspective: prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics. *Poult Sci*. 2011; 90(11): 2663-9.
- Hunt DE, Klpac-Ceraj, V, Acinas SG, Gautier C, Betilsson S. et al. Evaluation os 23s rRNA PCR primers for use in phylogenetic Studies of bacterialdiversity. *Appl. Environ. Microbiol*. 2006; 72: 2221-5
- Iannitti T, Palmieri B. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clin Nutr*. 2010; 29(6): 701-25.
- ICMR-DBT (Indian Council of Medical Research-Department of Biotechnology). Guidelines for evaluation of probiotics in food. 2011.
- InfoStat, 2008. *InfoStat, versión 2008. Manual del Usuario*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Primera Edición, Editorial Brujas Argentina.
- Iqbal SM, Ball TB, Levinson P, Maranan L, Jaoko W, Wachihi C, Pak BJ, Podust VN, Broliden K, Hirbod T, Kaul R, Plummer FA. Elevated elafin/trappin-2 in the female genital tract is associated with protection against HIV acquisition. *AIDS*. 2009;23(13):1669-77.
- Irvine SL, Hummelen R, Hekmat S, Looman CW, Habbema JD, Reid G. Probiotic yogurt consumption is associated with an increase of CD4 count among people living with HIV/AIDS. *J Clin Gastroenterol*. 2010; 44(9): e201-5.
- Ivanova, I., P. Kabadjova, A. Pantev, S. Danova, X. Dousset, Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin Substance produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* b14 isolated from Boza-Bulgarian traditional cereal beverage. *Biocatalysis*. 2000; 41(6): 47-53.
- Ivory K, Chambers SJ, Pin C, Prieto E, Arques JL, Nicoletti C. Oral delivery of *Lactobacillus casei* Shirota modifies allergen-induced immune responses in allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2008; 38: 1282-9.
- Janapatla, RP, Ho YR, Yan JJ, Wu HM, and Wu JJ. The prevalence of erythromycin resistance in group B streptococcal isolates at a University Hospital in Taiwan. *Microb Drug Resist*. 2008; 14: 293-297.
- Janda WM, and Gaydos CA. 2007. *Neisseria*. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed., pp. 601-620). Washington, D.C.: ASM Press.
- Jassawala MJ. Probiotics and Women's Health. *J Obstet Gynecol India*. 2007; 57(1): 19-21.

- Joachim A, Matee MI, Massawe FA, Lyamuya EF. Maternal and neonatal colonisation of group B *Streptococcus* at Muhimbili National Hospital in Dar es Salaam, Tanzania: prevalence, risk factors and antimicrobial resistance. *BMC Public Health*. 2009; 9:437.
- Johnston BC, Goldenberg JZ, Vandvik PO, Sun X, Guyatt GH. Probiotics, probiotics and synbiotics. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011; 9(11):CD004827.
- Jones K. Probiotics: preventing antibiotic associated diarrhea. *J. Spec. Pediatr. Nurs*. 2010, 15(2), 160–162.
- Jones ML, Martoni CJ, Parent M, and Prakash S. Cholesterol-lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults. *Brit Jour Nutr*. 2011; 9: 1–9.
- Jong A, van Hijum S AFT, Bijlsma JJE, Kok J and Kuipers OP. BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool. *Nucleic Acids Research*. 2006; (34): W273–W279. doi:10.1093/nar/gkl237.
- Jordan HT, Farley MM, Craig A, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, Lynfield R, Thomas A, Zansky S, Gershman K, Albanese BA, Schaffner W, Schrag SJ; Active Bacterial Core Surveillance (ABCs)/Emerging Infections Program Network, CDC. Revisiting the need for vaccine prevention of late-onset neonatal group B streptococcal disease: a multistate, population-based analysis. *Pediatr Infect Dis J*. 2008; 27(12):1057-64.
- Juárez Tomás MS, and Nader-Macias ME. Effect of a médium simulating vaginal fluid on the growth and expression of beneficial characteristics of potentially probiotic lactobacilli. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, A. Méndez Vilas (Ed). 2007; 732-739.
- Juarez Tomas MS, Ocaña VS, Wiese B, Nader Macias ME. Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259 and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Med Microbiol*. 2003; 52:1117-24.
- Juárez Tomás MS, Saralegui Duhart CI, De Gregorio PR, Vera Pingitore E, Nader-Macias ME. Urogenital pathogen inhibition and compatibility between vaginal *Lactobacillus* strains to be considered as probiotic candidates. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011; 159(2):399-406.
- Kajander K, Myllyluoma E, Rajilic-Stojanovics M, Kyrönpalo S, Rasmussen M, Järvenpää S, Zoetendal EG, De Vos WM, Vapaatalo H, and Korpela R. Clinical trial: multispecies probiotic supplementation alleviates the symptoms of irritable bowel syndrome and stabilizes intestinal microbiota. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008; 27:48–57.
- Kalliomäki M, Antoine JM, Herz U, Rijkers GT, Wells JM, Mercenier A. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: prevention and management of allergic diseases by probiotics. *J Nutr*. 2010; 140(3): 713S-21S.
- Kasahara K, Baltus AJ, Lee SH, Edelstein MA, and Edelstein PH. Prevalence of Non-Penicillin-Susceptible Group B *Streptococcus* in Philadelphia and Specificity of Penicillin Resistance Screening Methods. *J Clin Microbiol*. 2010, 48(4): 1468-1469.

- Kaur IP, Kuhad A, Garg A, Chopra K. Probiotics: Delineation of Prophylactic and Therapeutic Benefits. *Journal of Medicinal Food*. 2009; 12:2, 219-235.
- Kawamura Y, Itoh Y, Mishima N, Ohkusu K, Kasai H, and Ezaki T. High genetic similarity of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficilis*: *S. difficilis* Eldar et al.1995 is a later synonym of *S. agalactiae* Lehmann and Neumann 1896 (Approved Lists 1980). *IJSEM*. 2005; 55:961-965.
- Ke D, Menard C, Picard FJ, Boissonot M, Quellette M, Roy PH, and Bergeron MG. Development of conventional and real time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci. *Clin Chem*. 2000; 46:324-331.
- Kemperman R, Jonker M, Nauta A, Kuipers OP, Kok J Functional analysis of the gene cluster involved in production of the bacteriocin circularin A by *Clostridium beijerinckii* ATCC 25752. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69: 5839–5848.
- Kerr B, Riley MA, Feldman MW, and Bohannan BJM. Local Dispersal Promotes Biodiversity in A real-Life Game of Rock-Paper-Scissors. *Nature*. 2002; 418: 171-174.
- Khani S, Hosseini HM, Taheri M, Nourani MR, Imani Fooladi AA. Probiotics as an alternative strategy for prevention and treatment of human diseases: a review. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2012; 11(2): 79-89.
- Kidd S, Kirkcaldy R, Ye T, Papp J, Trees D, and Shapiro SJ. Cephalosporin resistant *Neisseria gonorrhoeae* public health response plan. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2012. <http://www.cdc.gov/std/treatment/Ceph-R-ResponsePlanJuly30-2012.pdf>
- Kiely RA, Cotter L, Mollaghan AM, Cryan B, Coffey A, Lucey B. Emergence of group B *Streptococcus* serotype IV in women of child-bearing age in Ireland. *Epidemiol Infect*. 2011; 139(2): 236-8.
- Kim EJ, Oh KY, Kim MY, Seo YS, Shin JH, Song YR, Yang JH, Foxman B, Ki M. Risk Factors for Group B *Streptococcus* Colonization Among Pregnant Women in Korea. *Epidemiology and Health*. 2011; 33: e2011010
- Kim Y, Kim S-H, Whang K-Y, Kim Y-J, Oh S. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 attachment by interactions between lactic acid bacteria and intestinal epithelial cells. *J Microbiol Biotechnol*. 2008; 18(7): 1278-1285.
- Kim YH, Kim CH, Cho MK, Na JH, Song TB, Oh JS: Hydrogen peroxide-producing Lactobacilli in the vaginal flora of pregnant women with preterm labor with intact membranes. *Int J Gynaecol Obstet*. 2006. 93(1): 22–27.
- Kimura K, Nagano N, Nagano Y, Wachino J, Suzuki S, Shibayama K, Arakawa Y. Predominance of sequence type 1 group with serotype VI among group B streptococci with reduced penicillin susceptibility identified in Japan. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66(11): 2460-4.
- Kimura K, Suzuki S, Wachino J, Kurokawa H, Yamane K, Shibata N, Nagano N, Kato H, Shibayama K, Arakawa Y. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(8): 2890-7.
- Kitazawa H, Thono M, Shimosato T, Saito T. Development of molecular immunoassay system for probiotics via toll-like receptors based on food immunology. *Anim Sci J*. 2008; 79: 11–21.

- Kjos M, Snipen L, Salehian Z., Nes IF and Diep DB. The Abi proteins and their involvement in bacteriocin self-immunity. *J Bacteriol.* 2010; 192, 2068–2076.
- Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Res.* 1993; 12(1–3): 39–85.
- Kleerebezem M, Hols P, Bernard E, Rolain T, Zhou M, Siezen RJ and Bron PA. The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiol Rev.* 2010; 34: 199–230.
- Knezevic A, Stepanovic S, Cupic M, Jevtovic D, Ranin J, Jovanovic T: Reduced quantity and hydrogen-peroxide production of vaginal lactobacilli in HIV positive women. *Biomed. Pharmacother.* 2005. 59(9): 521–523.
- Köhler GA, Assefa S, and Reid G. Probiotic Interference of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 with the Opportunistic Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology.* 2012; ID 636474, 14 pages. doi:10.1155/2012/636474.
- Kommedal O, Karlsen B, Saebø O. Analysis of mixed sequencing chromatograms and its application in direct 16S rRNA gene sequencing of polymicrobial samples. *Clin Microbiol.* 2008; 46:3766-3771.
- Koneman, Capítulo 13: Cocos grampositivo Parte II: Estreptococos, enterococos y bacterias “similares a *Streptococcus*”. *Diagnóstico Microbiológico.* Editorial Panamericana 6ª Edición, Argentina, 2008: 649 – 654.
- Kong F, Gowan S, Martin D, James G, and Gilbert G. Serotype identification of Group B streptococci by PCR and sequencing. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(1): 216-226.
- Koning CJ, Jonkers DM, Stobberingh EE, Mulder L, Rombouts FM, Stockbrügger RW. The effect of a multispecies probiotic on the intestinal microbiota and bowel movements in healthy volunteers taking the antibiotic amoxicillin. *Am J Gastroenterol.* 2008; 103(1):178-89.
- Kotikalapudi BL. Characterization and encapsulation of probiotic bacteria using a pea-protein alginate matrix. Master Thesis, 2009. University of Saskatchewan, Canada.
- Kubanova, A., N. Frigo, A. Kubanov, S. Sidorenko, T. Pripitnevich, T. Vachnina, N. Al-Khafaji, S. Polevshikova, V. Solomka, M. Domeika, and M. Unemo. National surveillance of antimicrobial susceptibility in *Neisseria gonorrhoeae* in 2005–2006 and recommendations of first-line antimicrobial drugs for gonorrhea treatment in Russia. *Sex Transm Infect.* 2008; 84: 285–289.
- Kuitunen M, Kukkonen K, Juntunen-Backman K, Korpela R, Poussa T, Tuure T, et al. Probiotics prevent IgE-associated allergy until age 5 years in cesarean-delivered children but not in the total cohort. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; 123(2): 335–41.
- Kukkonen K, Savilahti E, Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela R, Poussa T, Tuure T, Kuitunen M. Probiotics and prebiotic galacto oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 119(1): 192-8.
- Kukkonen K, Savilahti E, Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela R, Poussa T, Tuure T, Kuitunen M. Long-term safety and impact on infection rates of postnatal probiotic and prebiotic (synbiotic) treatment: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pediatrics.* 2008; 122(1): 8–12.

- Kumar M, Nagpal R, Kumar R, Hemalatha R, Verma V, Kumar A, Chakraborty C, Singh B, Marotta F, Jain S, and Yadav H. Cholesterol-Lowering Probiotics as Potential Biotherapeutics for Metabolic Diseases. *Exp Diabetes Res.* 2012; 14 pages. doi:10.1155/2012/902917.
- Kumar N, Behera B, Sagiri SS, Pal K, Sirsendu SR, and Saroj Roy. Bacterial vaginosis: Etiology and modalities of treatment-A brief note. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011; 3(4): 496-503.
- Kumar R., Grover S., and Batish V. K. Hypocholesterolaemic effect of dietary inclusion of two putative probiotic bile salt hydrolase-producing *Lactobacillus plantarum* strains in Sprague-Dawley rats. *British Journal of Nutrition.* 2010, 1–12.
- Labome. Laboratory Mice and Rats. 2012. www.labome.com/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html
- Lahtinen SJ, Forssten S, Aakko J, Granlund L, Rautonen N, Salminen S, Viitanen M, Ouwehand AC. Probiotic cheese containing *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM(®) modifies subpopulations of fecal lactobacilli and *Clostridium difficile* in the elderly. *Age (Dordr).* AGE. 2012; 34(1): 133-143. DOI:10.1007/s11357-011-9208-6.
- Lamont RF, Sobel JD, Akins RA, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, Romero R. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG.* 2011; 118:533–549.
- Lanari M, Serra L, Cavrini F, Liguori G, Sambri V. Late-onset Group B streptococcal disease by infected mother's milk detected by polymerase chain reaction. *New Microbiol.* 2007; 30: 253-254.
- Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques.* In Stackebrandt E, and Goodfellow M (Eds.), *Bacterial Systematics.* John Wiley & Sons, New York, pp115-175.
- Larcher JS, Capellino F, De Giusto R, Travella C, Balagione FG, Kreiker G, Cardona HP, Zarate A, Vilaro M, Hernández D, Ruiz Orrico G. Group B *Streptococcus* colonization during pregnancy and prevention of early onset of disease. *Medicina.* 2005; 65 (3): 201-206.
- Larsson PG, Stray-Pedersen B, Rytting K, Larsen S. Human lactobacilli as supplementation of clindamycin to patients with bacterial vaginosis reduce the recurrence rate; a 6-month, doubleblind, randomized, placebo-controlled study. *BMC Women's Health.* 2008; 8:3.
- Laverty G, Gorman SP, Gilmore BF. The potential of antimicrobial peptides as biocides. *Int J Mol Sci.* 2011; 12(10): 6566-96.
- Leach JD. Evolutionary perspective on dietary intake of fibre and colorectal cancer. *Eur J Clin Nutr* 2007; 61(1):140-2.
- Lebeer S, Vanderleyden J and De Keersmaecker SC. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8: 171–184.
- Lebeer S, Vanderleyden J, and De Keersmaecker SCJ. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *MMBR.* 2008; 72(4): 728-764.

