



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**“DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS
IMPLICADOS EN INFECCIONES VAGINALES
EN MUJERES PRE Y POSTMENOPÁUSICAS EN
EL HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA
BIOLÓGICA**

P R E S E N T A:

RUIZ SANTANA MONTSERRAT



DIRECTOR DE TESIS:
M. EN C. JUAN CARLOS BRAVATA ALCÁNTARA.
HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO
ASESOR INTERNO:
Q.F.B. MANUEL ORDUÑA SÁNCHEZ
CIUDAD DE MÉXICO, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Agradezco especialmente al M. en C. Juan Carlos Bravata Alcántara, por apoyarme y confiarme este proyecto, por la orientación que me dio para que este proyecto fuera posible, así como las pláticas para que el trabajo experimental se hiciera más ameno. Gracias.

A la Doctora Sonia Chávez, por darme la oportunidad de formar parte del Servicio de genética y diagnóstico molecular del Hospital Juárez de México, por su amabilidad y por estar siempre dispuesta a ayudar en todo lo que fuese necesario.

A mis profesores y honorable jurado por todo el aprendizaje, por su dedicación, su tiempo, observaciones y paciencia durante la carrera, que me han llevado a esforzarme para llegar hasta donde estoy.

Al personal de displasias del Hospital Juárez de México, por darme la oportunidad y confianza de trabajar en su consultorio, así como todas las enseñanzas y aprendizajes nuevos que me ofrecieron.

Y a todos los que de una u otra forma me apoyaron para lograr este objetivo.

Muchas gracias UNAM y Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, mi alma máter.

Dedicatoria

A la vida y muerte, por darme la oportunidad de llegar a este momento tan esperado.

A mis maravillosos padres, Rocio y Eduardo, haciendo de este un triunfo más suyo que mío, sin los cuales este trabajo y el camino forjado para llegar hasta aquí, no hubiese sido posible. Le agradezco todas aquellas preocupaciones, desvelos e infinito apoyo durante mi formación académica; que tanto económico como personal, lograron llevarme hasta el lugar en el que me encuentro hoy.

Gracias por ese amor incondicional, no tendré vida suficiente para pagarles todo lo que han hecho por mí.

A mi hermano, por mostrarme lo bueno que es tener hermanos y ser aquella persona que me impulsa a ser cada vez mejor, por todo su apoyo brindado en cada momento difícil y fácil de mi vida, pero siempre juntos.

Agradezco a mi familia, a Rosi y a Viky por siempre preocuparse por mí, por ponerme en sus oraciones diarias y enseñarme el lado más dulce de la vida. Y a mis abuelos, aunque ya no están conmigo para acompañarme, estuvieron gran parte del camino que me tomó para llegar a este momento, porque sé el gran gusto que esto les hubiera dado y sin ellos tampoco sería quien soy.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, Alex, Alan, Gustavo por la paciencia y las enseñanzas, y especialmente a Ladis por toda la ayuda y orientación para hacer esto posible, siempre he de decir que ellos son lo más bonito que me dejó el hospital en la vida.

A mis mejores amigos y colegas Enrique y Baruch, mis incondicionales. En mis mejores y peores momentos siempre han estado presentes. Ustedes me han mostrado siempre el lado más sincero de la amistad.

Índice general

1	Introducción	8
2	Marco teórico	9
2.1	Microbiota vaginal normal	9
2.1.1	Especies predominante en la vagina	11
2.2	Infecciones vaginales	14
2.2.1	Vaginosis bacteriana (VB)	14
2.2.2	Vaginitis	16
2.3	Cuadro clínico	20
2.4	Tratamiento	22
2.5	Epidemiología	23
2.6	Factores de riesgo	24
2.7	Métodos de detección	25
2.8	Diagnóstico molecular	26
2.9	Aspectos epidemiológicos	29
3	Planteamiento del problema	32
4	Justificación	32
5	Hipótesis	32
6	Objetivo general	33
6.1	Objetivos particulares	33
7	Diseño experimental	33
7.1	Tipo de estudio	33
7.2	Población de estudio	33
7.3	Criterios de inclusión	34
7.4	Criterios de exclusión	34
7.5	Material	34
7.5.1	Material biológico	34
7.5.2	Reactivos	34
7.5.3	Equipos	35
7.6	Métodos	35
7.6.1	Diagrama de flujo	35
7.6.2	Verificación y diseño de primers	36
7.6.3	Preparación de primers	37

7.6.4	Toma de muestra	38
7.6.5	Extracción de ADN	38
7.6.6	Cuantificación de ácidos nucleicos	39
7.6.7	PCR de punto final y electroforesis en gel de agarosa.....	39
7.6.8	PCR en tiempo real	40
8	Resultados.....	42
8.1	Consulta de expedientes	42
8.2	Verificación de primers por PCR in sílico	43
8.3	Verificación de los primers por PCR de punto final.....	45
8.4	PCR en tiempo real, sistema BD MAX.....	49
8.5	Distribución de microorganismos patógenos y Lactobacilos entre mujeres pre y post menopáusicas.....	51
8.6	Distribución entre las infecciones vaginales y la menopausia.....	52
8.7	Distribución entre los métodos de planificación familiar y la VB	53
9	Discusión.....	55
10	Conclusiones.....	57
11	Perspectivas	58
12	Referencias	59

Índice de figuras

Figura 1. Fluctuaciones de la microbiota vaginal en función de los cambios que aparecen en las diferentes etapas de la vida de la mujer.	10
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Trichomonas vaginalis</i> .	18
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Chlamydia trachomatis</i> .	19
Figura 4. Esquema convencional de una PCR.	27
Figura 5. Programa empleado para la estandarización de cada par de primers.	38
Figura 6. Resultados de la verificación de primers en la plataforma Integrated DNA Technologies.	44
Figura 7. Resultados de la verificación de primers en la plataforma MFEprimer 3.0. quality control for PCR primers.	44
Figura 8. Electroforesis virtual de la detección de los productos amplificados por PCR de los diferentes patógenos.	45
Figura 9. Primers estandarizados por PCR en tiempo final de los diferentes patógenos.	46
Figura 10. Detección de productos obtenidos por PCR en tiempo final efectuada a 60°C.	47
Figura 11. Detección de productos obtenidos por PCR en tiempo final efectuada a 61°C.	48
Figura 12. Detección por PCR en tiempo real.	49

Índice de tablas

Tabla 1. Características, diagnóstico y tratamiento de infecciones vaginales.	21
Tabla 2. Primers obtenidos para la detección de cada uno de los microorganismos.	36
Tabla 3. Cantidades de reactivos utilizados para la identificación de patógenos.	37
Tabla 4. Condiciones para la detección de <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>Mycoplasma hominis</i> por PCR de punto final.	40
Tabla 5. Condiciones para la detección de <i>Lactobacillus crispatus</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i> y <i>Ureaplasma urealyticum</i> por PCR de punto final.	40
Tabla 6. Relación entre los factores de riesgo con significancia estadística y la vaginosis bacteriana estudiados en el grupo de mujeres premenopáusicas.	53