- Lee BK, Song YR, Kim MY, Yang JH, Shin JH, Seo YS, Oh KY, Yoon HR, Pai SY, Foxman B, Ki M. Epidemiology of group B *Streptococcus* in Korean pregnant women. *Epidemiol Infect.* 2010; 138: 292-298.
- Lee H, and Kim HY. Lantibiotics, class I bacteriocins from the genus *Bacillus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2011; 21: 229-235.
- Le Monnier A, Join-Lambert OF, Jaubert F, Berche P and Kayal S. Invasion of the Placenta during Murine Listeriosis. *Infect. Immun.* 2006; 74(1): 663–672.
- Lepargneur JP, Rousseau V. Protective Role of the Doderleïn flora. *J Gynecol Obstet Biol Reprod.* 2002; 31(5): 485-94.
- Lewis DA. The Gonococcus fights back: is this time a knock out? *Sex Transm Infect.* 2010; 86(6): 415-21.
- Ley Nacional Nº 26369. Publicada en el Boletín Oficial de la República Argentina, 7 de Mayo de 2008. <http://www.boletinoficial.gov.ar/Inicio/index.castle?s=1&fea=07/05/2008>
- Li J, McCormick J, Bocking A, and Reid G. Importance of Vaginal Microbes in Reproductive Health. *Rep Sciences.* 2012; 19(3): 235-242.
- Lilly DM, Stillwell RH. 1965. Probiotics: growth promoting substances produced by microorganisms. *Science.* 147:747–748.
- Lima ET, Andreatti Filho RL, Okamoto AS, Noujaim JC, Barros MR, Crocci AJ. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. *Can J Vet Res.* 2007; 71: 103-107.
- Lin HC, Hsu CH, Chen HL, Chung MY, Hsu JF, Lien RI, Tsao LY, Chen CH, Su BH. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight preterm infants: a multicenter, randomized, controlled trial. *Pediatrics* 2008; 122:693-700.
- Lin JS, Chiu YH, Lin NT, Chu CH, Huang KC, Liao KW, Peng KC. Different effects of probiotic species/strains on infections in preschool children: a double-blind, randomized, controlled study. *Vaccine.* 2009; 27: 1073–1079.
- Linhares JJ, Cavalcante Neto PG, Vasconcelos JL, Saraiva Tde V, Ribeiro AM, Siqueira TM, Rocha FR. Prevalence of the colonization by *Streptococcus agalactiae* in pregnant women from a maternity in Ceará, Brazil, correlating with perinatal outcomes. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2011; 33(12):395-400.
- Liong MT. Roles of Probiotics and Prebiotics in Colon Cancer Prevention; Postulated Mechanisms and *In-vivo* Evidence. *Int J Mol Sci.* 2008, 9: 854-863. DOI: 10.3390/ijms9050854.
- Llewellyn-Jones D, Oats J, Abraham S. Llewellyn-Jones fundamentals of obstetrics and gynaecology. 8th edition. Edinburgh; New York: Mosby; 2004.
- Lohans CT and Vederas JC. Development of Class IIa Bacteriocins as Therapeutic Agents. *International Journal of Microbiology.* 2012; 13 pages. doi:10.1155/2012/386410.
- Loo JV, Clune Y, Bennett M and Collins JK. The SYNCAN project: goals, setup, first results and settings of the human intervention study. *British Journal of Nutrition.* 2005; 93: S91-S98 doi:10.1079/BJN20041353.

- Lopardo H Antimicrobial resistance in b-hemolytic streptococci in Argentina. In: Mendez-Vilas A (ed) Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology. 2007; 794–798.
- López García A, Ruiz Tagle A, Rodríguez Pérez R, Mauleón Montero A, Rivera Tapia JA. Vaginal colonization with *Streptococcus agalactiae* in women with cervical dysplasia. *Enf Inf Microbiol*. 2012; 32(2): 61-68.
- Lopez N, Oscariz JC, Sesma B. Control de propagación de *Salmonella* spp. mediante la producción por otros microorganismos de bacteriocinas inhibitoras. *Biotechnology Appl Biochem* 2001; 21(3):340-346.
- Luoto R, Laitinen K, Nermes M, Isolauri E. Impact of maternal probiotic-supplemented dietary counselling on pregnancy outcome and prenatal and postnatal growth: a double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr*. 2010; 103(12): 1792-9.
- Lye H. S., Rahmat-Ali G. R., and Liang M. T. Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*. 2010; 20(3): 169–175.
- Ma B, Forney LJ, and Ravel J. Vaginal Microbiome: Rethinking Health and Disease. *Annu. Rev. Microbiol*. 2012; 66:371–89.
- Mabey D. Epidemiology of STIs: worldwide. *Am J Med*. 2010; 38: 216-9.
- Mack DR, Ahrne S, Hyde L, Wei S, Hollingsworth MA. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells *in vitro*. *Gut*. 2003; 52(6), 827–833.
- MacPhee RA, Hummelen R, Bisanz JE, Miller WL, Reid G. Probiotic strategies for the treatment and prevention of bacterial vaginosis. *Expert Opin Pharmacother*. 2010; 11(18): 2985-95.
- Madani TA. Sexually transmitted infections in Saudi Arabia. *BMC Infect Dis*. 2006; 6:3.
- Maggi L, Jonquera R. Bacterias de importancia médica. *Infect. Genitour*. 2006. Cap 14.1:229-34.
- Maidak BL, Cole JR, Lilburn TG, Parker CT, Saxman PR, Farris RJ, Garrity GM, Olsen GJ, Schmidt TM, and Tiedje JM. The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res*. 2001; 29:173-174.
- Maldonado Galdeano C, Moreno de LeBlanc A, Vinderola G, Bibas Bonet ME, and Perdígón G. Proposed Model: Mechanisms of Immunomodulation Induced by Probiotic Bacteria. *CVI*. 2007, 14(5): 485–492.
- Mamede AC, Pires AS, Abrantes AM, Tavares SD, Gonçalves AC, Casalta-Lopes JE, Sarmiento-Ribeiro AB, Maia JM, Botelho MF. Cytotoxicity of Ascorbic Acid in a Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line (WiDr): *In Vitro* and *In Vivo* Studies. *Nutr Cancer*. 2012; DOI:10.1080/01635581.2012.713539.
- Manning SD, Schaeffer KE, Springman AC, Lehotzky E, Lewis MA, Ouellette LM, Wu G, Moorer GM, Whittam TS, Davies HD: Genetic diversity and antimicrobial resistance in group B *Streptococcus* colonizing young, nonpregnant women. *Clin Infect Dis*. 2008; 47(3): 388-390.

- Maqueda, M., A. Galvez, M. M. Bueno, M. J. Sanchez-Barrena, C. Gonzalez, A. Albert, M. Rico, and E. Valdivia. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2004; 5: 399–416.
- Marquina D, Santos A. Probioticos, prebioticos y salud. *SEM Actualidad.* 2001; 32:24-27.
- Martín R and Suárez JE. Biosynthesis and Degradation of H₂O₂ by Vaginal Lactobacilli. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76(2): 400–405.
- Martín R, Soberón N, Vázquez F, Suárez JE. Vaginal microbiota: composition, protective role, associated pathologies, and therapeutic perspectives. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008; 26(3):160-7.
- Martinez RC, Franceschini SA, Patta MC, Quintana SM, Nunes AC, Moreira JL, et al. Analysis of vaginal lactobacilli from healthy and infected Brazilian women. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74:4539–42.
- Martinez RCR, Franceschini SA, Patta MC, Quintana SM, Gomes BC, De Martinis ECP, Reid G Improved cure of bacterial vaginosis with single dose of tinidazole (2 g), *Lactobacillus rhamnosus* GR-1, and *Lactobacillus reuteri* RC-14: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Can J Microbiol.* 2009; 55:133–138.
- Martin-Platero AM, Valdivia E, Ruiz-Rodriguez M, Soler JJ, Martin-Vivaldi M, Maqueda M., and Martinez-Bueno M. Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72:4245–4249.
- Masatoshi Tanaka. Emergence of multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains circulating worldwide. *International Journal of Urology* (2012) 19, 98–99.
- Mastromarino P, Brigidi P, Macchia S, et al. Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets. *J Appl Microbiol.* 2002; 93:884–893.
- Matsubara K, Yamamoto G: Invasive group B streptococcal infections in a tertiary care hospital between 1998 and 2007 in Japan. *Int J Infect Dis.* 2009; 13: 679-84.
- Mattar AF, Teitelbaum DH, Drongowski RA, Yongyi F, Harmon CM, Coran AG: Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model. *Pediatr Surg Int.* 2002; 18(7), 586–590.
- Matthews RAJ. Medical progress depends on animal models – doesn't it? *J R Soc Med.* 2008; 101: 95–98. DOI 10.1258/jrsm.2007.070164.
- Mattia A and Merker R. Regulation of Probiotic Substances as Ingredients in Foods: Premarket Approval or “Generally Recognized as Safe” Notification. *Clin Infect Dis.* 2008; 46(2): S115–8.

- Mavenyengwa RT, Moyo SR, Nordbø SA. *Streptococcus agalactiae* colonization and correlation with HIV-1 and HBV seroprevalence in pregnant women from Zimbabwe. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010; 150(1): 34-8.
- Mélaçom D and Grenier D. Production and properties of bacteriocina-like inhibitory substances from the swine pathogen *Streptococcus suis* serotype 2. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(8): 4482-4488.
- Menard JP. Antibacterial treatment of bacterial vaginosis: Current and emerging therapies. *Int J of Women's Health* . 2011; 3 (1): 295-305.
- Méndez EA, ST Morano, Mollerach AS, Mendosa MA, Ahumada C, Pagano I, Oviedo C, Galarza P. Vigilancia de la resistencia de *Neisseria gonorrhoeae* en un hospital de la provincia de Santa Fe, Argentina: 1997-2004. *Rev. Argent Microbiol.* 2008; 40: 173-179.
- Metchnikoff E. Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: Chalmers Mitchell P, ed. *The prolongation of life: optimistic studies.* London: Heinemann, 1907; 161–183.
- Meysick, K. C., and Garber, G. E. Interactions between *Trichomonas vaginalis* and Vaginal Flora in a Mouse Model. *J. Parasitol.* 1992; 78: 157-160.
- Mijac VD, Dukic SV, Opavski NZ, Dukic MK, Ranin LT. Hydrogen peroxide producing lactobacilli in women with vaginal infections. *Eur L Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006; 129(1):69-76.
- Mikelsaar M, Mändar R, Sepp E, and Annuk H. Human Lactic Acid Microflora and Its Role in the Welfare of the Host. In Salminen S, von Wright A, Ouwehand A. *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects,* 2004. Marcel Dekker, Inc. New York, pp453-506.
- Miller K. Diagnosis and Treatment of *Neisseria gonorrhoeae* Infections. *American Family Physician.* 2006; 76 (10): 1779-84.
- Minardi D, d'Anzeo G, Cantoro D, Conti A, Muzzonigro G. Urinary tract infections in women: etiology and treatment options. *Int J Gen Med.* 2011; 4: 333–343.
- Mlalazi M, Winslow AR, Beaubrun JJG, Eribo BE. Occurrence of Pediocin PA-1/AcH-Like Bacteriocin in Native Non-starter *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* from retail Cheddar cheese. *Internet J Food Safety.* 2011; 13: 325-331.
- Moayyedi P, Ford AC, Talley NJ, Cremonini F, Foxx-Orenstein AE, Brandt LJ, Quigley EMM. The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut.* 2010; 59:325–32.
- Mohankumar A. and Murugalatha N. Characterization and Antibacterial Activity of Bacteriocin Producing *Lactobacillus* Isolated from Raw Cattle Milk Sample. *IJB.* 2011; 3(3): 128-143.
- Montalbán-López M, Sánchez-Hidalgo M, Valdivia E, Martínez-Bueno M, Maqueda M. Are bacteriocins underexploited? Novel applications for old antimicrobials. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011; 12(8): 1205-20.

- Montalbán-López M, Sánchez-Hidalgo M, Cebrián R, and Maqueda M. Discovering the Bacterial Circular Proteins: Bacteriocins, Cyanobactins, and Pilins. *JBC*. 2012; 287(32): 27007–27013.
- Morency H, Mota-Meira M, LaPointe G, Lacroix C, and Lavoie MC. Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. *Can J Microbiol*. 2001; 47(4): 322–331.
- Mota Meira M, Morency H and Lavoie M. *In vivo* activity of mutacin B-Nyy266. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56: 869-871.
- Mota-Meira M, LaPointe G, Lacroix C, and Lavoie MC. Mics of mutacin B-Ny266, nisin A, Vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44(1): 24-29.
- Mount DW. (2004). *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*. CSHL Press, 2nd edition.
- MSN/DNMI (Ministerio Salud de la Nación y Dirección Nacional de Maternidad e Infancia. Guía de Prevención y Tratamiento de las Infecciones Congénitas y Perinatales. 2010. http://www.msal.gov.ar/promin/archivos/htm/perin_guias.htm
- Msuya SE, Uriyo J, Hussain A, Mbizvo EM, Jeansson S, Sam NE and Stray-Pedersen B. Prevalence of sexually transmitted infections among pregnant women with known HIV status in northern Tanzania. *Reproductive Health*. 2009; 6:4. doi:10.1186/1742-4755-6-4.
- Muench DF, Kuch DJ, Wu H, Begum AA, Veit SJ, Pelletier ME, Soler-García AA, Jerse AE H₂O₂-producing lactobacilli inhibit gonococci in vitro but not during experimental genital tract infection. *J Infect Dis*. 2009; 199:1369–1378.
- Mukherjee S, Das P, and Sen R. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnol*. 2006; 24 (11):509–515.
- Muñoz JA, Chenoll E, Casinos B, Bataller E, Ramón D, Genovés S, Montava R, Ribes JM, Buesa J, Fàbrega J, Rivero M. Novel probiotic *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 strain active against rotavirus infections. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77(24):8775-83
- Myhre R, Brantsæter AL, Myking S, Gjessing HK, Sengpiel V, Meltzer HM, Haugen M, and Jacobsson B. Intake of probiotic food and risk of spontaneous preterm delivery. *Am J Clin Nutr* 2011; 93: 151–7.
- Nagano N, Nagano Y, Toyama M, Kimura K, Tamura T, Shibayama K, Arakawa Y. Nosocomial spread of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility belonging to clonal complex 1. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67(4): 849-56.
- Nagao J, Shioya K, Harada Y, Okuda K, Zendo T, Nakayama J, Sonomoto K. Engineering unusual amino acids into peptides using lantibiotic synthetase. *Methods Mol Biol*. 2011; 705: 225-36.
- Nagpal R., Yadav H., Puniya A. K., Singh K., Jain S., and Marotta F. Potential of probiotics and prebiotics for symbiotic functional dairy foods. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*. 2007; 2: 75–84.

- Nandyal RR. Update on group B streptococcal infections: perinatal and neonatal periods. *J Perinat Neonatal Nurs.* 2008; 22(3):230-7.
- Narayan SS, Jalgaonkar S, Shahani S, Kulkarni VN. Probiotics: Current trends in the treatment of diarrhea. *Hong Kong Med Journal.* 2010; 16(3): 213-218.
- Nes IF, Diep DB, and Holo H. Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Bacteriol.* 2007; 189(4): 1189–1198.
- Nes IF, Diep DB, Havarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V, and Holo H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1996; 70: 113–128.
- Netz DJ, Sahl HG, Marcelino R, dos Santos Nascimento J, de Oliveira SS, Soares MB, do Carmo de Freire Bastos M. Molecular characterisation of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. *J Mol Biol.* 2001; 311(5): 939-49.
- NHPD (Natural Health Products Directorate). Evidence for safety and efficacy of finished natural health products, Natural Health Products Directorate, Canada. 2006, ISBN 978-0-662-44736-8. www.healthcanada.gc.ca/nhp
- Nikolaitchouk N. The female genital tract microbiota: Composition, relation to innate immune factors, and effects of contraceptives. University of Gothenburg, Sweden. 2009. ISBN 978-91-628-7798-9.
- Nilsen T, Nes IF, Holo H. Enterolysin A, a cell wall degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69: 2975–2984.
- Nishie M, Nagao J, Sonomoto K. Antibacterial peptides "bacteriocins": an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci.* 2012; 17(1): 1-16.
- Nissen-Meyer J, Oppegård C, Rogne P, Haugen HS, Kristiansen PE. Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 2010; 2: 52–60.
- Nissen-Meyer J, Rogne P, Oppegård C, Haugen HS, Kristiansen PE. Structure-function relationships of the non-lanthionine containing peptide (class II) bacteriocins produced by Gram positive bacteria. *Curr Pharm Biotechnol.* 2009; 10: 19-37.
- Noguchi K, Tsukumi K, Urano T. Qualitative and quantitative differences in normal vaginal flora of conventionally reared mice, rats, hamsters, rabbits, and dogs. *Comp Med.* 2003; 53(4):404-12.
- Nunez M, Tomillo J, Gaya P, Medina M. Bacteriocin quantification by the critical dilution method: comparison of arbitrary units with diameter and area of the zone of growth inhibition. *Milchwissenschaft.* 1996; 51: 7-10.
- Nworu CS and Esimone CO. Comparative evaluation of three in vitro techniques in the interaction of ampicillin and ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Trop J Pharm Res.* 2006; 5(2): 605-611.
- O'Connor EB, Cotter PD, O'Connor P, O'Sullivan O, Tagg JR, Ross RP, and Hill Colin. Relatedness between the two-component lantibiotics lacticin 3147 and staphylococcin C55 based on structure, genetics and biological activity. *BMC Microbiology.* 2007; 7:24 Doi:10.1186/1471-2180-7-24.

- O'Mahony L, Feeney M, O'Halloran S, Murphy L, Kiely B, Fitzgibbon J, Lee G, O'Sullivan G, Shanahan F & Collins JK. Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice. *Aliment Pharmacol Ther.* 2001; 15: 219–225.
- O'Rourke ALD, Simmonds RS, Gargis AS., and Sloan GL. Prevalence and Acquisition of the Genes for Zoocin A and Zoocin A Resistance in *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *J Mol Evol.* 2009; 68(5): 498–505.
- O'Sullivan O, O'Callaghan J, Sangrador-Vegas A, McAuliffe O, Slattery L, Kaleta P, Callanan M, Fitzgerald GF, Ross RP & Beresford T. Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set. *BMC Microbiol.* 2009; 5: 9–50.
- Oakley BB, Fiedler TL, Marrazzo JM, and Fredricks DN, Diversity of human vaginal bacterial communities and associations with clinically defined bacterial vaginosis. *App Environ Microbiol.* 2008; 74(15), 4898–4909.
- Ocaña VS, Pesce de Ruiz Holgado A, Nader Macías ME. Characterization of a Bacteriocin-like substance produced by a vaginal *Lactobacillus salivarius* strain. *App Environ Microbiol.* 1999; 65(12):5631-5635.
- Ohara T, Yoshino K, Kitajima M. Possibility of preventing colorectal carcinogenesis with probiotics. *Hepatogastroenterology.* 2010; 57(104):1411-5.
- Ohashi Y, Ushida K: Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Anim Sci J.* 2009; 80:361-371.
- Ojetti V, Bruno G, Ainora ME, Gigante G, Rizzo G, Roccarina D, and Gasbarrini A. Impact of *Lactobacillus reuteri* Supplementation on Anti-*Helicobacter pylori* Levofloxacin-Based Second-Line Therapy. *Gastroenterol Res Pract.* 2012; 6 pages doi:10.1155/2012/740381.
- Oliveira IC, de Matos MC, Pinto TA, Ferreira Carvalho BT, Benchetrit LC, Whiting AA, Bohnsack JF, and Figueiredo AM. Genetic relatedness between group B streptococci originating from bovine mastitis and human group B streptococci type V cluster displaying an identical pulsed field gel electrophoresis pattern. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12: 887-893.
- Oozeer R, Leplingard A, Mater DD, Mogenet A, Michelin R, Seksek I, Marteau P, Doré J, Bresson JL, and Corthier G. Survival of *Lactobacillus casei* in the human digestive tract after consumption of fermented milk. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72: 5615–5617.
- Oppegård C, Rogne P, Emanuelsen L, Kristiansen PE, Fimland G, Nissen-Meyer J. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2007; 13: 210–219.
- Oppegård C, Rogne P, Kristiansen PE and Nissen-Meyer J. Structure analysis of the two-peptide bacteriocin lactococcin G by introducing D-amino acid residues. *Microbiology.* 2010; 156: 1883–1889.
- OPS/OMS. Salud en las Américas. Panorama regional y perfiles de país. Publicación Científica y Técnica No. 636. Washington, DC: OPS, 2012.pp 228 ISBN 978-92-75-31691-7.
- Osman N, Adawi D, Ahrne FS, Jeppson B, Molin G. Modulation of the effect of dextran sulfate sodium induced acute colitis by the administration of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Digest Dis Sci.* 2004; 49(2): 320-327.

- Ouwehand and Vesterlund S. 2004. Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. In Lactic acid Bacteria. Microbiological and functional aspects. 3th edition, Ed by Seppo Salminen, Atte von Wright, Arthur Ouwehand. Editorial Marcel Dekker, Ink, 2004; Cap. 11.
- Oviedo P, Laczeski M, Pegels E, Quiroga M, Vergara M. Serotipificación, distribución y susceptibilidad a macrólidos en *Streptococcus agalactiae*: primeros hallazgos en Misiones de serotipo IX. Rev. Argent Microbiol. 2012; 44(1): 18-19.
- Özdemir GB, Oryaşın E, Bıyık HH, Özteber M, and Bozdoğan B. Phenotypic and Genotypic Characterization of Bacteriocins in Enterococcal Isolates of Different Sources. Indian J Microbiol. 2011; 51(2): 182–187.
- Ozdemir O. Any benefits of probiotics in allergic disorders? Allergy Astma Proc. 2010; 31(2):103-11.
- Packiam M, Veit SJ, Anderson DJ, Ingalls RR, Jerse AE. Mouse strain-dependent differences in susceptibility to *Neisseria gonorrhoeae* infection and induction of innate immune responses. Infect Immun. 2010; 78(1): 433-40.
- Pagano I, Oviedo C, Reggiane S, Galarza P, Provsag AR. Sensibilidad a las cefalosporinas de espectro extendido entre aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* en Argentina. Rev Arg Microbiol. 2012; 44(1): 63-64.
- Pajaro MC, Barberis IL. Determinación de la sensibilidad a diferentes antimicrobianos en *Neisseria gonorrhoeae*: comparación de 2 métodos. Act. Bioq. Clin Latinoamer. 1998; XXXII(2): 253-6.
- Pamer EG. Immune responses to commensal and environmental microbes. Nature Immunol. 2007; 8, 1173–1178.
- Panda B, Iruretagoyena I, Stiller R, Panda A. Antibiotic resistance and penicillin tolerance in anovaginal group B streptococci. J Matern Fetal Neonatal Med 2009; 22(2): 111-4.
- Papagianni M, Anastasiadou S. Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. Microbiol. Cell Fact. 2009; 8:1-16.
- Papagianni M, Avramidis N, Filioussis G, Dasiou D and Ambrosiadis I. Determination of bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates: assessing the factor "indicator microorganism". Microbiol Cell Factories. 2006. 5:30. Doi: 10.1186/1475-2859-5-30.
- Papagianni M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. Biotechnol Adv. 2003; 21: 465-499.
- Pascual L, Barberis L. 2011. Prevention strategy of urogenital by using Lactobacilli with probiotic properties, Urinary tract infections, Dr. Peter Tenke (Ed.). ISBN 978-953-307-757-4, InTech. <http://www.intechopen.com/books/urinary-tract-infections/prevention-strategy-of-urogenitalinfections-by-using-lactobacilli-with-probiotic-properties>
- Pascual L, Ruiz F, Giordano W, Barberis IL. Vaginal colonization and activity of probiotic bacterium *Lactobacillus fermentum* L23 in a murine model of vaginal tract infection. J Med Microbiol. 2010; 59(3): 360-364.

- Pascual LM, Daniele M, Giordano W, Pájaro MC, and Barberis IL. Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Curr. Microbiol.* 2008a; 56:397-402.
- Pascual LM, Daniele MB, Pajaro C, Barberis L. *Lactobacillus* species isolated from the vagina; identification, hydrogen peroxide production and nonoxynol-9 resistance. *Contraception.* 2006; 73:78-81.
- Pascual LM, Daniele MB, Ruíz F, Giordano W, Pájaro C and Barberis Lucila. *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from the human vagina. *J Gen Appl Microbiol.* 2008b; 54: 141-148.
- Pascual LM. Bacteriocinogenia en el género *Lactobacillus*: características benéficas de lactobacilos de vagina humana. Tesis Doctoral, 2004, UNRC, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- Patton DL, Cosgrove Sweeney YT, Antonio MA, Rabe LK. *Lactobacillus crispatus* capsules: single-use safety study in the Macaca nemestrina model. *Sex Transm Dis.* 2003; 30:568-570.
- Pei A, Nossa CW, Chokshi P, Blaser MJ, Yang L, Rosmarin DM, Pei Z. Diversity of 23s rRNA genes within individual prokaryotic genomes. *Plos ONE.* 2009; 4: e5437.
- Penders J, Thijs C, van den Brandt PA, Kummeling I, Snijders B, Stelma F, Adams H, van Ree R, Stobberingh, EE. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut.* 2007; 56: 661-7.
- Pérez S, Chavez C, Arriola G, Lanza A, García R, Juárez MJ, Riesco S, Santanatoglia S, Taus M, Valles J, Smayevsky J. Prevalencia de colonización por *Streptococcus agalactiae* en mujeres embarazadas. Federación Bioqca. Pcia Bs. As. 2009. www.fabainforma.com.ar
- Persson, E., S. Berg, H. Bergseng, K. Bergh, R. Valso-Lyng, and B. Trollfors. Antimicrobial susceptibility of invasive group B streptococcal isolates from south-west Sweden 1988-2001. *Scand. J. Infect. Dis.* 2008; 40: 308-313.
- Petersen P, Labthavikul P, Jones C, Bradford P. *In vitro* antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57: 573-576.
- Petti CA. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *CID.* 2007; 44: 1108-1114.
- Pfaff MW, Tichopad A, Prgomet C and Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations *Biotech Lett.* 2005; 26: 509-515.
- PHAC (Public Health Agency of Canada). 2004 Canadian Sexually Transmitted Infections Surveillance Rep. *CCDR.* 2007; 33S1:1-69. ISSN 1188-4169
- PHAC (Public Health Agency of Canada). Report on Sexually Transmitted Infections in Canada: 2008. www.publichealth.gc.ca
- Pham M, Lemberg DA and Day Andrew. Probiotics: sorting the evidence from the myths. *MJA.* 2008; 188(5): 304-308.

- Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, Craig AS, Schaffner W, Zansky SM, Gershman K, Stefonek KR, Albanese BA, Zell ER, Schuchat A, Schrag SJ; Active Bacterial Core surveillance/Emerging Infections Program Network. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA*. 2008; 299(17): 2056-65.
- Pineiro M and Stanton C. Probiotic Bacteria: Legislative Framework—Requirements to Evidence Basis. *J Nutr*. 2007; 137: 850S–853S.
- Pinheiro S, Radhouani H, Coelho C, Gonçalves A, Carvalho E, Carvalho JA, Ruiz-Larrea F, Torres C, Igrejas G, Poeta P. Prevalence and mechanisms of erythromycin resistance in *Streptococcus agalactiae* from healthy pregnant women. *Microb Drug Resist*. 2009; 15(2): 121-4.
- Piper Clare, Casey PG, Hill C, Cotter PD, and Ross RP. The Lantibiotic Lacticin 3147 Prevents Systemic Spread of *Staphylococcus aureus* in a Murine Infection Model. *Int J Microbiol*. 2012; 6 pages. doi:10.1155/2012/806230.
- Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J and Glöckner FO. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*. 2007; 35(21): 7188–7196. doi:10.1093/nar/gkm864.
- Puopolo KM, Madoff LC, and Eichenwald EC. Early-Onset Group B Streptococcal Disease in the Era of Maternal Screening. *Pediatrics*. 2007; 115 (5): 1240-46.
- Purdom PW, Bradford PG, Tamura K & Kumar S. Single column discrepancy and dynamic max-mini optimizations for quickly finding the most parsimonious evolutionary trees. *Bioinformatics*. 2000; 16: 140-151.
- Quinn GP, Keough MJ, editors. *Experimental Design data analysis for biologists*. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 2002; 72-6. ISBN:9780521009768.
- Quirke M and Cullinane A. Recent trends in chlamydial and gonococcal conjunctivitis among neonates and adults in an Irish hospital. *Int J Infect Dis*. 2008; 12, 371—373.
- Quiroga M, Pegels E, Oviedo P, Pereyra E, Vergara M. Antibiotic susceptibility patterns and prevalence of group b *Streptococcus* Isolated from pregnant women in misiones, Argentina. *Bra J Microbiol*. 2008; 39: 245-250.
- Rafter J; Bennett M, Caderni G, Clune Y, Hughes R, Karlsson PC, Klinder A, O’Riordan M, O’Sullivan GC, Pool-Zobel B, Rechkemmer G, Roller M, Rowland I, Salvadori M, Thijs H, Loo JV, Watzl B, Collins JK. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *AJCN*. 2007; 85, 488-496.
- Rahimi R, Nikfar S, Rezaie A, Abdollahi M. A meta-analysis of the benefit of probiotics in maintaining remission of human ulcerative colitis: evidence for preventing of disease relapse and maintenance of remission. *Arch Med Sci*. 2008; 4: 5.
- Rahman M, Kuhn I, Rahman M, Olsson-Liljequist B, and Mollby R. Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility testing of Gram negative fermentative bacteria. *Appl Environment Microbiol*. 2004; 70: 2398-2403.
- Rajagopal L. Understanding the regulation of Group B streptococcal virulence factors. *Future Microbiol*. 2009; 4(2): 201–221.