Índice de graficas

Gráfica 1. Características clínicas de las pacientes con infección vaginal.	42
Gráfica 2. Recuento de métodos de planificación familiar.	43
Gráfica 3. Recuento de los microorganismos patógenos encontrados en las 106 muestras por PCR en tiempo final y tiempo real.	50
Gráfica 4. Recuento de microorganismos patógenos en pacientes pre y post menopáusicas obtenidos del análisis de los geles de agarosa y del sistema BD MAX.	51
Gráfica 5. Recuento de lactobacilos en pacientes pre y post menopáusicas obtenidos del análisis de los geles de agarosa.	52
Gráfica 6. Prevalencia de vaginosis bacteriana en relación con MPF como factores de riesgo.	54

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ATTC	American Type Culture Collection
AVV	Atrofia vulvovaginal
CDC	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
SPC	Control de procesamiento de muestra
DIU	Dispositivo intrauterino
STRAW	Estadios del Envejecimiento Reproductivo
ITS	Infecciones de transmisión sexual
IV	Infecciones vaginales
DTI	Integrated DNA Technologies
NCBI	National Center For Biotechnology Information
MPF	Método de planificación familiar
MBN	Microbiota normal
MO	Microorganismos
OTB	Oclusión Tubaria Bilateral
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SPSS	Statistical Product and Service Solutions
Ta	Temperatura de alineamiento
Tm	Temperatura de fusión
VB	Vaginosis bacteriana
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

1 Introducción

En el campo de la salud pública en cuanto a salud sexual y reproductiva las infecciones vaginales (IV) representan uno de los principales problemas de nuestros días. Por lo tanto el conocimiento científico de sus causas y consecuencias en el área de la medicina preventiva y curativa, contribuirán de alguna manera a reducir el índice de infección.

A medida que las mujeres se acercan a la menopausia, la disminución del estrógeno puede conducir a IV y atrofia vulvovaginal (AVV). Varios estudios han estimado que entre el 25% y el 50% de las mujeres postmenopáusicas experimentan una AVV que puede incluir síntomas vulvovaginales como ardor al orinar, sangrado después del coito, relaciones sexuales dolorosas y flujo vaginal, dolor, picazón o sensación de ardor.

Algunos síntomas vulvovaginales pueden aliviarse con el uso de lubricantes vaginales, sin embargo, estos pueden afectar adversamente el epitelio y la microbiota vaginal. Por todo esto es necesario implementar nuevas alternativas para reducir los síntomas vulvovaginales causados por la VVA.

En este trabajo se podrá observar la relación con el factor de riesgo que es la menopausia y así poder tomar las medidas necesarias para un adecuado manejo de este proceso y mejorar las condiciones de vida de la mujer.

2 Marco teórico

2.1 Microbiota vaginal normal

La microbiota normal (MBN) de la vagina cambia durante el desarrollo biológico de la mujer. Las diferentes sucesiones microbiológicas que se producen en la vagina dependen principalmente de los cambios en sus niveles hormonales, al producir variaciones fisiológicas importantes, aunque también existen otros factores que pueden influir como el comportamiento sexual, hábitos higiénicos y comportamiento social en general, que pueden afectar cualitativa y cuantitativamente la composición de la MBN. La vagina de las niñas es estéril al momento del nacimiento, algunos días después cuando el estrógeno de la madre eleva el contenido de glucógeno de las células epiteliales vaginales de la infante, los lactobacilos de la madre colonizan la vagina de la bebé, siendo estas las bacterias predominantes durante la lactancia. Cuando el nivel de estrógeno de la niña disminuye con el cese de la lactancia materna, también disminuye el glucógeno vaginal y con este los lactobacilos.(1)

La puesta en marcha de la producción de estrógenos que marca el inicio de la pubertad, provoca el incremento del espesor del epitelio vaginal y la secreción del exudado rico en nutrientes, lo que facilita la colonización por lactobacilos. El metabolismo fermentativo de estas bacterias genera ácidos orgánicos y agua oxigenada, que eliminarán a los contaminantes intestinales y controlarán la proliferación excesiva de *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* y otros patógenos potenciales.(2)

En la menopausia, la MBN que hasta ese momento había estado dominada por lactobacilos, es reemplazada por una microbiota mixta, con concentraciones moderadas de *Mycoplasma*, y pequeñas cantidades de bacterias anaerobias, incluida *Gardnerella vaginalis*. En las mujeres postmenopáusicas, la interrupción del

ciclo estrogénico se acompaña de una gran disminución del volumen de exudado vaginal y de los nutrientes disponibles. (3)

El pH fisiológico de la vagina es de aproximadamente 4.5 - 5. Este ambiente ácido inhibe parcial o totalmente el desarrollo de la mayor parte de las bacterias procedentes del tracto digestivo y de las de origen ambiental, siendo así un mecanismo de protección de la mucosa muy eficaz, hasta el punto de que un rasgo diferencial de la infección es un exudado con un pH próximo a la neutralidad. El origen de la acidez vaginal es el ácido láctico que se genera como producto final del metabolismo fermentativo de los glúcidos, que llevan a cabo los lactobacilos residentes y las propias células epiteliales.(4)

En ocasiones, la concentración de lactobacilos en la vagina disminuye por debajo de un nivel crítico. Esta circunstancia es aprovechada por microorganismos que se encuentran habitualmente en la vagina sana y/o por otros de origen exógeno, que proliferarán hasta hacerse dominantes, comportándose así como patógenos oportunistas.(4)

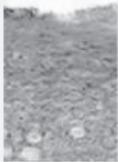
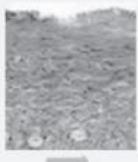
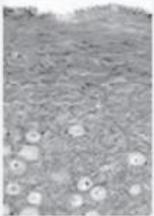
	NEONATA	INFANCIA	PUBERTAD	MADUREZ SEXUAL	MENOPAUSIA
ESTRÓGENOS	++	-	+	++	-
EPITELIO					
GLUCÓGENO	+	-	-+	+	-
pH	4-5	7	7-5	4-5	6-7
MICROBIOTA	Estéril <i>Lactobacillus</i>	Escaso	Mixto	<i>Lactobacillus</i>	Mixto

Figura 1. Fluctuaciones de la microbiota vaginal en función de los cambios que aparecen en las diferentes etapas de la vida de la mujer. Tomada de Álvarez-Calatayud, Guillermo, 2015. (2)

2.1.1 Especies predominante en la vagina

Los lactobacilos son bacterias que se denominan así porque tienen forma bacilar y un catabolismo estrictamente fermentativo en el que el producto final de la degradación de los azúcares es el ácido láctico. Se han descrito más de 100 especies dentro del género *Lactobacillus*, siendo sus hábitats principalmente dos, el material vegetal y las cavidades internas de los animales, incluidos los humanos. Existe una clara especialización de las distintas especies por hábitats concretos como, por ejemplo, la vagina. Los lactobacilos son microorganismos inocuos que forman parte de nuestra microbiota autóctona y, tan solo en casos excepcionales, han sido asociados a procesos patológicos y siempre en pacientes con enfermedades previas extremadamente graves.(2)