- Rajaram G, Manivasagan P, Thilagavathi B, Saravanakumar A. Purification and Characterization of a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus lactis* Isolated from Marine Environment. *Adv J Food Sci Technol*. 2010; 2(2): 138-144.
- Rasch M, Knöchel S. Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-I and bavaricin A. *Lett Appl Microbiol*. 1998; 27: 275-278.
- Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R, Russell J, Tacket CO, Brotman RM, Davis CC, Ault K, Peralta L, Forney LJ. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108 Suppl 1:4680-7.
- Rea MC, Clayton E, O'Connor PM, Shanahan F, Kiely B, Ross RP, Hill C. Antimicrobial activity of lacticin 3,147 against clinical *Clostridium difficile* strains. *J Med Microbiol*. 2007; 56(Pt 7):940-6.
- Reddy KVR, Aranha C, Gupta SM, and Yedery RD. Evaluation of antimicrobial peptide nisin as a safe vaginal contraceptive agent in rabbit: *in vitro* and *in vivo* studies. *Reproduction*. 2004; 128:117-126.
- Reid G, Anukam K, Koyama T. Probiotic products in Canada with clinical evidence: What can gastroenterologists recommend? *Can J Gastroenterol*. 2008; 22(2):169-175.
- Reid G, Bocking A. The potential for probiotics to prevent bacterial vaginosis and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol*. 2003; 189(4):1202-1208.
- Reid G, Bruce AW, Fraser N, Heinemann C, Owen J, Henning B. Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2001; 30(1):49-52.
- Reid G, Dols J, Miller W. Targeting the vaginal microbiota with probiotics as a means to counteract infections. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2009; 12(6): 583-7.
- Reid G, McGroarty JA, Angotti R, Cook RL. Lactobacilli inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Can J Microbiol*. 1988; 34(3):344-51.
- Reid G, Younes JA, Van der Mei HC, Gloor GB, Knight R, Busscher HJ. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 9: 27-38.
- Reid G. Probiotic and probiotic applications for vaginal health. *JAOAC Int*. 2012; 95(1): 31-4.
- Reid G. Safe and efficacious probiotics: what are they? *Trends Microbiol*. 2006; 14 (8): 348-352.
- Reyna-Figueroa J, Ortiz-Ibarra FJ, Pérez-Antonio B, Navarro-Godínez S, Casanova-Román G, García-Carrillo LE. Maternal chemoprophylaxis against group B *Streptococcus* colonization. The consequences of not adopting the international recommendation. *Salud Publica Mex*. 2008; 50:155-161.
- Richter S. Homologies in phylogenetic analyses – concept and tests. *Theory in Biosciences*. 2005; 124(2):105-120.
- Riley MA, and Gordon DM. The Ecological Role of Bacteriocins in Bacterial Cooperation. *Trends Microbiol*. 1999; 7: 129-133.

- Riley MA, Wertz JE. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu Rev Microbiol.* 2002; 56:117-137.
- Rinaudo CD, Rosini R, Galeotti CL, Berti F, Necchi F, Reguzzi V, Ghezzi C, Telford JL, Grandi G, Maione D. Specific Involvement of Pilus Type 2a in Biofilm Formation in Group B *Streptococcus*. *Plos One.* 2010; 5(2): e9216.
- Rink R, Arkema-Meter A, Baudoin I, Post E, Kuipers A, Nelemans SA, Akanbi MH, Moll GN. To protect peptide pharmaceuticals against peptidases. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2010; 61:210-218.
- Roberfroid MB. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:1660-1664S.
- Rocca PL, Biggin PC and Tieleman DP. Stimulation studies of the interaction of antimicrobial peptides and lipid bilayers. *Biochem & Biophys Acta.* 1999; 1462:185-200.
- Rocchetti TT, Marconi C, Rall VL, Borges VT, Corrente JE, da Silva MG. Group B streptococci colonization in pregnant women: risk factors and evaluation of the vaginal flora. *Arch Gynecol Obstet.* 2011; 283: 717-21.
- Rodicio MR, Mendoza MC. Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004; 22(4):238-245.
- Rodrigues LR, Moldes A, Teixeira JA, and Oliveira R. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. *Bioch Eng Jour.* 2006; 28(2):109–116.
- Roessler A, Friedrich U, Vogelsang H, Bauer A, Kaatz M, Hipler UC, Schmidt I, Jahreis G. The immune system in healthy adults and patients with atopic dermatitis seems to be affected differently by a probiotic intervention. *Clin Exp Allergy.* 2008; 38: 93–102.
- Rogne P, Haugen C, Fimland G, Nissen-Meyer J, Kristiansen PE Three-dimensional structure of the two-peptide bacteriocin plantaricin JK. *Peptides.* 2009; 30:1613–1621.
- Rose WA, McGowin CL, Spagnuolo RA, Eaves-Pyles TD, Popov VL, Pyles RB. Commensal Bacteria Modulate Innate Immune Responses of Vaginal Epithelial Cell Multilayer Cultures. *Plos one.* 2012; 7 (3): e32728.
- Ross JJ, Boucher PE, Bhattacharyya SP, Kopecko DJ, Sutkowski EM, Rohan PJ, Chandler DK, Vaillancourt J. Considerations in the development of live biotherapeutic products for clinical use. *Curr Issues Mol Biol.* 2008; 10(1-2):13-6.
- Ross, J. Regulatory Considerations. In *American Society for Microbiology Colloquium Report Probiotic Microbes: The Scientific Basis* (Washington, DC: American Academy of Microbiology). 2006; 8.
- Rowland I, Capurso L, Collins K, Cummings J, Delzenne N, Goulet O, Guarner F, Marteau P and Meie R. Current level of consensus on probiotic science. *Gut Microbes.* 2010; 1:6: 436-439.
- Ruiz F, Gerbaldo G, Asurmendi P, Pascual L, Giordano W and Barberis I. Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens and synergistic interactions between *Lactobacillus* strains. *Curr Microbiol.* 2009; 59: 497-501.

- Ruíz F, Pascual L, Daniele M, Gribaudo L, Pajaro M, Barberis L. Rev. Lactobacilli's bacteriocin interactions on pathogen strains. Rev. Higiene Alimentar Brasil. 2007; 21(150). ISSN 0101-9171.
- Ruíz F, Pascual L, Daniele MB, Barberis L, Pajaro C. Isolation partial, characterization and mode of action of the bacteriocina produced by *Lactobacillus rhamnosus*. Rev Biocell. 2005; 29(2).
- Ruíz FO, Gerbaldo G, García MJ, Giordano W, Pascual L, Barberis IL. Synergistic Effect Between Two Bacteriocin-like Inhibitory Substances Produced by Lactobacilli Strains with Inhibitory Activity for *Streptococcus agalactiae*. Curr Microbiol. 2012; 64:349–356.
- Ruíz FO. Estudio del efecto sinérgico in vitro de las bacteriocinas producidas por las cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus fermentum* sobre microorganismos causales de infecciones urinarias. Tesina de grado para optar al título de Microbiólogo. UNRC, 2005.
- Ryu, JH, Kim SH, Lee HY, Bai JY, Nam YD, Bae JW, Lee DG, Shin SC, Ha EM, Lee WJ. Innate immune homeostasis by the homeobox gene *Caudal* and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. Science. 2008; 319, 777–782.
- Sablon E, Contreras B, and Vandamme E. Antimicrobial peptide of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. Adv Biochem Eng Biotech. Springer-Verlag. 2000; V 68: 21-60.
- Sadeghifard N, Gurtler V, Beer M & Seviour RJ. The mosaic nature of intergenic 16S–23S rRNA spacer regions suggests rRNA operon copy number variation in *Clostridium difficile* strains. Appl Environ Microbiol. 2006; 72: 7311–7323.
- Sadowy Ewa, Matynia B and Hryniewicz W. Population structure, virulence factors and resistance determinants of invasive, non-invasive and colonizing *Streptococcus agalactiae* in Poland. J Antimicrob Chemother. 2010; 65: 1907–1914.
- Saksena S, Goyal S, Raheja G, Singh V, Akhtar M, Nazir TM, Alrefai WA, Gill RK, Dudeja PK. Upregulation of P-glycoprotein by probiotics in intestinal epithelial cells and in the dextran sulfate sodium model of colitis in mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011; 300: 1115–1123.
- Saldanha LG. US Food and Drug Administration Regulations Governing Label Claims for Food Products, Including Probiotics. Clin Infect Dis. 2008; 46(2): 119–21.
- Salvador R, Muller EE, de Freitas JC, Leonhardt JH, Pretto-Giordano LG and Dias JA. Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. Group B in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. Ciência Rural Santa Maria. 2005; 35: 1374-1378.
- Salvatore S, Salvatore S, Cattoni E, Siesto G, Serati M, Sorice P, Torella M. Urinary tract infections in women. Eur J Obstet Gynaecol Reprod Biol. 2011; 156: 131–136.
- Sánchez B, Urdaci MC and Margolles A. Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa–bacteria interactions. Microbiology. 2010; 156: 3232–3242.
- Sánchez, B, Schmitter JM and Urdaci MC. Identification of novel proteins secreted by *Lactobacillus plantarum* that bind to mucin and fibronectin. J Mol Microbiol Biotechnol. 2009; 17, 158–162.

- Sanders ME, Akkermans LMA, Haller D, Hammerman C, Heimbach J, Hörmannspurger G, Huys G, Levy DD, Lutgendorff F, Mack D, Phothirath P, Solano-Aguilar G and Vaughan E. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes*. 2010; 1:3: 164-185.
- Sanders ME. Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. *CID*. 2008; 46: S58-61. DOI: 10.1086/523341.
- Sandoval Z J, Fica C A, Caballero T R. Tratamiento y profilaxis antibiótica de patologías comunes en ginecologíaobstetricia. *Rev Hosp Clín Univ Chile*. 2008; 19: 245 - 69.
- Sang Y and Blecha F. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Anim Health Res Rev*. 2008; 9(2): 227-235.
- Santos SR, and Ochman H. Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins. *Environ. Microbiol*. 2004; 6: 754-759.
- Sass P, Jansen A, Szekat C, Sass V, Sahl HG and Bierbaum G. The lantibiotic mersacidin is a strong inducer of the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology*. 2008, 8:186. doi:10.1186/1471-2180-8-186.
- Sato H, Feix JB. Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biochim Biophys. Acta*. 2006; 1758 1245-1256.
- Savadogo A, Ouattara CAT, Bassole IHN, Traore SA. Bacteriocins and lactic acid bacteria - a minireview. *African Journal of Biotechnology*. 2006; 5 (9): 678-683.
- Saxelin M. Probiotic Formulations and Applications, the Current Probiotics Market, and Changes in the Marketplace: A European Perspective. *Clinical Infectious Diseases*. 2008; 46:S76-9. DOI: 10.1086/523337.
- Scott R. Santos and Howard Ochman. Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins. *Environ Microbiol*. 2004; 6(7): 754-759. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00617.
- SEEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica). Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. 2010.
- SEEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en Gram positivos. 2011a; Cap.39 <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap39.asp>
- SEEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en Gram negatives. 2011b; Cap. 38. ISBN-978-84-615-1530-1.
- Segarra-Newnham M. Probiotics for *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea: Focus on *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces boulardii*. *Ann Pharmacother*. 2007; 41: 1212-1221.
- SEGO (Sociedad Española de Obstetricia y Ginecología), (SEN). Sociedad Española de Neonatología, SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica), SEQ (Sociedad Española de Quimioterapia), SEMFYC (Sociedad Española de

- Medicina Familiar y Comunitaria). Prevención de la infección perinatal por estreptococo del grupo B. Recomendaciones españolas revisadas 2012. Rev Esp Quimioter. 2012; 25(1): 79-88.
- Sengupta Durba, Leontiadou Hari, Mark Alan E., Marrink Siewert-Jan. Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. Biochimica et Biophysica Acta 1778. 2008; 2308–2317.
- Senok AC, Ismaeel AY, and Botta GA, Probiotics: facts and myths. Clin. Microbiol. Infect. 2005; 11:958-966.
- Serafini M, Stanzione A, Foddai S. Functional foods: traditional use and European legislation. Int J Food Sci Nutr. 2012; 63(1): 7-9.
- Servin AL. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS Microbiol Rev. 2004; 28: 405–440.
- Shabayek SA, Abdalla SM, Abouzeid AM. Vaginal carriage and antibiotic susceptibility profile of group B *Streptococcus* during late pregnancy in Ismailia, Egypt. J Infect Public Health. 2009; 2(2): 86-90.
- Shai, Y. 2006. Mechanism of Membrane Permeation and Pore Formation by Antimicrobial Peptides, in Protein-Lipid Interactions: From Membrane Domains to Cellular Networks (ed L. K. Tamm), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG. Chapter 9. doi: 10.1002/3527606769.
- Shand RF, Leyva KJ: Archaeal antimicrobials: an undiscovered country. Archaea: new models for prokaryotic biology Norfolk: Caister AcademicBlum P. 2008; 233-242.
- Shanks N, Greek R, and Greek J. Are animal models predictive for humans. Philosophy, Ethics, and Humanities in Medicine. 2009; 4:2 doi:10.1186/1747-5341-4-2.
- Sharami S. H., Afrakhteh M., and Shakiba M. Urinary tract infections in pregnant women with bacterial vaginosis. J Obstet Gynaecol. 2007; 27(3): 252–254.
- Sharmila V, Joseph NM, Babu TA, Chaturvedula L, Sistla S. Genital tract group B streptococcal colonization in pregnant women: a South Indian perspective. J Infect Dev Ctries. 2011; 5(8): 592-595.
- Sheen TR, Jimenez A, Wang NY, Banerjee A, van Sorge NM, Doran KS. Serine-rich repeat proteins and pili promote *Streptococcus agalactiae* colonization of the vaginal tract. J Bacteriol. 2011; 193(24): 6834-42.
- Shekh RM, Roy U. Biochemical characterization of an anti-Candida factor produced by *Enterococcus faecalis*. BMC Microbiol. 2012; 12(1):132.
- Sherman PM, Ossa JC, and Johnson-Henry K. Unraveling Mechanisms of Action of Probiotics. Nutr Clin Pract. 2009; 24(1): 10-14.
- Shida K, Nanno M. Probiotics and immunology: separating the wheat from the chaff. Trends Immunol 2008; 29: 565-73.
- Shim BS. Current Concepts in Bacterial Sexually Transmitted Diseases. KJU. 2011; 52: 589-597.

- Shin YJ, Ki M, Foxman B. Epidemiology of neonatal sepsis in South Korea. *Pediatr Int*. 2009; 51: 225-232.
- Shingh P, Cameotra SS. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends Biotechnol*. 2004; 22(3): 142-146.
- Shu Q, Gill HS. Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002; 34: 59-64.
- Sieladie DV; Zambou NF, Kaktcham PM, Cresci A and Fonteh F. Probiotic properties of lactobacilli strains isolated from raw cow milk in the western highlands of Cameroon. *Innovative Romanian Food Biotechnology*. 2011; 9: 12-28.
- Sigma Stat Statistical, 2006. SigmaStat versión 3.5, NT & 3.1 SPSS Inc. Chicago, US.
- Silva de Ruíz S, Rey MR, Pesce de Ruiz Holgado A, Nader Macias ME. Experimental administration of estradiol on the colonization of *Lactobacillus fermentum* and *Escherichia coli* in the urogenital tract of mice. *Biol Pharm Bull*. 2001; 24(2): 127-134.
- Simmons MP. Independence of alignment and tree search. *Mol Phylogenet Evol*. 2004; 31(3): 874-9.
- Sit CS, Vederas JC. Approaches to the discovery of new antibacterial agents based on bacteriocins. *Biochem Cell Biol*. 2008; 86(2):116-23.
- Sleator RD, Hill C a. Battle of the bugs. *Science*. 2008a, 321:1294-1295.
- Sleator RD, Hill C b. New frontiers in probiotic research. *Lett Appl Microbiol*. 2008b, 46:143147.
- Sleator RD. Probiotic therapy - recruiting old friends to fight new foes. *Gut Pathogens*. 2010; 2:5. doi: 10.1186/1757-4749-2-5.
- Smith L and Hillman JD. Therapeutic Potential of Type A (I) Lantibiotics, a Group of Cationic Peptide Antibiotics. *Curr Opin Microbiol*. 2008; 11(5): 401-408.
- SNVS (Sistema Nacional de vigilancia de la Salud). Boletín Epidemiológico Anual. 2008 Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación Argentina. Cap. 5: Transmisión Sexual. ISSN 1851-295X. http://msal.gov.ar/html/site/sala_situacion/boletines_ultimos.asp
- SNVS (Sistema Nacional de vigilancia de la Salud). Boletín Epidemiológico, Vigilancia de supuración genital gonocócica. 2012 Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación Argentina.
- Snydman DR. The Safety of Probiotics. *Clin Infect Dis*. 2008; 46:S104-11.
- Soll DR, Lockhart SR, Pujol C. 2003. Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (ED). *Manual of Clinical Microbiology*. 8ª Edición. American Society for Microbiology. Washington DC. pp 139-161.
- Sontakke S, Cadenas MB, Maggi RG, Diniz PP, Breitschwerdt EB. Use of broad range 16S rDNA PCR in clinical microbiology. *J Microbiol Methods*. 2009; 76: 217-225.

- Sparling PF. 2008. Biology of *Neisseria gonorrhoeae*, p. 607–626. In K. K. Holmes, P. F. Sparling, W. E. Stamm, P. Piot, J. N. Wasserheit, L. Corey, M. S. Cohen, and D. H. Watts (ed.), *Sexually transmitted diseases*, 4th ed. McGraw-Hill, New York, NY.
- Spinler JK, Taweechoitipatr M, Rognerud CL, Ou CN, Tumwasorn S, and Versalovic. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe*. 2008; 14(3): 166-171.
- Spurbeck RR and Arvidson CG. Lactobacilli at the front line of defense against vaginally acquired infections. *Future Microbiol*. 2011. 6(5): 567–582.
- Spurbeck RR and Arvidson CG. *Lactobacillus jensenii* surface associated proteins inhibit *Neisseria gonorrhoeae* adherence to epithelial cells. *Infect Immun*. 2010; 78(7): 3103–3111.
- Spurbeck RR, and Arvidson CG. Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* epithelial cell interactions by vaginal *Lactobacillus* species. *Infect. Immun*. 2008; 76: 3124-3130.
- Srinivasan S, Liu C, Mitchell CM, Fiedler TL, Thomas KK, Agnew KJ, et al. Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. *PLoS ONE* 2010; 5:e10197.
- Stapleton AE, Au-Yeung M, Hooton TM, Fredricks DN, Roberts PL, Czaja CA, Yarova-Yarovaya Y, Fiedler T, Cox M, Stamm WE. Randomized, placebo-controlled phase 2 trial of a *Lactobacillus crispatus* probiotic given intravaginally for prevention of recurrent urinary tract infection. *Clin Infect Dis*. 2011; 52(10): 1212-7.
- Stevens A, Lowe JS: *Human histology*. 3rd edition. Philadelphia, Elsevier/Mosby; 2005.
- Stoeker L, Nordone S, Gunderson S, Zhang L, Kajikawa A, LaVoy A, Miller M, Klaenhammer TR, Dean GA. Assessment of *Lactobacillus gasseri* as a candidate oral vaccine vector. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18(11): 1834-44.
- Stoll BJ, Hansen NI, Sánchez PJ, Faix RG, Poindexter BB, Van Meurs KP, Bizzarro MJ, Goldberg RN, Frantz ID 3rd, Hale EC, Shankaran S, Kennedy K, Carlo WA, Watterberg KL, Bell EF, Walsh MC, Schibler K, Laptook AR, Shane AL, Schrag SJ, Das A, Higgins RD; Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and *E. coli* disease continues. *Pediatrics*. 2011; 127(5):817-26.
- Stubbings WJ, Bostock JM, Ingham E, and Chopra I. Assessment of a microplate method for determining the post-antibiotic effect in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 54:139-143.
- Sunanliganon C, Thong-Ngam D, Tumwasorn S, Klaikeaw N. *Lactobacillus plantarum* B7 inhibits *Helicobacter pylori* growth and attenuates gastric inflammation. *World J Gastroenterol*. 2012; 18(20): 2472-2480.
- Sutcliffe S, Neace C, Magnuson NS, Reeves R, Alderete JF. Trichomonosis, a Common Curable STI, and Prostate Carcinogenesis-A Proposed Molecular Mechanism. *PLoS Pathogens*. 2012; 8(8): e1002801.
- Sutich E, Notario R, Salgado C, Montedoro H, Dubois A, Castelli M *et al*. Análisis de factores de riesgo en 7 casos de infección neonatal por *Streptococcus agalactiae*. XVII Congreso

- Latinoamericano de Microbiología y X Congreso Argentino de Microbiología. 2004. Resumen 218, Buenos Aires, Argentina.
- Sutton A. Product Development of Probiotics as Biological Drugs. *Clin Infect Dis.* 2008; 46(2): S128–32
- Sutyak KE, Wirawan RE, Aroutcheva AA, and Chikindas ML. Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilosin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. *J Appl Microbiol.* 2008; 104(4): 1067-1074.
- Svetoch EA and Stern NJ. Bacteriocins to control *Campylobacter* spp. in poultry—A review. *Poultry Science* 2010; 89 :1763–1768.
- Swe PM, Heng NCK, Cook GM, Tagg JR, and Jack RW. Identification of DysI, the Immunity Factor of the Streptococcal Bacteriocin Dysgalactacin. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76(23): 7885–7889.
- Swe PM, Cook GM, Tagg JR, Jack RW. Mode of action of dysgalactacin: a large heat-labile bacteriocin. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63(4):679-86.
- Swofford DL. 2001. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony* (*and other Methods). Version 4.0b8. Sinauer, Sunderland, MA.
- Szajewska H, Ruszczyński M, Gieruszczak-Białek D. *Lactobacillus* GG for treating acute diarrhea in children. A meta-analysis of randomized controlled trials. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007a; 25:177–84.
- Szajewska H, Skorka A, Dylag M. Meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* for treating acute diarrhoea in children. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007b; 25:257–64.
- Szwabowicz K, Panasiuk A. Carrier-state of group B *Streptococcus* in pregnant women—performance standards. *Przegl Epidemiol.* 2012; 66(1): 33-8.
- Tabasco R, García-Cayueta T, Peláez C and Requena T. *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 2009; 132, 109–116.
- Taheri H, Tabandeh F, Moravej H, Zaghari M, Shivazad M and Shariati P. Potential probiotic of *Lactobacillus johnsonii* LT171 for chicken nutrition. *AJB.* 2009; 8(21): 5833-5837.
- Takahashi K & Nei M. Efficiencies of fast algorithms of phylogenetic inference under the criteria of maximum parsimony, minimum evolution, and maximum likelihood when a large number of sequences are used. *Mol Biol Evol.* 2000; 17: 1251-1258.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. 2011. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using *MEGA* version 5.05.
- Tanaka M. Emergence of multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains circulating worldwide. *Int J Urol.* 2012; 19: 98–99.
- Tapsall JW, Limnios EA, Murphy DM on behalf of the Australian Gonococcal Surveillance Programme. An analysis of trends in antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Australia, 1997–2006. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61(1):150–155.

- Tapsall JW. Implications of current recommendations for third-generation cephalosporin use in the WHO Western Pacific region following the emergence of multi-resistant gonococci. *Sex Transm Infect.* 2009; 85(4): 256-258.
- Thomas S, Karnik S, Barai RS, Jayaraman VK, Idicula-Thomas S. CAMP: A useful resource for research on antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res.* 2010, 38: D774–D780.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22:4673-4680.
- Thorn RM, Greenman J. Microbial volatile compounds in health and disease conditions. *J Breath Res.* 2012; 6(2):024001.
- Tibaldi C, Cappello N, Latino MA, Masuelli G, Marini S, Benedetto C. Vaginal and endocervical microorganisms in symptomatic and asymptomatic non-pregnant females: risk factors and rates of occurrence. *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15(7):670-9.
- Todokoro D, Tomita H, Inoue T and Ike Y. Genetic analysis of bacteriocin 43 of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72: 6955–6964.
- Todorov SD, van Reenen CA, Dicks LM. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer. *J Gen Appl Microbiol.* 2004; 50(3): 149-57.
- Torok MR, Miller WC, Hobbs MM. The association between *Trichomonas vaginalis* infection and level of vaginal lactobacilli, in nonpregnant women. *J Infect Dis.* 2007;196:1102–7.
- Trevisan A, Mengoli C, Rossi L, Cattai M, Cavallaro A. Epidemiology of reproductive tract infections in a symptomatic population of North East of Italy. *Minerva Ginecol.* 2008;60(2):135-142.
- Truusalu K, Mikelsaar RH, Naaber P, Tonis K, Kullisaar T, Zilmer M, and Mikelsaar M. Eradication of *Salmonella typhimurium* infection in a murine model of typhoid fever with the combination of probiotic *Lactobacillus fermentum* ME-3 and ofloxacin. *BMC Microbiol.* 2008; 8:132 doi: 10.1186/1471-2180-8-132.
- Truusalu K, Naaber P, Kullisaar T, Tamm H, Mikelsaar RH, Zilmer K, Rehema A, Zilmer M and Mikelsaar M. The influence of antibacterial and antioxidative probiotic lactobacilli on gut mucosa in a mouse model of *Salmonella* infection. *Microb Ecol Health Dis.* 2004; 16: 180-187.
- Tsuji I, Sato S, Otake K, Watanabe T, Kamada H, Sato S. Characterization of a variety of neutralizing anti-heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor monoclonal antibodies by different immunization methods. *MAbs.* 2012; 4(6).
- Turcotte C, Lacroix C, Kheadr E, Grignon L, Fliss I. A rapid turbidimetric microplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins. *Int J Food Microbiol.* 2004; 90: 283-293.
- Turner C, Turner P, Po L, Maner N, De Zoysa A, Afshar B, Efstratiou A, Heath PT, Nosten F. Group B streptococcal carriage, serotype distribution and antibiotic susceptibilities in pregnant women at the time of delivery in a refugee population on the Thai-Myanmar border. *BMC Infect Dis.* 2012; 12: 34. doi: 10.1186/1471-2334-12-34.

- Turpin W, Humblot C, Thomas M, and Guyot JP. Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. *Int J Food Microbiol.* 2010; 143(3): 87-102.
- Tursi A, Brandimarte G, Papa A, Giglio A, Elisei W, Giorgetti GM, Forti G, Morini S, Hassan C, Pistoia MA, Modeo ME, Rodino' S, D'Amico T, Sebkova L, Sacca' N, Di Giulio E, Luzza F, Imeneo M, Larussa T, Di Rosa S, Annese V, Danese S, Gasbarrini A. Treatment of relapsing mild-to-moderate ulcerative colitis with the probiotic VSL#3 as adjunctive to a standard pharmaceutical treatment: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol.* 2010;105: 2218–27.
- Tytler EM, Anantharamaiah GM, Walker D, Mishra VK, Palgunachari MN & Segrest JP. Molecular basis for prokaryotic specificities of magainin induced lysis. *Biochemistry.* 1995; 34 4393–4397.
- Unemo M and Dillon JAR. Review and International Recommendation of Methods for Typing *Neisseria gonorrhoeae* Isolates and Their Implications for Improved Knowledge of Gonococcal Epidemiology, Treatment, and Biology. *Clin Microbiol Rev.* 2011; 24(3): 447–458.
- Vaillancourt, J. Regulating Pre- and Pro-biotics: A US FDA Perspective. In Institute of Medicine Report of the Forum on Microbial Threats Workshop Summary. Ending the War Metaphor: The Future Agenda for Unraveling the Host-Microbe Relationship. (Washington, DC: National Academies Press), 2006; 229-237.
- Valkenburg-van den Berg AW, Houtman-Roelofsen RL, Oostvogel PM, Dekker FW, Dörr PJ, Sprij AJ. Timing of group B *Streptococcus* screening in pregnancy: a systematic review. *Gynecol Obstet Invest.* 2010; 69(3):174-83.
- Van Belkum A, Struelens M, de Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14:547-560.
- Van Belkum MJ, Martin-Visscher LA, and Veredaas JC. Structure and genetics of circular bacteriocins. *Trends Microbiol.* 2011; 19: 411-418.
- van der Mee-Marquet N, Jouannet C, Domelier AS, Arnault L, Lartigue MF, and Quentin R. Genetic diversity of *Streptococcus agalactiae* strains and density of vaginal carriage. *JMM.* 2009; 58: 169–173.
- van Heel AJ, Montalban-Lopez M, Kuipers OP. Evaluating the feasibility of lantibiotics as an alternative therapy against bacterial infections in humans. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2011; 7(6): 675-80.
- van Loveren H, Sanz Y, Salminen S. Health claims in Europe: probiotics and prebiotics as case examples. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2012; 3: 247-61.
- Vanderhoof JA, and Young R. Probiotics in the United States. *Clin Infec Dis.* 2008; 46:S67–72.
- Vasile N, Ghindea R, Vassu T. Probiotics-an alternative treatment for various diseases. *Roum Arch Microbiol Immunol.* 2011;70(2):54-9.
- Veazey RS, Shattock RJ, Klasse PJ, Moore JP. Animal models for microbicide studies. *Curr HIV Res.* 2012; 10(1): 79-87.