Las propiedades de la MBN que le permiten colonizar la mucosa e impedir el establecimiento o la proliferación excesiva de microorganismos potencialmente patógenos son de dos tipos: la adherencia específica a las células epiteliales y a dichos patógenos, y la producción de compuestos antimicrobianos.(5)

2.1.1.1 Adherencia al epitelio vaginal e inhibición de la colonización por organismos indeseados

La protección de la mucosa vaginal depende del reconocimiento específico entre las estructuras superficiales de los lactobacilos (adhesinas) y del epitelio (receptores). Las adhesinas forman parte de la pared celular y su composición parece ser variada. Así se han descrito los ácidos lipoteicoicos, proteínas extracelulares, carbohidratos y glucoproteínas, aunque aún no se ha purificado ningún componente de las cubiertas bacterianas que se una específicamente a las células de la mucosa vaginal. Respecto a los receptores localizados en la superficie del epitelio, aún se sabe menos. Se ha observado que la fibronectina, que es una glucoproteína que forma parte de la matriz extracelular, es reconocida específicamente por lactobacilos aislados de vagina, cuya unión se ve favorecida en condiciones de acidez; así, cepas que no se unen a pH neutro sí lo hacen a pH

4. Este hecho, unido a la baja capacidad de cepas de bacterias intestinales anaerobias para unirse a dicha macromolécula, tiene implicaciones ecológicas evidentes. La unión de los lactobacilos también podría ser directa a glucolípidos de la membrana de las células vaginales, en un proceso mediado por cationes divalentes.(5)

El resultado de la asociación entre los lactobacilos y el epitelio vaginal es la formación de una biopelícula que lo protege frente a la colonización por microorganismos indeseados. Este efecto se ve potenciado por la capacidad de los lactobacilos vaginales para coagregar con los patógenos potenciales. La capacidad de agregación se manifiesta también respecto a otros microorganismos como *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis* y *Candida albicans*, lo cual induce un efecto antimicrobiano notable, probablemente como consecuencia de que el contacto estrecho que se establece aumenta la efectividad del ácido láctico y el peróxido de hidrógeno generados por los lactobacilos.(6)

2.1.1.2 Producción de compuestos antimicrobianos

2.1.1.2.1 Ácidos orgánicos

El pH fisiológico de la vagina es de aproximadamente 4. Este ambiente ácido inhibe parcial o totalmente el desarrollo de la mayor parte de las bacterias procedentes del tracto digestivo y de las de origen ambiental, siendo así un mecanismo de protección de la mucosa muy eficaz, hasta el punto de que un rasgo diferencial de la vaginosis es un exudado con un pH próximo a la neutralidad.(5)

El origen de la acidez vaginal es el ácido láctico que se genera como producto final del metabolismo fermentativo de los glúcidos, que llevan a cabo los lactobacilos residentes y las propias células epiteliales. Las células vaginales tienden a acumular glucógeno, especialmente durante el período comprendido entre la menarquia y la menopausia, por lo que se considera que este glúcido es la fuente de la que deriva la acidez vaginal. Debido a ello, es creencia generalizada que los lactobacilos

escinden el glucógeno a glucosa y ésta a ácido láctico. Sin embargo, no hay evidencia de que la degradación de glucógeno sea una característica general de estas bacterias. De hecho, en los artículos en los que se trata este tema, todos ellos muy antiguos, la evidencia es la contraria. Así pues, es probable que el glucógeno vaginal sea degradado hasta glucosa por las propias células del epitelio, de modo que el papel de los lactobacilos sería la fermentación de dicho azúcar para generar el ácido láctico responsable del antagonismo frente a la colonización por microorganismos indeseados. En apoyo de esta hipótesis está el hecho de que en la vagina aparecen los isómeros L y D del ácido láctico en proporciones semejantes. La generación de ambas formas quirales es característica de *Lactobacillus* spp., mientras que nuestras células sólo generan el isómero L.(2)

2.1.1.2.2 Peróxido de hidrógeno

La producción de agua oxigenada parece ser común entre ciertas especies de lactobacilos como *L. crispatus* y *L. jensenii*, mientras que es excepcional en otras como *L. fermentum* y los lactobacilos que habitan preferentemente en el intestino, como *L. plantarum* y *L. casei*, incluso aunque se aíslen de la vagina. Las cepas productoras de H₂O₂ son más estables en el ambiente vaginal y protegen mejor la mucosa frente a las alteraciones causadas por microorganismos indeseados, incluyendo productores de infecciones de transmisión sexual (ITS) como *Neisseria gonorrhoeae*. (7)

El efecto bactericida del agua oxigenada viene determinado por su capacidad oxidante y por la generación, a partir de ella, de metabolitos como el radical OH⁻, que dañan la integridad del ácido desoxirribonucleico (ADN) celular. Dicho efecto se potencia por la mieloperoxidasa y los radicales haluro, como el Cl⁻, que son abundantes en las secreciones biológicas y cuya elevada concentración en el mucus uterino es especialmente pertinente, sobre todo durante la ovulación.(7)

2.1.1.2.3 Bacteriocinas

Son polipéptidos con actividad antimicrobiana que, al contrario que los antibióticos peptídicos, se sintetizan en los ribosomas. Las bacterias lácticas producen multitud de bacteriocinas, alguna de las cuales, como la nisina, se emplea como conservante alimentario. Suelen ser moléculas anfipáticas que originan la apertura de poros en las membranas e incluso la lisis celular, ya que algunas se unen al lípido II de la pared (el mismo que es reconocido por la vancomicina). Aunque se han descrito múltiples actividades compatibles con la producción de bacteriocinas por lactobacilos de origen vaginal, sólo hay dos casos en los que existe evidencia; uno de ellos es un péptido de 3,8 kDa activo sobre cepas de *G. vaginalis*, mientras que el otro inhibe diversas cepas de *Enterococcus*. Ahora bien, el papel antagonista real de las bacteriocinas no se conoce, ya que su efecto bactericida sólo se ha comprobado *in vitro*.(8)

2.2 Infecciones vaginales

2.2.1 Vaginosis bacteriana (VB)

2.2.1.1 *Gardnerella vaginalis*

Es un bacilo gram variable, tamaño pequeño (0.4 por 1-1.5 micras), pleomórfico, no es móvil y no posee flagelos, endosporas o cápsulas típicas. En frotis vaginales, la tinción de Gram de *G. vaginalis* puede variar de positivo a negativo. La morfología celular en una preparación de Papanicolaou se puede ver en áreas no cosechadas periféricas a las células epiteliales.(9) El hábitat natural de *G. vaginalis* es la vagina, formando parte del 30-40% en mujeres sanas con microbiota vaginal normal.(10) Sadhu y cols. concluyeron que aunque el nivel ultra estructural de la pared celular de *G. vaginalis* muestra organización de gram positiva, su pared celular es inusualmente delgada en la mayoría de las células contribuyendo al misterio del porqué se tiñen como gram variables.(11)

Los anaerobios pueden crecer en número significativo lo que es explicable debido a que *G. vaginalis* produce succinato el cual es necesario para la proliferación de anaerobios. Se ha sugerido que la trimetilamina es la principal responsable del olor a pescado asociado a la vaginosis bacteriana. Las poliamidas pueden contribuir a la descarga anormal al causar exfoliación de las células epiteliales de la mucosa vaginal.(11)

Se ha prestado mucha atención a los posibles factores de virulencia que podrían dilucidar el potencial patológico y el posible papel de *G. vaginalis* o biotipos específicos de *G. vaginalis* en la VB. Se han identificado factores de virulencia putativos en el genoma de *G. vaginalis*. Un factor de virulencia en particular es similar a las adhesinas producidas por especies de *Mycoplasma* que están involucradas en la adherencia al tejido humano.(12)

2.2.1.2 *Mycoplasma* y *Ureaplasma*

Mycoplasma es una bacteria anaerobia facultativa, excepto *Mycoplasma pneumoniae*, que es un aerobio estricto. Una característica típica que distingue el micoplasma de otras bacterias, es la falta de la pared celular. Los micoplasmas pertenecen a la clase *Mollicutes*, al orden *Mycoplasmatales* y a la familia *Mycoplasmataceae*. Esta contiene dos géneros que pueden infectar seres humanos: *Mycoplasma* y *Ureaplasma*, denominados colectivamente como micoplasmas.(13)

El grupo de microorganismos denominados “micoplasmas genitales”, por su localización en las mucosas del tracto urogenital, incluye las especies, *M. hominis* y *Ureaplasma spp.* (con sus dos biovariedades: *U. parvum* y *U. urealyticum*).(14) *M. hominis* y *Ureaplasma spp.* son las especies que con mayor frecuencia colonizan el tracto urogenital humano pudiendo ser aisladas de hombres y mujeres asintomáticos. La mayoría de las infecciones por micoplasmas se limitan a las superficies mucosas, donde se encuentran en estrecha relación y adheridos a las células epiteliales del hospedador.(14)

Se ha descubierto que *U. urealyticum* induce la producción de citocinas proinflamatorias en las células epiteliales cervicales y vaginales y los macrófagos (15), lo que sugiere el potencial de este organismo para contribuir al entorno inmunitario vaginal alterando la MBN. (16)

2.2.2 Vaginitis

2.2.2.1 Candidiásica

La vulvovaginitis candidiásica es una enfermedad inflamatoria de la vagina y vulva, producida por diferentes especies de hongos, (representa el 25% de las vaginitis y el 90% de las mismas) fundamentalmente *Candida spp*, secundaria generalmente a condiciones fisiológicas alteradas que determinan disminución de la inmunidad local. *Candida albicans* es la responsable del 90% de los episodios de candidiasis vulvovaginal. Otras especies menos frecuentes, también denominadas no albicans, como *Candia glabrata*, *Candida tropicalis* y *Canida krusei*, representan el 10% de las candidiasis y han registrado en los últimos tiempos un aumento en prevalencia y un incremento en la resistencia al tratamiento habitual. El 20% de las mujeres asintomáticas en edad fértil tienen *Candida spp* en la microbiota de la vaginal normal. Todas las especies de *Candida* producen síntomas vulvovaginales similares, aunque la gravedad de los síntomas es más leve con *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis*.(17)

Se caracteriza por leucorrea blanca, inodora, acompañada de prurito y dispareunia. Alrededor de 5% de la población femenina presentará candidiasis recurrente definida como 3 o más episodios sintomáticos por año. La toma de material para estudio microbiológico se realiza a nivel de los fondos de saco vaginales o vulva.(10)

2.2.2.2 Tricomoniasis

Trichomonas vaginalis es un protozoo flagelado, móvil, anaerobio estricto, mide de 7 a 23 micrómetros, agente causal de vaginitis y raramente de uretritis en hombres, sobrevive varias horas en orina y semen. La infección puede comprometer: vagina, cuello uterino y uretra. El síntoma más frecuente es la leucorrea serosa o espumosa, de color amarillento o grisáceo, maloliente, que puede acompañarse de prurito y disuria.(10)

El trofozoíto es la forma usual e infectante del parásito. No se han descrito formas quísticas; sin embargo, en situaciones desfavorables, *T. vaginalis* puede interiorizar sus flagelos y adoptar una configuración de pseudoquiste. Posee cinco flagelos, cuatro de ellos anteriores y uno posterior, cuya función es conferirle sus movimientos rápidos de traslación y rotación característicos. Los cuatro flagelos anteriores nacen en el blefaroplasto, encima del núcleo, y recorren el canal periflagelar, que está rodeado por la pelta, una red de microtúbulos que recubre parcialmente las estructuras basales de los cuatro flagelos. El quinto flagelo está formado por un citoesqueleto de actina y tubulina y proporciona un movimiento ondulante. Este flagelo está situado en la parte posterior formando la membrana ondulante, asociada a una estructura llamada costa, cuya función es dar resistencia a la estructura del parásito.(18)

Durante la excitación y el acto sexual, la mujer secreta fluidos que aumentan el pH vaginal; además el semen, que es alcalino, favorece la transmisión del parásito.(19)

A la especuloscopia, se observa eritema vaginal y cervical “cérnix en fresa”, debido a la dilatación de los capilares y a las hemorragias puntiformes.(20)

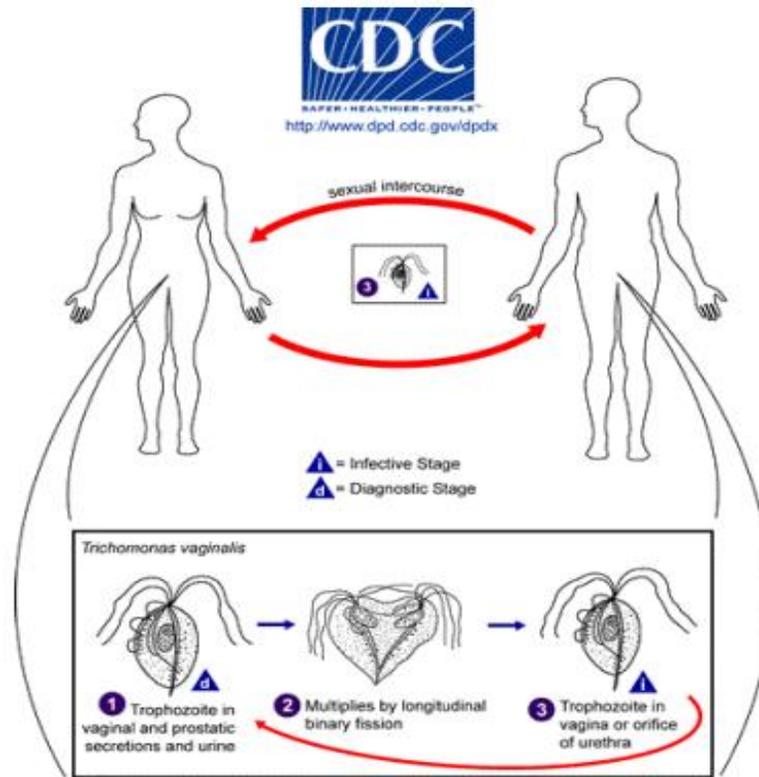


Figura 2. Ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis*. Las etapas que componen el ciclo de vida de *T. vaginalis* son las siguientes: 1) En adultos la transmisión es directa por intercambio sexual. 2) Su reproducción es por división binaria. 3) Los trofozoítos, en general sólo infectan la superficie del tracto vaginal y el cérvix en la mujer. En el varón infectado la localización más común es el epitelio uretral y las glándulas prostáticas. En el contacto sexual con el varón infectado la mujer adquiere el parásito y viceversa. Tomada de www.CDC.com.