- Vélez MP, De Keersmaecker SC and Vanderleyden J. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol Lett.* 2007; 276: 140–148.
- Venugopalan V, Shriner KA, and Wong-Beringer A. Regulatory Oversight and Safety of Probiotic Use. *Emerging Infectious Diseases.* 2010; 16(11): 1661-66.
- Vera Garate MV, Morano ST, Ahumada C, Nagel A, Méndez EA. Prevalencia de portación de estreptococo grupo B en la mujer embarazada. Optimización de su detección. *Rev. Argentina de Microbiología.* 2012; 44(1): 16.
- Vero V, Gasbarrini A. The EFSA health claims 'learning experience'. *Int J Food Sci Nutr.* 2012; 63(1): 14-6.
- Versalovic J, Wilson M. 2008. Therapeutic microbiology: probiotics and related strategies. 1. Washington, DC. ASM Press; p. 403.
- Virji M. Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7(4): 274-86.
- Waites MJ, Ogden K. The estimation of nisin using ATP-bioluminometry. *J Inst Brew.* 1987; 93: 30-32.
- Walencka E, Rózalska S, Sadowska B, Rózalska B. The influence of *Lactobacillus acidophilus*-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiol.* 2008; 53(1): 61-66.
- Wall RJ, Shani M: Are animal models as good as we think? *Theriogenology.* 2008, 69:2-9.
- Walstrom G, Saris PE. A nisin bioassay based on bioluminescence. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65: 3742-3745.
- Wang F, Cao LT, Hu SH. A rapid and accurate 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide colorimetric assay for quantification of bacteriocins with nisin as an example. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2007. 8(8): 549-554.
- Wang Q, Dong J, Zhu Y. Probiotic supplement reduces risk of necrotizing enterocolitis and mortality in preterm very low-birth-weight infants: an updated meta-analysis of 20 randomized, controlled trials. *J Pediatr Surg.* 2012a; 47(1):241-8.
- Wang S, Zhu H, Lu C, Kang Z, Luo Y, Feng L, Lu X. Fermented milk supplemented with probiotics and prebiotics can effectively alter the intestinal microbiota and immunity of host animals. *J Dairy Sci.* 2012b; 95(9):4813-22.
- Weber G, Ohno-Machado L and Shieber S. Representation in stochastic search for phylogenetic tree reconstruction. *J Biomed Inform.* 2006; 39 (1):1-8.
- Wells JM. Immunomodulatory mechanism of lactobacilli. *Microbial Cell Factories* 2011, 10(1):S17.
- WGO (World gastroenterology Organization). Guías Mundiales de la WGO de Probióticos y prebióticos. 2010.
- WHO (World Health Organization) 2005. Food Safety Department. Modern food biotechnology, human health and development: an evidence based study:9.

- WHO (World Health Organization). Global strategy for the prevention and control of sexually transmitted infections: 2006-2015. Geneva: WHO 2007. http://www.who.int/reproductivehealth/publications/stisstrategy/stis_strategy.pdf
- WHO (World Health Organization). Sexually transmitted infections. Fact Sheet 110. 2011. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en/>.
- Wiggins R, Hicks SJ, Soothill PW, Millar MR, Corfield AP. Mucinases and sialidases: their role in the pathogenesis of sexually transmitted infections in the female genital tract. *Sex Transm Inf.* 2001; 77:402-408.
- Wijert JH van de, Morrison CS, Cornelisse PG, Munjoma M, Moncada J, Awio P, Wang J, Pol B Van der, Chipato T, Salata RA, Padian NS: Bacterial vaginosis and vaginal yeast, but not vaginal cleansing, increase HIV-1 acquisition in African women. *J Acquir Immune Defic Synd.* 2008, 48(2): 203-210.
- Wilks M, Wiggins R, Whiley A, Hennessy E, Warwick S, Porter H, Corfield A, Millar M. 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.
- Williams NT. Probiotics. *Am J Health Syst Pharm.* 2010; 67(6): 449-58.
- Wilson JD, Lee RA, Balen AH, Rutherford AJ. Bacterial vaginal flora in relation to changing oestrogen levels. *Int. J. STD AIDS.* 2007. 18:308-11.
- Wilson M. The reproductive system and its indigenous microbiota. In: *Microbial Inhabitants of Humans: Their Ecology and Role in Health and Disease*, 2005. Cambridge University Press, NY, USA, 206-250.
- Wilson-Stanford S, Smith L. Commercial development and application of type A lantibiotics. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2011; 6(2): 175-85.
- Wimley WC. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chem Biol.* 2010; 5(10):905-17.
- Winn HN. Group B streptococcus infection in pregnancy. *Clin Perinatol.* 2007; 34: 387-392.
- Wirawan RE, Swanson KM, Kleffmann T, Jack RW, and Tagg JR. Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Microbiology.* 2007; 157: 1619-1630.
- Witkin SS, Linhares IM, Giraldo P: Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2007; 21(3):347-354.
- Wolfers M, de Zwart O, Kok G. Adolescents in The Netherlands underestimate risk for sexually transmitted infections and deny the need for sexually transmitted infection testing. *AIDS Patient Care STDS.* 2011; 25(5): 311-9.
- Wolny K, Gołda-Matuszak E. *Streptococcus agalactiae* (GBS) the characteristic of isolated strains from productive women's vagina. *Med Dosw Mikrobiol.* 2010; 62(2): 141-51.
- Wolters D, Antoine JM, Myllyluoma E, Schrezenmeir J, Szajewska H, and Rijkers GT. Guidance for Substantiating the Evidence for Beneficial Effects of Probiotics: Prevention and Management of Infections by Probiotics. *JN.* 2010; 698S-712S.

- Wong WW, Huang CT, Li LH, Chiang CC, Chen BD, Li SY. Molecular Epidemiology of Gonorrhea Identified Clonal Clusters with Distinct Susceptibilities Associated with Specific High-risk Groups. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(12):3931-4.
- Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tse H, Yuen KY. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14: 908-934.
- Workowski KA, Berman SM, Douglas JM, Jr. Emerging antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: urgent need to strengthen prevention strategies. *Ann Intern Med*. 2008; 148: 606-13.
- Wu J, Hu S, and Cao L. Therapeutic effect of nisin Z on subclinical mastitis in lactating cows. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(9): 3131-3135.
- Xiao JZ, Kondo S, Yanagisawa N, Takahashi N, Odamaki T, Iwabuchi N, Miyaji K, Iwatsuki K, Togashi H, et al. Probiotics in the treatment of Japanese cedar pollinosis: a double-blind placebo-controlled trial. *Clin Exp Allergy*. 2006; 36: 1425-35.
- Yamashiro Y, Nagata S. Beneficial microbes for premature infants, and children with malignancy undergoing chemotherapy. *Benef Microbes*. 2010; 1(4): 357-65.
- Yao XY, Yuan MM, Li DJ. Molecular adjuvant C3d3 improved the anti-hCG β humoral immune response in vaginal inoculation with live recombinant *Lactobacillus* expressing hCG β -C3d3 fusion protein. *Vaccine*. 2007; 25(32): 6129-39.
- Yoneyama F, Imura Y, Ichimasa S, Fujita K, Zendo T, Nakayama J, Matsuzaki K, Sonomoto K. Lacticin Q, a lactococcal bacteriocin, causes high-level membrane permeability in the absence of specific receptors. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75(2): 538-541.
- Younes JA, van der Mei HC, van den Heuvel E, Busscher HJ, and Reid G. Adhesion Forces and Coaggregation between Vaginal Staphylococci and Lactobacilli. *PLoS One*. 2012; 7(5): e36917. doi: 10.1371/journal.pone.0036917
- Zalazar, JA. Prevalencia de *Streptococcus agalactiae* en mujeres embarazadas. 2009. Tesis Doctoral, UNC, Córdoba, Argentina.
- Zapulli V, Mazzariol S, Cavicchiolo L, Petterino C, Barchellioni L, and Castagnaro M. Fatal necrotizing fasciitis and miocitis in a captive common bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) associated with *Streptococcus agalactiae*. *J Vet Diagn Invest*. 2005; 17: 617-622.
- Zarate G, Nader-Macias ME: Influence of probiotic vaginal lactobacilli on *in vitro* adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. *Lett. Appl. Microbiol*. 2006; 43(2), 174-180.
- Zárate G, Santos V, and Nader-Macias ME. Protective effect of vaginal *Lactobacillus paracasei* CRL 1289 against urogenital infection produced by *Staphylococcus aureus* in a mouse animal model. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2007, ID 48358.
- Zendo T, Yoneyama F, and Sonomoto K. Lactococcal membrane-permeabilizing antimicrobial peptides. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010; 88:1-9.
- Zhou X, Brown CJ, Abdo Z, et al. Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *ISME J*. 2007; 1:121e33.

- Zhou X, Hansmann MA, Davis CC, Suzuki H, Brown CJ, Schütte U, Pierson JD, Forney LJ. The vaginal bacterial communities of Japanese women resemble those of women in other racial groups. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010; 58:169–181.
- Zhu Y, Michelle Luo T, Jobin C, Young HA. Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis. *Cancer Lett*. 2011; 309(2): 119-27.
- Zodzika J, Jermakova I, Rezeberga D, Vasina O, Vedmedovska N, Donders G, Teibe U. Factors related to elevated vaginal pH in the first trimester of pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2011; 90: 41-46.
- Zouhir A, Hammami R, Fliss I, Hamida JB. A new structure-based classification of gram-positive bacteriocins. *Protein J*. 2010; 29(6): 432-9.
- Zribi M, Mansour KB, Abid F, Masmoudi A, Fendri C. Syndromic approach to sexually transmitted infections in Tunisian women: bacteriological validation. *Int J STD AIDS*. 2008;19(2):112-4.
- Zurchmitten A, Britez M, Di Vito J, Nieto J. Vigilancia de la resistencia a macrólidos y fluoroquinolonas en *Streptococcus agalactiae* en Junín de los Andes, Neuquén, Argentina. *Rev. Argentina de Microbiología*. 2012; 44(1): 28-29.

Anexos

One Way Analysis of Variance

julio 21, 2011

Data source: Comparación de actividad antimicrobiana de los SLCs de L23 y L60 sobre NG**Normality Test:** Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

julio 21, 2011

Data source: Data 1 in Notebook 1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
SLC L23	93	0	18,000	17,000	20,000
SLC L60	93	0	19,000	17,750	21,000

H = 3,608 with 1 degrees of freedom. (P = 0,058)

The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,058)

One Way Analysis of Variance

julio 21, 2011

Data source: COMPARACIÓN HALOS PRODUCIDOS POR Bacteriocina L23 vs B L60**Normality Test:** Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

julio 21, 2011

Data source: Data 1 in Notebook 1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
B L23	93	0	16,000	14,000	17,000
B L60	93	0	15,000	14,000	16,000

H = 6,938 with 1 degrees of freedom. (P = 0,008)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,008)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0,01
B L23 vs B L60	1912,000	3,683	Yes

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

One Way Analysis of Variance

julio 21, 2011,

Data source: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE SLC L60, PEROXIDO Y BACTERIOCINA L60 SOBRE GONOC**Normality Test:** Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks**Data source:** Data 1 in Notebook 1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
SLC L60	93	0	19,000	17,750	21,000
H202 + B L60	93	0	17,000	15,000	18,250
B L60	93	0	15,000	14,000	16,000

H = 90,531 with 2 degrees of freedom. (P = <0,001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0,01
SLC L60 vs B L60	10410,000	13,379	Yes
SLC L60 vs H202 + B L60	5008,500	6,437	Yes
H202 + B L60 vs B L60	5401,500	6,942	Yes

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

One Way Analysis of Variance

julio 21, 2011

Data source: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE SLC L23 VS BACT L23 SOBRE GONOC**Normality Test:** Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

julio 21, 2011

Data source: Data 1 in Notebook 1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
SLC L23	93	0	18,000	17,000	20,000
B L23	93	0	16,000	14,000	17,000

H = 47,839 with 1 degrees of freedom. (P = <0,001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0,01
SLC L23 vs B L23	5039,000	9,705	Yes

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

t-test

julio 20, 2011

Data source: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LACTOS SOBRE SGB POR ESTRIAS CRUZADAS

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, Rank Sum Test begun

Mann-Whitney Rank Sum Test

Data source: Data 1 in Notebook 1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
lacto L23	171	0	29,000	27,000	31,750
lacto L60	171	0	30,000	28,000	33,000

Mann-Whitney U Statistic= 16581,000

T = 27366,000 n(small)= 171 n(big)= 171 (P = 0,031)

The difference in the median values between the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,031)

One Way Analysis of Variance

julio 20, 2011, 11:36:15

Data source: ACTIVI ANTIMICROBI DE LACTOS SOBRE SGB POR ESTRIAS CRUZADAS

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

julio 20, 2011, 11:36:15

Data source: Data 1 in Notebook 1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
lacto L23	171	0	29,000	27,000	31,750
lacto L60	171	0	30,000	28,000	33,000

H = 4,658 with 1 degrees of freedom. (P = 0,031)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,031)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

One Way Analysis of Variance

julio 20, 2011

Data source: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA BACTERIOCINAS SOBRE SGB 2011SNB.SNB

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

julio 20, 2011

Data source: Data 1 in ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA BACTERIOCINAS SOBRE SGB 2011SNB.SNB

Group	N	Missing	Median	25%	75%
TRAT B L60	156	0	15,000	14,000	16,000
TRAT B L23	156	0	14,500	14,000	15,000
TRAT MEZCLA	156	0	18,000	17,000	19,000

H = 276,857 with 2 degrees of freedom. (P = <0,001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0,01
TRAT MEZCLA vs TRAT B L23	35755,000	21,167	Yes
TRAT MEZCLA vs TRAT B L60	31803,500	18,828	Yes
TRAT B L60 vs TRAT B L23	3951,500	2,339	No

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

One Way Analysis of Variance

julio 20, 2011

Data source: Data 1 in SGB IN VITRO SINERGISMO EN POZO 2011.SNB

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

julio 20, 2011

Data source: Data 1 in SGB IN VITRO SINERGISMO EN POZO 2011.SNB

Group	N	Missing	Median	25%	75%
TRAT A	156	0	8,000	7,000	8,000
TRAT B	156	0	7,000	7,000	8,000
TRAT C	156	0	19,000	18,000	19,500

H = 329,363 with 2 degrees of freedom. (P = <0,001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0,01
TRAT C vs TRAT B	38679,000	22,898	Yes
TRAT C vs TRAT A	34329,000	20,323	Yes
TRAT A vs TRAT B	4350,000	2,575	No

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

GR HUMANO

One-Way ANOVA on GRH: SLC L23 -> SLC L60:

Data	Mean	Variance	N
B	0,197	2,89E-4	3
C	0,171	1,21E-4	3

F = 4,94634

p = 0,09021

At the 1E-3 level, the means are NOT significantly different.