2.2.2.3 Vaginitis por *Chlamydia trachomatis*

Es un procarionte inmóvil, morfológicamente cocoide y de tamaño pequeño (0.2 – 0.4 micras), son intracelulares obligatorios, se aproxima mucho a las bacterias gram negativas por su alta concentración de lipopolisacáridos.(21) Una vez que alcanza a un huésped adecuado se adhiere a la superficie de determinados tejidos, generalmente epitelios columnares y penetra en las células de los mismos por medio de un fagosoma. Cuando lleva unas cuantas horas en el interior de las células se transforma en el denominado cuerpo reticulado, que está adaptado a la vida intracelular. En dicho lugar experimenta repetidas divisiones binarias hasta ocupar la mayor parte de la célula y adoptar una morfología peculiar conocida con el nombre de inclusión, la cual es resistente a la acción de los lisosomas. Varias horas

más tarde los cuerpos reticulados, todavía en el interior las inclusiones, se transforman en cuerpos elementales. El cuerpo elemental consiste en un nucleoide central, que está dentro de la pared celular, cuya constitución es diferente a las de las bacterias Gram negativas, ya que el peptidoglicano no contiene ácido murámico.(21) Finalmente las inclusiones se rompen y liberan al exterior de la célula nuevos cuerpos elementales, que pueden contagiar a otras células, e inician de ese modo un nuevo ciclo vital.(22)

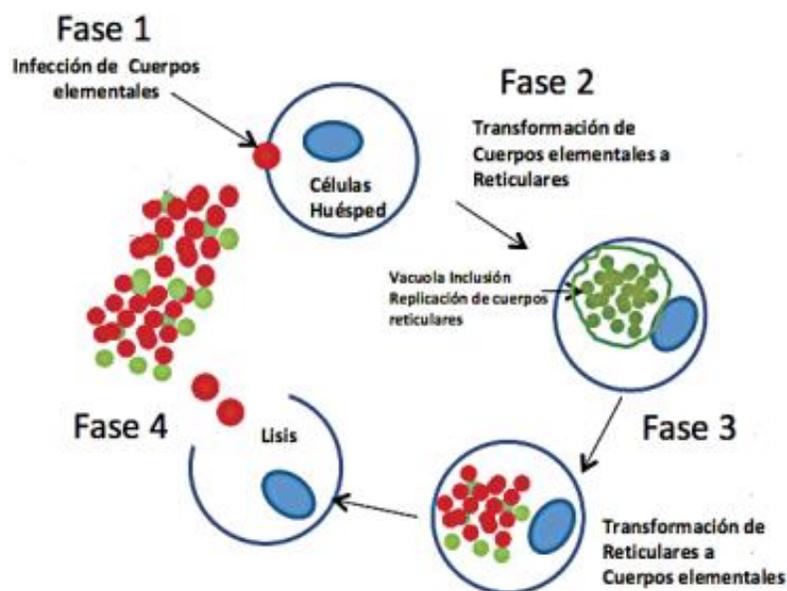


Figura 3. Ciclo de vida de *Chlamydia trachomatis*: Fase 1 infección por cuerpos elementales a la célula huésped, Fase 2 replicación intracelular de cuerpos reticulares, Fase 3 transformación de cuerpos reticulares a elementales para nuevas infecciones, Fase 4 lisis celular debido a los cuerpos elementales, estos invaden nuevas células. Tomado y modificado de Roca, B 2016.(22)

El reservorio es exclusivamente humano; el periodo de incubación en promedio es 3 semanas. Las infecciones sintomáticas son más frecuentes en la mujer. Cuando la enfermedad es sintomática, en el hombre produce uretritis similar a la gonocócica, aunque las secreciones son más escasas y más claras. En la mujer la infección se inicia como cervicitis, si ésta progresa causa prostatitis, epididimitis, salpingitis, rectitis y síndrome de Reiter. La infección de la mujer embarazada causa conjuntivitis en el recién nacido, y neumonitis neonatal tardía.(10)

2.2.2.4 Vaginitis por *Neisseria gonorrhoeae*

Neisseria gonorrhoeae es un coco gram negativo que se agrupa en pares (diplococos) con lados adyacentes aplanados, y apariencia de granos de café. Es un microorganismo intracelular facultativo, no móvil, no esporulado, oxidasa y catalasa positiva. Tiene un crecimiento óptimo entre 35 y 37 °C bajo una atmósfera de CO₂ al 5%. Por sus necesidades nutricionales se considera una bacteria exigente, requiere cisteína, glucosa, piruvato o lactato como fuente de carbono. Algunas cepas necesitan además ciertos factores de crecimiento como aminoácidos, pirimidinas y purinas.(23)

N. gonorrhoeae se considera un patógeno humano obligado que puede crecer y multiplicarse en las mucosas incluyendo el cérvix, útero, y trompas de Falopio en las mujeres, así como en la uretra masculina. Aunque también puede encontrarse en la boca, faringe y ano. Esta bacteria causa la gonorrea, una infección altamente contagiosa, casi exclusivamente de transmisión sexual.(23)

2.3 Cuadro clínico

Cerca de 50% de las pacientes con vaginosis bacteriana cursan la infección de forma asintomática. En los casos sintomáticos, los signos característicos son una secreción blanca o grisácea, fetidez (referida como olor a pescado) a causa de la producción de aminas por múltiples bacterias y prurito vulvar. Menos frecuentes son los síntomas irritativos como ardor vaginal, disuria y dispareunia. La fetidez se puede incrementar en los períodos de menstruación y en el acto sexual desprotegido, pues la alcalinidad de la sangre y el semen favorecen la liberación de las aminas volátiles. En la VB, el pH suele estar por encima de 4.5. Las manifestaciones clínicas son variables. (24)

La candidiasis vulvovaginal aguda se caracteriza por prurito, dolor vaginal, ardor vulvar, dispareunia, disuria y olor levemente desagradable. En la exploración física se advierten eritema y edema vulvar, fisuras, lesiones papulopustulosas, placas

amarillentas-blancas en las paredes de la vagina y cuello uterino y descarga vaginal que varía de acuosa a grumosa espesa (consistencia de requesón), test de aminas negativos y pH vaginal 4.5. (17)

Los síntomas de la tricomoniasis se desarrollan de 4 a 30 días después de la infección. La manifestación clínica más frecuente es la vulvo vaginitis de evolución aguda o crónica y el signo o síntoma más frecuente es la leucorrea, que se presenta como un flujo de tipo purulento y espumoso. La leucorrea puede ser variable en cantidad de color amarillento verdoso o gris, inodora o de olor fuerte. Otros síntomas son el prurito vulvar, ardor y la irritación genital dolorosa que puede llegar a provocar intensa dispareunia. Al espéculo se aprecia vagina en empedrado y cérvix con aspecto de fresa esto por dilatación capilar y las hemorragias puntiformes, generalmente el endocervix no muestra afección y si es así se encuentra una cervicitis mucopurulenta; es importante señalar que esta infección puede coexistir con la presencia de *Chlamydia trachomatis* y/o *Neisseria gonorrhoeae*. (20)

Tabla 1. Características, diagnóstico y tratamiento de infecciones vaginales. Modificada de (25)

Diagnóstico	Vagina normal	Vulvovaginitis por <i>Candida</i>	Tricomoniasis	Vaginosis
Microbiota	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>C. albicans</i> y otras levaduras	<i>T. vaginalis</i>	<i>G.vaginalis</i> , <i>Mycoplasmas</i> y anaerobios
Síntomas	Ninguno	Irritación y prurito vulvar, leucorrea	Leucorrea profusa y mal oliente	Leucorrea mal oliente y abundante
Exudado vaginal	Claro o blanco flocular, no homogéneo	Blanco en agregados adherentes	Amarillento, homogéneo, poco viscoso y a menudo espumoso	Blanco o grisáceo, homogéneo
pH del exudado	< 4.5	< 4.5	> 4.5	> 4.5
Olor a aminas	No	No	Con frecuencia	Siempre
Examen microscópico	Células epiteliales.	Leucocitos, células	Leucocitos	Células clave. Escasos PMN

	Predominio de <i>Lactobacillus</i>	epiteliales, levaduras, seudomicelios en el 80%		<i>Lactobacillus</i> y microbiota mixta
Tratamiento	No	Miconazol	Metrodinazol	Metrodinazol

2.4 Tratamiento

El principal objetivo del tratamiento es eliminar las manifestaciones y signos de la infección vaginal, por tanto toda mujer con sintomatología requiere de tratamiento. En la actualidad, el metrodinazol se ha reconocido como medicamento altamente efectivo contra anaerobios y moderadamente activo contra *G. vaginalis*.

La elección de la terapia para candidiasis se basa en las preparaciones a base de anfotericina B, los agentes anti fúngicos azólicos desempeñan un papel en el tratamiento. La elección de la terapia se basa en sopesar la mayor actividad de las preparaciones a base de anfotericina B y los agentes antifúngicos de equinocandina para algunas especies no albicanas (por ejemplo, *Candida krusei*) frente a la disponibilidad inmediata de formulaciones orales y parenterales para los agentes antifúngicos azólicos. La flucitosina tiene actividad contra muchos aislados de *Candida* pero se usa con poca frecuencia.(26)

Una gran cantidad de gonococos tienen resistencia a la penicilina y a las tetraciclinas. Debido a esta clase de situaciones, el CDC (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades) estadounidense, ubicado en Atlanta, recomienda actualmente a las cefalosporinas o a algunas fluoroquinolonas (ciprofloxacina y ofloxacina), para sustituir a la penicilina y tetraciclina como los fármacos de primera elección para el tratamiento de las gonococcias; cuando la persona es alérgica o manifiesta intolerancia o reacciones adversas a estos medicamentos, el antibiótico recomendado es la espectinomicina. Es importante señalar que, en los últimos años, se han reportado casos de resistencia a las fluoroquinolonas en EUA, Inglaterra, Bangladesh, Grecia y Japón. (27)

La tricomoniasis suele curarse con una dosis oral única del metronidazol, Los síntomas de la tricomoniasis en hombres infectados puede que desaparezcan en

unas cuantas semanas sin tratamiento alguno. Sin embargo, un hombre infectado, aun cuando nunca haya tenido síntomas o cuyos síntomas hayan desaparecido, todavía puede continuar infectando o reinfectando a su pareja sexual hasta que no se trate la infección. Por lo tanto, ambos en la pareja deben tratarse la infección al mismo tiempo para eliminar el parásito. Las personas que se están tratando la tricomoniasis deben evitar tener relaciones sexuales hasta que tanto ellas como sus parejas hayan terminado el tratamiento y no tengan síntomas. (28)

2.5 Epidemiología

Las infecciones vaginales constituyen uno de los principales problemas de salud de nuestros días; se estima que entre 120 - 180 millones de mujeres sufren de infecciones anualmente en el mundo.

En México la "Información Epidemiológica de Morbilidad Anuario 2018 - Versión Ejecutiva", emitida por la Secretaría de Salud y la Dirección General de Epidemiología en 2018, la vulvovaginitis ocupó el 9o lugar entre las 160 causas de distribución de los casos nuevos de enfermedades por fuente de notificación. (Estados Unidos Mexicanos. Población General. 2018).

En el año 2018, el número de casos ha aumentado, en cuanto a incidencia, se registraron las cifras mayores por la Secretaria de Salud a nivel nacional.

La edad y raza de las personas son factores que, según la clínica, no influyen en la presentación de la infección, la cual realmente dependerá del factor de inmunocompromiso asociado; sin embargo, por lo que respecta a la ocupación aunque no es un factor de importancia, se considera que algunas actividades de las personas pueden favorecer la infección.

2.6 Factores de riesgo

Dentro de los factores de riesgo que predisponen a la paciente a padecer vaginosis, los de mayor importancia son los anticonceptivos orales, tener relaciones sexuales sin protección o tener múltiples parejas sexuales. Otras posibles causas que pueden desarrollar vaginosis por descompensación del equilibrio son la retención de tampones, los dispositivos intrauterinos (DIU), diafragmas o parches además del uso de antibióticos de amplio espectro debido a que éstos pueden destruir las bacterias de la microbiota normal de la vagina promoviendo la infección. (29)

Los factores usualmente identificados como asociados a la infección de la vagina por levaduras son el uso de antibióticos de amplio espectro, embarazo, uso de anticonceptivos orales o incluso en algunos trabajos se menciona al uso de dispositivos intrauterinos, como factor asociado. Asimismo, la diabetes y las infecciones por VIH deben de ser consideradas dentro de este grupo. La razón de esta asociación está bien determinada en el caso de la diabetes, ya que es bien conocido que la glucosa en las secreciones vaginales se encuentra incrementada y esta condición predispone el crecimiento y la adhesión del patógeno, sobreviniendo la infección. (30)

Los factores de riesgo más importantes en la vaginitis por tricomoniasis son; prostitución femenina, abuso sexual en niñas premenárquicas, múltiples parejas sexuales, mujeres con gonorrea confirmada, no usar ningún método de barrera, mujeres con otras enfermedades de transmisión sexual, no usar anticonceptivos orales, sexo vaginal no protegido y pareja sexual con uretritis no gonorreica sin tratar. (31)