One-Way ANOVA on columns selected between Col(B) -> Col(C):

Data	Mean	Variance	N
B	0,197	2,89E-4	3
C	0,171	1,21E-4	3

F = 4,94634

p = 0,09021

At the 0,05 level, the means are NOT significantly different.

GR CARNERO

One-Way ANOVA on SLC L23-> C:

Data	Mean	Variance	N
D	0,123	5,76E-4	3
E	0,091	6,4E-5	3

F = 4,8

p = 0,0936

At the 0,05 level, the means are NOT significantly different.

One-Way ANOVA on GRC: SLC L23->SLC L60:

Data	Mean	Variance	N
D	0,123	5,76E-4	3
E	0,091	6,4 E-5	3

F = 4,8

p = 0,0936

At the 1E-3 level, the means are NOT significantly different.

BACTERIOCINA S/CARNERO

[19/04/2010 13:53 "/Data1" (2455305)]

One-Way ANOVA on GRC: SLCN L23-> SLCNP L60:

Data	Mean	Variance	N
------	------	----------	---

F	0,087	1,96E-4	3
---	-------	---------	---

G	0,05	2,89E-4	3
---	------	---------	---

F = 8,46804

p = 0,04368

At the 1E-3 level, the means are NOT significantly different.

[19/04/2010 13:54 "/Data1" (2455305)]

One-Way ANOVA on columns selected between Col(F) -> Col(G):

Data	Mean	Variance	N
------	------	----------	---

F	0,087	1,96E-4	3
---	-------	---------	---

G	0,05	2,89E-4	3
---	------	---------	---

F = 8,46804

p = 0,04368

At the 0,05 level, the means are significantly different.

BACTERIOCINA EN HUMANOS

One-Way ANOVA on

Data	Mean	Variance	N
------	------	----------	---

H	0,13	1,69E-4	3
---	------	---------	---

I	0,133	3,61E-4	3
---	-------	---------	---

F = 0,05094

p = 0,83249

At the 0,05 level, the means are NOT significantly different.

One-Way ANOVA on GRH: SLCN L23-> SLCNP L60:

Data	Mean	Variance	N
------	------	----------	---

H	0,13	1,69E-4	3
---	------	---------	---

I	0,133	3,61E-4	3
---	-------	---------	---

F = 0,05094
p = 0,83249

At the 1E-3 level, the means are NOT significantly different.

COMPARACION ENTRE SLC DE 23 Y 60 SOBRE GR DE HUMANOS Y CARNERO.

One-Way ANOVA on SLC L23 Y SLC L60 GRH -> SLC L23 Y SLC L60 GRC:

Data	Mean	Variance	N
B	0,16	0,00199	6
C	0,131	0,00199	6

F = 1,26695
p = 0,28663

At the 1E-3 level, the means are NOT significantly different.

One-Way ANOVA on columns selected between Col(B) -> Col(C):

Data	Mean	Variance	N
B	0,16	0,00199	6
C	0,131	0,00199	6

F = 1,26695
p = 0,28663

At the 0,05 level, the means are NOT significantly different.

COMPARACION ENTRE EFECTOS DE BACTERIOCINAS DE L23 Y L60 SOBRE GR HUMANO Y CARNERO

[19/04/2010 14:11 "/Data2" (2455305)]

One-Way ANOVA on

Data	Mean	Variance	N
D	0,1085	7,007E-4	6
E	0,0915	0,00233	6

F = 0,57277
p = 0,46662

At the 0,05 level, the means are NOT significantly different.

One-Way ANOVA on SLCN L23 Y SLCNP L60 GRH -> SLCN L23 Y SLCNP L60 GRC:

Data	Mean	Variance	N
D	0,1085	7,007E-4	6
E	0,0915	0,00233	6

F = 0,57277
p = 0,46662

At the 1E-3 level, the means are NOT significantly different.

COMPARACION ENTRE SLC DE 23+60 SOBRE GR HUMANO Y DE CARNERO.

[19/04/2010 14:18 "/Data3" (2455305)]

One-Way ANOVA on SLC L23 Y L60 GRH-> SLC L23 Y L60 GRC:

Data	Mean	Variance	N
B	0,238	4,84E-4	3
C	0,179	1,69E-4	3

F = 15,99234
p = 0,01614

At the 1E-3 level, the means are NOT significantly different.

One-Way ANOVA on columns selected between Col(B) -> Col(C):

Data	Mean	Variance	N
B	0,238	4,84E-4	3
C	0,179	1,69E-4	3

F = 15,99234
p = 0,01614

At the 0,05 level, the means are significantly different.

EFFECTO DE LA MEZCLA DE BACTERIOCINAS SOBRE GR HUMANO Y DE CARNERO.

One-Way ANOVA on SLCNP L23 Y L60 GRH -> SLCNP L23 Y L60 GRC:

Data	Mean	Variance	N
D	0,22	2,56E-4	3
E	0,069	8,1E-5	3

F = 202,97626
p = 1,40971E-4

At the 1E-3 level, the means are significantly different.

COMPARACION DEL EFECTO HEMOLITICO PRODUCIDO POR LAS BACTERIOCINAS DE L23, L60 Y LA MEZCLA DE AMBAS SOBRE GR HUMANO.

One-Way ANOVA on GRH: SLCN L23 -> SLCNP L60 -> SLCNP L23 Y L60:

Data	Mean	Variance	N
B	0,13	1,69E-4	3
C	0,133	3,61E-4	3
D	0,22	2,56E-4	3

F = 29,91985
p = 7,56816E-4

At the 0,05 level,
the means are significantly different.

[20/04/2010 09:41 "/Data1" (2455306)]

One-Way ANOVA on GRH: SLCN L23 -> SLCNP L60 -> SLCNP L23 Y L60:

Data	Mean	Variance	N
B	0,13	1,69E-4	3
C	0,133	3,61E-4	3
D	0,22	2,56E-4	3

F = 29,91985
p = 7,56816E-4

At the 1E-3 level, the means are significantly different.

COMPARACION DEL EFECTO HEMOLITICO PRODUCIDO POR LAS BACTERIOCINAS DE L23, L60 Y LA MEZCLA DE AMBAS SOBRE GR carnero.

One-Way ANOVA on GRC: SLCN L23 -> SLCNP L60 -> SLCNP L23 Y L60:

Data	Mean	Variance	N
B	0,087	1,96E-4	3
C	0,05	2,89E-4	3
D	0,069	8,1E-5	3

F = 5,44346

p = 0,04485

At the 1E-3 level, the means are NOT significantly different.

One-Way ANOVA on columns selected between Col(B) -> Col(D):

Data	Mean	Variance	N
B	0,087	1,96E-4	3
C	0,05	2,89E-4	3
D	0,069	8,1E-53	

F = 5,44346

p = 0,04485

At the 0,05 level, the means are significantly different.

ACTIVIDAD HEMOLITICA DEL SLC DE L23, L60 Y DE LA MEZCLA DE SOBRENADANTES SOBRE GR HUMANO.

One-Way ANOVA on

Data	Mean	Variance	N
B	0,197	2,89E-4	3
C	0,171	1,21E-4	3
D	0,238	4,84E-4	3

F = 11,48658

p = 0,00888

At the 0,05 level, the means are significantly different.

One-Way ANOVA on GRH: SLC L23-> SLC L60 -> SLC L23 Y L60:

Data	Mean	Variance	N
B	0,197	2,89E-4	3
C	0,171	1,21E-4	3
D	0,238	4,84E-4	3

F = 11,48658

p = 0,00888

At the 1E-3 level, the means are NOT significantly different.

GR CARNERO

One-Way ANOVA on GRC: SLC L23-> SLC L60 -> SLC L23 Y L60:

Data	Mean	Variance	N
B	0,123	5,76E-4	3
C	0,091	6,4E-53	3
D	0,179	1,69E-4	3

F = 22,07169

p = 0,00171

At the 1E-3 level, the means are NOT significantly different.

One-Way ANOVA on columns selected between Col(B) -> Col(D):

Data	Mean	Variance	N
B	0,123	5,76E-4	3
C	0,091	6,4E-53	3
D	0,179	1,69E-4	3

F = 22,07169

p = 0,00171

At the 0,05 level, the means are significantly different.

P A U P *

Version 4.0b8 for 32-bit Microsoft Windows

Fri Jun 29 13:41:45 2001

-----NOTICE-----

This is a beta-test version. It will expire on 15 Jan 2002. Please report any crashes, apparent calculation errors, or other anomalous results. There are no restrictions on publication of results obtained with this version, but you should check the WWW site frequently for bug announcements and/or updated versions. See the README file on the distribution media for details.

Processing of file "C:\Users\Mar?a Marta\Documents\Fran.nex" begins...

Data read in DNA format

Data matrix has 24 taxa, 1561 characters

Valid character-state symbols: ACGT

Missing data identified by '-'

"Equate" macros in effect:

R,r ==> {AG}
Y,y ==> {CT}
M,m ==> {AC}
K,k ==> {GT}
S,s ==> {CG}
W,w ==> {AT}
H,h ==> {ACT}
B,b ==> {CGT}
V,v ==> {ACG}
D,d ==> {AGT}
N,n ==> {ACGT}

Warning: Use of all-digit taxon and/or character names does not conform to the NEXUS standard and is strongly discouraged. Remember that names have priority over numbers.

Outgroup status changed:

1 taxon transferred to outgroup
Total number of taxa now in outgroup = 1
Number of ingroup taxa = 23

Outgroup status changed:

1 taxon transferred to outgroup
Total number of taxa now in outgroup = 2
Number of ingroup taxa = 22

Processing of file "C:\Users\Mar?a Marta\Documents\Fran.nex" completed.

Heuristic search settings:

Optimality criterion = maximum parsimony

Character-status summary:

Of 1561 total characters:

All characters are of type 'unord'
All characters have equal weight
1326 characters are constant
68 variable characters are parsimony-uninformative
Number of parsimony-informative characters = 167

Starting tree(s) obtained via stepwise addition

Addition sequence: simple (reference taxon = GBS1611)

Number of trees held at each step during stepwise addition = 1

Branch-swapping algorithm: tree-bisection-reconnection (TBR)

Steepest descent option not in effect

Initial 'MaxTrees' setting = 100

Branches collapsed (creating polytomies) if maximum branch length is zero

'MulTrees' option in effect

Topological constraints not enforced

Trees are unrooted

'MaxTrees' limit (100) hit while swapping on tree #1 (score=283)

Heuristic search completed

Total number of rearrangements tried = 475889

Score of best tree(s) found = 283

Number of trees retained = 100

Note: Effectiveness of search may have been diminished due to tree-buffer overflow.

Time used = 3.00 sec

Tree description:

Unrooted tree(s) rooted using outgroup method

Optimality criterion = maximum parsimony

Character-status summary:

Of 1561 total characters:

All characters are of type 'unord'

All characters have equal weight

1326 characters are constant

68 variable characters are parsimony-uninformative

Number of parsimony-informative characters = 167

Character-state optimization: Accelerated transformation (ACCTRAN)

Tree number 1 (rooted using user-specified outgroup)

Tree length = 283

Consistency index (CI) = 0.9576

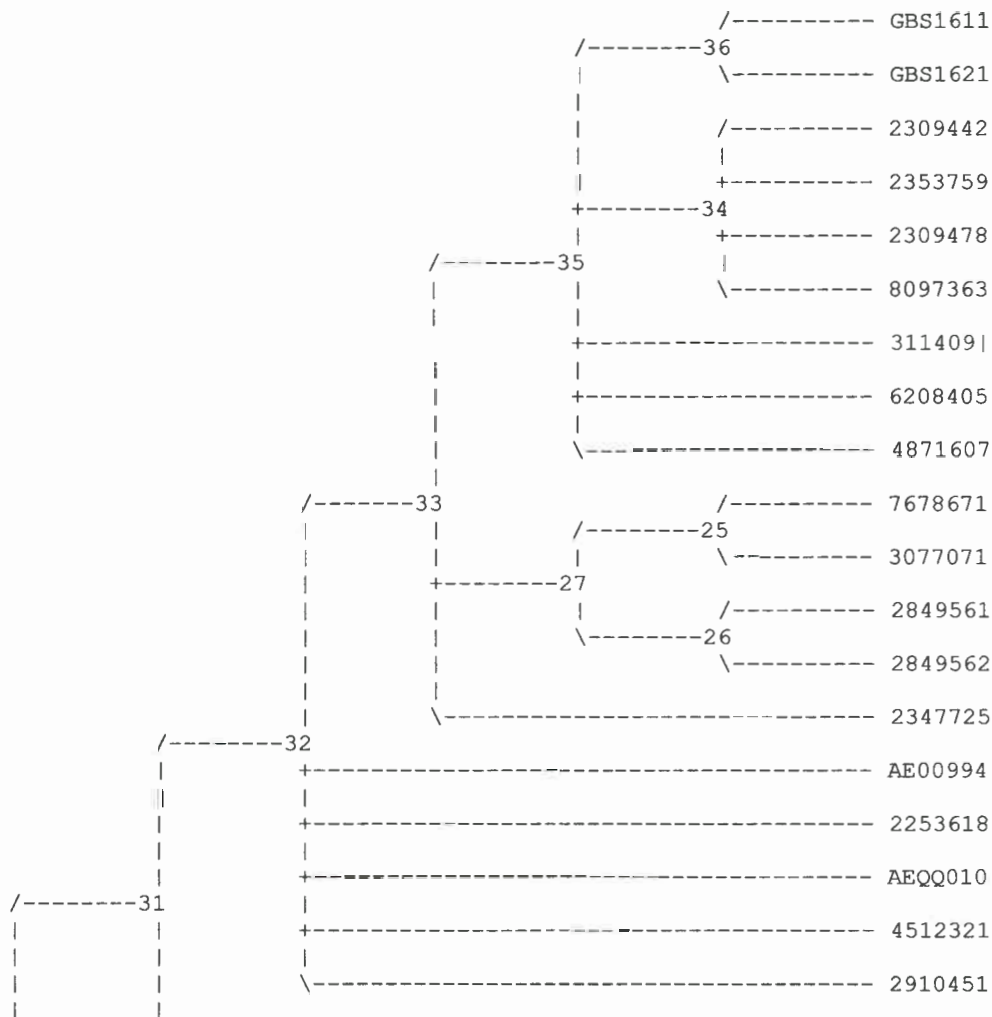
Homoplasy index (HI) = 0.0424

CI excluding uninformative characters = 0.9437

HI excluding uninformative characters = 0.0563

Retention index (RI) = 0.9520

Rescaled consistency index (RC) = 0.9116



```

/-----29          |          /----- 1567425
|                   |          \-----30
|                   |          \----- AE00995
|                   |          \-----
28          \----- 2212309
|
+----- CP00236
|
\----- 3349036