Otro factor de riesgo importante de mencionar es la menopausia, generalmente ocurre en la cuarta o quinta década de la vida y hay una disminución de la función del ovario. Durante la menopausia se producen niveles más bajos de estrógeno circulante, que a menudo conduce a varios síntomas que experimentan las mujeres durante los años inmediatamente antes y durante la menopausia. Los cambios en

el ambiente vaginal durante la menopausia están acompañados por cambios en la composición de especies del microbiota vaginal. A menudo, esto se manifiesta en una disminución de las proporciones de lactobacilos y producción de ácido láctico, lo que provoca un aumento del pH vaginal que posiblemente hace que la vagina sea más susceptible a las infecciones y exacerba los síntomas vaginales asociados con el VVA. (32)

2.7 Métodos de detección

El diagnóstico de VB ha sido un tema muy controvertido. Se han propuesto distintas metodologías para su diagnóstico. (33)

Entre los métodos más empleados destacan el criterio clínico de Amsel (34) y el criterio de Nugent.(35) En el primero se requiere la presencia de tres de las siguientes características para diagnosticar alguna infección vaginal: pH del flujo vaginal >4.5; presencia de una descarga vaginal gris, homogénea y adherente; liberación de olor a pescado al adicionar KOH al 10% al flujo, y presencia de células claves en la observación al microscopio óptico. En el segundo método se cuantifican los morfotipos correspondientes a bacilos gram positivos grandes, bacilos gram negativos pequeños y bacilos gram variables curvos. La interpretación de los resultados es numérica basada en la puntuación obtenida al sumar las cruces de los morfotipos de las bacterias presentes en la secreción vaginal: 7 ó más puntos son diagnóstico de vaginosis bacteriana, de 4 a 6 puntos se considera intermedio y de 0 a 3 es considerado normal. (36)

En cuanto a los cultivos, no son siempre confiables debido a que se trata de una infección poli-microbiana, por lo tanto, no se recomiendan dada la falta de especificidad. (37) Es importante recordar que se ha demostrado el crecimiento de *G. vaginalis* en 100% de cultivos en mujeres con VB, pero también se ha cultivado en más de 70 % de las mujeres asintomáticas. (38)

2.8 Diagnóstico molecular

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se considera una de las técnicas más sensibles y específicas de las pruebas moleculares. Esta técnica se basa en una replicación exponencial in vitro de una molécula de ADN genómico (ADNg) o ADN complementario (ADNc), mediante ciclos repetitivos. (39)

El proceso que sigue la PCR semeja el proceso de división celular mitótica, en el cual se crea una copia del genoma para cada nueva célula somática. Con la creación de estas copias se duplica la cantidad de ADN que se comparte por igual entre las dos nuevas células. La duplicación del ADN tiene lugar en cada división celular, ya que se crea un organismo multicelular mediante la división celular continua a partir de la célula progenitora original. La copia del genoma único en la célula progenitora original se convierte en muchos miles de millones de copias en el organismo completamente maduro. La PCR se basa en principios similares y componentes aislados de este proceso para así lograr convertir dichas concentraciones muy bajas de ADN en concentraciones muy altas.(40)

Los componentes físicos de la PCR son:

- Templado de ADN, es decir, el ADN que se copia.
- Desoxinucleótidos trifosfatos, el ADN se compone de cuatro nucleótidos diferentes: adenina (A), timina (T), guanina (G) y citosina (C).
- Oligonucleótidos o cebadores, son secuencias cortas de ADN complementarios al templado a las que se une la polimerasa para elongar la cadena.
- Solución tampón de fuerza iónica y pH apropiados.
- Enzima Taq polimerasa, esta se encarga de unir los nucleótidos creando una secuencia complementaria (A-T, G-C).

El desarrollo de la PCR consta de tres pasos básicos (Figura 4):

1. Desnaturalización. Se realiza a 95°C y tiene como objetivo desnaturalizar la doble cadena de ADN y/o destruir las estructuras secundarias del ADN, lo que permite el acceso de los primers a la cadena molde en sus secuencias complementarias. Esta temperatura se mantiene por 30 segundos.
2. Alineación. En esta fase, la temperatura se encuentra en un rango entre 55° y 60°C, en la cual la mayoría de los iniciadores hibridan, esto es, se genera la energía cinética necesaria para que los iniciadores busquen en las cadenas de ADN su secuencia complementaria y formen los puentes de hidrógeno con la cadena molde, dejando el extremo 3'OH disponible y listo para la adición de los nucleótidos consecutivos por la ADN polimerasa.
3. Extensión. Se produce la temperatura óptima para el funcionamiento de la ADN polimerasa empleada, por lo que dependerá ésta para la PCR. En el caso de la Taq polimerasa, la más utilizada es de 72°C.

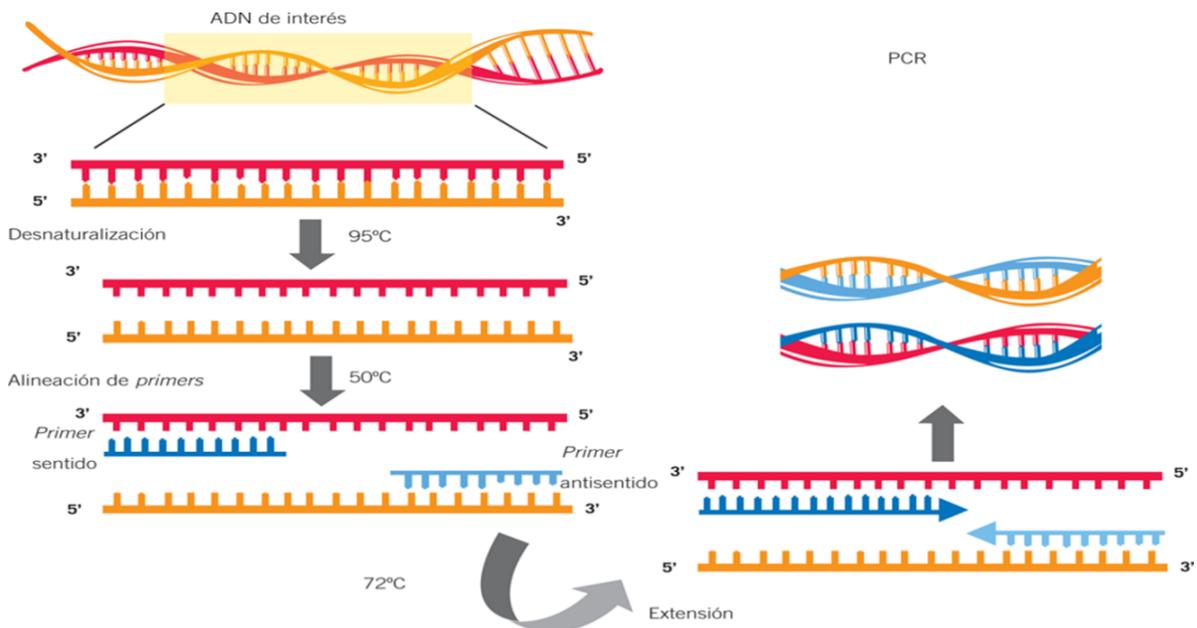


Figura 4. Esquema convencional de una PCR. Los ciclos de PCR constan de los pasos de desnaturalización, alineación y extensión. Estos pasos se realizan mediante el cambio automático de temperaturas en un termociclador. Tomado de Montes, Adriana, 2016. (41)

Una vez terminados los ciclos designados para la PCR, la temperatura de extensión (72°C) se mantiene por cinco minutos, lo que permite que la polimerasa termine la extensión de los productos a los cuales se encuentra unida.