```

Heuristic search settings:

Optimality criterion = maximum parsimony

Character-status summary:

Of 1561 total characters:

All characters are of type 'unord'

All characters have equal weight

1326 characters are constant

68 variable characters are parsimony-uninformative

Number of parsimony-informative characters = 167

Starting tree(s) obtained via stepwise addition

Addition sequence: random

Number of replicates = 25

Starting seed = 1271015659

Number of trees held at each step during stepwise addition = 1

Branch-swapping algorithm: tree-bisection-reconnection (TBR)

Steepest descent option not in effect

Initial 'MaxTrees' setting = 100

Branches collapsed (creating polytomies) if maximum branch length is zero

'MulTrees' option in effect

Topological constraints not enforced

Trees are unrooted

'MaxTrees' limit (100) hit while swapping on tree #1 (score=285)

'MaxTrees' limit (100) hit while swapping on tree #1 (score=283)

Search terminated prematurely (no room to store new trees)

100 trees retained

Time used = 2.71 sec

Tree-island profile:

Island	Size	First tree	Last tree	Score	First replicate	Times hit
1	100	1	100	283	1	1

MaxTrees reset to 10000

Heuristic search settings:

Optimality criterion = maximum parsimony

Character-status summary:

Of 1561 total characters:

All characters are of type 'unord'

All characters have equal weight

1326 characters are constant

68 variable characters are parsimony-uninformative

Number of parsimony-informative characters = 167

Starting tree(s) obtained via stepwise addition

Addition sequence: random

Number of replicates = 25

Starting seed = 286152904

Number of trees held at each step during stepwise addition = 1

Branch-swapping algorithm: tree-bisection-reconnection (TBR)

Steepest descent option not in effect

'MaxTrees' setting = 10000 (will not be increased)

Branches collapsed (creating polytomies) if maximum branch length is zero

'MulTrees' option in effect

Topological constraints not enforced

Trees are unrooted

'MaxTrees' limit (10000) hit while swapping on tree #53 (score=283)

Search terminated prematurely (no room to store new trees)
 10000 trees retained
 Time used = 00:01:02.6

Tree-island profile:

Island	Size	First tree	Last tree	Score	First replicate	Times hit
1	10000	1	10000	283	1	1

Heuristic search settings:

Optimality criterion = maximum parsimony

Character-status summary:

Of 1561 total characters:

All characters are of type 'unord'

All characters have equal weight

1326 characters are constant

68 variable characters are parsimony-uninformative

Number of parsimony-informative characters = 167

Starting tree(s) obtained via stepwise addition

Addition sequence: random

Number of replicates = 50

Starting seed = 2083472919

Number of trees held at each step during stepwise addition = 1

Branch-swapping algorithm: tree-bisection-reconnection (TBR)

Steepest descent option not in effect

No more than 100 trees of score (length) greater than or equal to 1 will be saved in each replicate

'MaxTrees' setting = 10000 (will not be increased)

Branches collapsed (creating polytomies) if maximum branch length is zero

'MulTrees' option in effect

Topological constraints not enforced

Trees are unrooted

Heuristic search completed

Total number of rearrangements tried = 23532096

Score of best tree(s) found = 283

Number of trees retained = 4800

Time used = 7.07 sec

Tree-island profile:

Island	Size	First tree	Last tree	Score	First replicate	Times hit
1	100	1	100	283	1	1*
2	100	101	200	283	2	1*
3	100	201	300	283	3	2*
4	100	301	400	283	4	1*
5	100	401	500	283	5	1*
6	100	501	600	283	6	1*
7	100	601	700	283	7	1*
8	100	701	800	283	8	1*
9	100	801	900	283	9	1*
10	100	901	1000	283	10	1*
11	100	1001	1100	283	11	1*
12	100	1101	1200	283	12	2*
13	100	1201	1300	283	13	1*
14	100	1301	1400	283	15	1*
15	100	1401	1500	283	16	1*
16	100	1501	1600	283	17	1*
17	100	1601	1700	283	18	1*
18	100	1701	1800	283	19	1*
19	100	1801	1900	283	20	1*
20	100	1901	2000	283	21	1*
21	100	2001	2100	283	22	1*
22	100	2101	2200	283	23	1*
23	100	2201	2300	283	24	1*
24	100	2301	2400	283	25	1*
25	100	2401	2500	283	26	1*
26	100	2501	2600	283	27	1*
27	100	2601	2700	283	28	1*

28	100	2701	2800	283	29	1*
29	100	2801	2900	283	30	1*
30	100	2901	3000	283	32	1*
31	100	3001	3100	283	33	1*
32	100	3101	3200	283	34	1*
33	100	3201	3300	283	35	1*
34	100	3301	3400	283	36	1*
35	100	3401	3500	283	37	1*
36	100	3501	3600	283	38	1*
37	100	3601	3700	283	39	1*
38	100	3701	3800	283	40	1*
39	100	3801	3900	283	41	1*
40	100	3901	4000	283	42	1*
41	100	4001	4100	283	43	1*
42	100	4101	4200	283	44	1*
43	100	4201	4300	283	45	1*
44	100	4301	4400	283	46	1*
45	100	4401	4500	283	47	1*
46	100	4501	4600	283	48	1*
47	100	4601	4700	283	49	1*
48	100	4701	4800	283	50	1*

Note(s):

* Islands of size 100 (= limit on trees saved per replicate) found in different replicates may in fact belong to the same island

Tree description:

Unrooted tree(s) rooted using outgroup method

Optimality criterion = maximum parsimony

Character-status summary:

Of 1561 total characters:

All characters are of type 'unord'

All characters have equal weight

1326 characters are constant

68 variable characters are parsimony-uninformative

Number of parsimony-informative characters = 167

Character-state optimization: Accelerated transformation (ACCTRAN)

Tree number 1 (rooted using user-specified outgroup)

Tree length = 283

Consistency index (CI) = 0.9576

Homoplasy index (HI) = 0.0424

CI excluding uninformative characters = 0.9437

HI excluding uninformative characters = 0.0563

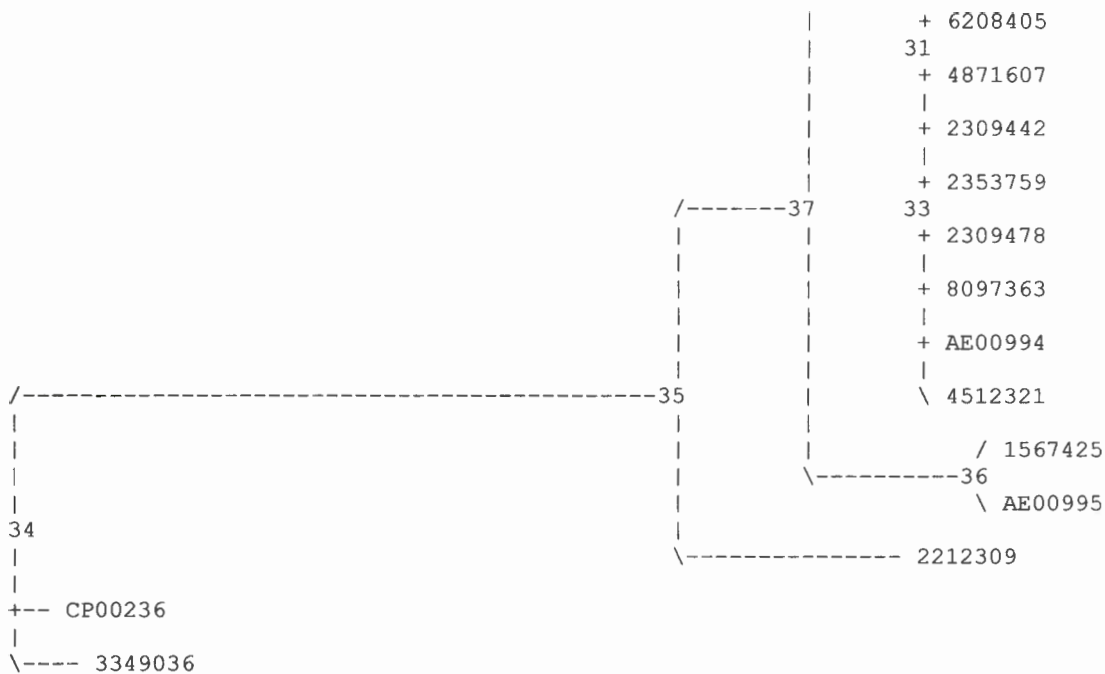
Retention index (RI) = 0.9520

Rescaled consistency index (RC) = 0.9116

```

/- GBS1611
40
+ GBS1621
|
| / 7678671
| |
| + 311409|
| |
|26/ 2849561
||25
|||\ 2849562
27|
39|\---- 3077071
||
28\ 2347725
29
30 2253618
32
+ 2910451
/-----38
| + AEQQ010
| |

```



4800 trees saved to file "C:\Users\Mar?a Marta\Documents\Fran.tre"

Bootstrap method with heuristic search:

Number of bootstrap replicates = 1000

Starting seed = 1684428375

Optimality criterion = maximum parsimony

Character-status summary:

Of 1561 total characters:

All characters are of type 'unord'

All characters have equal weight

1326 characters are constant

68 variable characters are parsimony-uninformative

Number of parsimony-informative characters = 167

Starting tree(s) obtained via stepwise addition

Addition sequence: random

Number of replicates = 50

Starting seed = 1848754028

Number of trees held at each step during stepwise addition = 1

Branch-swapping algorithm: tree-bisection-reconnection (TBR)

Steepest descent option not in effect

No more than 2 trees of score (length) greater than or equal to 1 will be saved in each replicate

'MaxTrees' setting = 10000 (will not be increased)

Branches collapsed (creating polytomies) if maximum branch length is zero

'MulTrees' option in effect

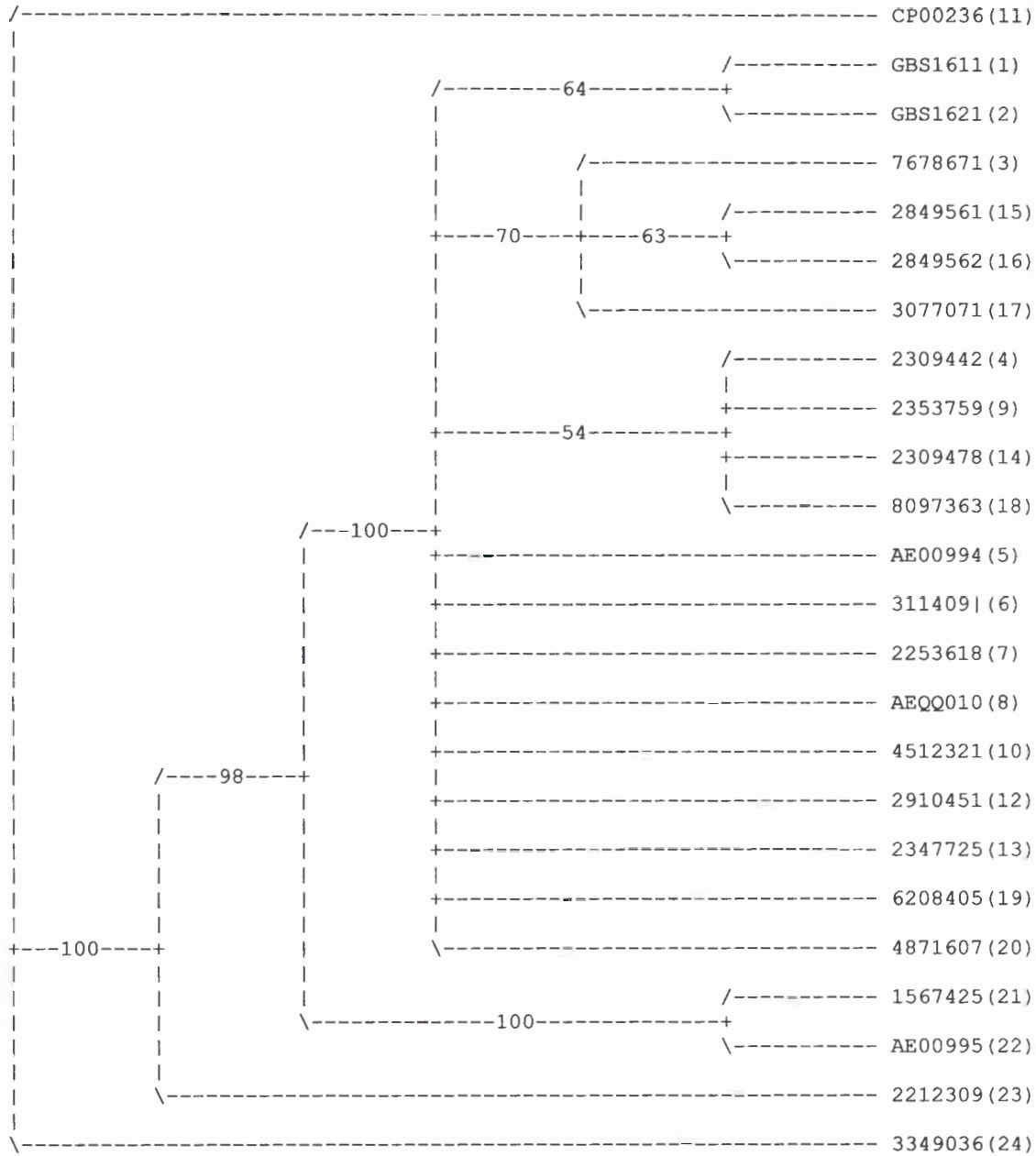
Topological constraints not enforced

Trees are unrooted

1000 bootstrap replicates completed

Time used = 00:03:28.7

Bootstrap 50% majority-rule consensus tree



Bipartitions found in one or more trees and frequency of occurrence (bootstrap support values):

1	2	2		
123456789012345678901234			Freq	%
.....**..			1000.00	100.0%
.....*.....*			1000.00	100.0%
.....*.....****			999.91	100.0%
.....*.....**			976.24	97.6%
.....*.....***			698.16	69.8%
.....*****			635.00	63.5%
.....**.....			626.00	62.6%
.....*.....*.....*			544.74	54.5%
.....**.....			471.54	47.2%
.....***.....			297.17	29.7%
.....*.....*			214.35	21.4%
.....*.....***			148.87	14.9%
.....*.....*.....****			144.95	14.5%
.....*.....*.....***			118.83	11.9%

U.N.R.C.
Biblioteca Central

72651



72651