Durante la programación de los ciclos de la PCR se programa también un ciclo final de 4°C por varias horas, lo que permite conservar los productos de PCR hasta que se retiren los tubos de reacción del equipo.(42)

El éxito de la PCR depende del diseño adecuado de los oligonucleótidos los cuales deben tener una alta especificidad y por consiguiente delimitan la longitud del producto amplificado. Las herramientas moleculares ofrecen la oportunidad de estudiar los factores que influyen la microbiota vaginal y la influencia de esta microbiota en la salud humana.(39)

La PCR incrementa el porcentaje de detección de patógenos de muestras mucocutáneas obtenidas con torunda en un 11-41% comparado con el cultivo. Actualmente las nuevas técnicas de PCR a tiempo real totalmente automatizadas permiten la detección en un sistema cerrado con bajos tiempos de respuesta y bajo riesgo de contaminación. (43)

2.9 Aspectos epidemiológicos

En el 2015 Gliniewicz K y cols, realizaron un estudio con muestras de la pared vaginal de diferentes conjuntos de mujeres. Posteriormente, realizaron una extracción de ADN con un kit comercial y llevaron a cabo una PCR de punto final con el fin de identificar los microorganismos patógenos en dos grupos de mujeres, uno que está en edad fértil y el segundo que cursa por la menopausia, esto utilizando primers diseñados y verificados para que así los productos de la PCR se sometieran a electroforesis en geles de agarosa. Las mujeres postmenopáusicas que fueron examinadas estuvieron dominadas por especies estrictamente anaeróbicas y en las mujeres pre menopáusicas tenían comunidades vaginales dominadas por especies de *Lactobacillus spp.*

Un estudio por M. Brotman, D. Shardell en el 2015 con un total de 87 mujeres, que fueron clasificadas como premenopausicas (30), perimenopáusicas (29) y postmenopáusicas (28), en el cual se describió la composición de la microbiota vaginal entre este grupo de mujeres explorando la asociación entre la MBN y AVV. Utilizando la técnica de PCR la MBN se agrupo en seis tipos, de los cuales cuatro estaban dominados por *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* o *L. jensenii*; y otros dos que tenían una abundancia baja de *Lactobacillus* y alto en microorganismos anaerobios. Las mujeres postmenopáusicas se clasificaron en el grupo de baja abundancia de *Lactobacillus* y las mujeres premenopáusicas fueron principalmente dominadas por diferentes bacterias anaerobias como *G. vaginalis* en estado de infección y cuando se encuentran sanas de salud son dominadas por *L. crispatus* y *L. iners* Se encontró que de todas las mujeres diecinueve tenían signos de AVV leve o moderada, en comparación con las mujeres sin AVV, la microbiota vaginal de las mujeres con atrofia leve o moderada tenía 25 veces más probabilidades de ser clasificada como abundancia baja de *Lactobacillus* y alto en microorganismos anaerobios.

En un estudio por N. Fredricks, L. Fiedler y M. Marrazzo en el 2005, identificaron diferentes m.o. en muestras de flujo vaginal con PCR de amplio rango de 16S rDNA y estudiados con el uso de PCR específica de bacterias, con un total de 73 muestras, 27 mujeres con vaginosis bacteriana y 46 sin la afección. Veintiún mujeres fueron estudiadas con el uso de PCR de amplio rango de 16S rDNA, y 73 sujetos fueron estudiadas con el uso de PCR específica de bacterias. Las pacientes que fueron examinadas sin vaginosis bacteriana tenían de 1 a 6 especies bacterianas vaginales en cada muestra, según lo detectado por PCR de amplio rango de 16S rDNA, y las especies de *Lactobacillus* fueron las bacterias predominantes observadas particularmente *L. crispatus* y *L. iners*. Las mujeres con vaginosis bacteriana tuvieron una mayor diversidad bacteriana con 9 a 17 filotipos detectados especialmente *G. vaginalis* y *A. vaginae* por muestra. Los ensayos de PCR específicos de bacterias mostraron que varias bacterias que no se habían descrito previamente eran altamente prevalentes en sujetos con vaginosis bacteriana pero raras en controles sanos como los *Clostridium*s.

En otro estudio por N. Fredricks y L. Fiedler en el 2007, detectaron varias especies bacterianas en mujeres con vaginosis bacteriana mediante el uso de ensayos de PCR, determinaron la prevalencia de cada especie en la vagina, su asociación con VB y la utilidad de la PCR para el diagnóstico microbiológico de VB. Se desarrollaron ensayos de PCR y se aplicaron a 264 muestras de flujo vaginal de 81 mujeres con y 183 mujeres sin VB. Los resultados se compararon con dos métodos ampliamente aceptados para diagnosticar VB, el uso de hallazgos clínicos (criterios de Amsel) y la interpretación de Gram del flujo vaginal (criterios de Nugent). El ensayo de PCR para *L. crispatus* confirmó que no está asociada con la VB. *L. crispatus* se detectó en el 89,6% de las mujeres sin VB y en el 16% de las mujeres con VB. También se detectó *L. iners* y se confirmó que se encuentra comúnmente en mujeres con VB (98.8%) y sin BV (91.3%). Utilizando los criterios de Amsel como el estándar de oro, se detectaron diferentes bacterias anaerobias como *G. vaginalis* y por PCR obtuvieron el 96% de los pacientes con BV, *M. curtisii* en el 55.6% de las mujeres

con BV con una especificidad del 93% y *M. mulieris* en el 22.2% de las mujeres con BV con una especificidad del 100%.

En el 2016 Romero Viamonte, determinó los agentes patógenos más frecuentes en las infecciones de transmisión sexual, diagnosticados por PCR multiplex en todas las mujeres que acudieron al centro de salud. El estudio estuvo constituido por toda la población del sexo femenino que acudió al centro de salud y el tamaño de la muestra quedó conformada por 50 mujeres en edad fértil que acudieron a consulta ginecológica. Luego de la aplicación de la técnica de PCR Multiplex en las pacientes que acudieron a consulta, se pudo determinar la presencia de *Mycoplasma hominis* y *Neisseria gonorrhoeae* (39 %), *Ureaplasma urealyticum* (15 %) y *Trichomonas vaginalis* (7 %).

En consecuencia, la detección por PCR de una o más especies bacterianas anaerobias es un indicador más confiable de BV, aunado al tipo de técnica usado para detectar diferentes MO (microorganismos) y así tener una mayor certeza para aseverar que en el estudio presente se encontraran MO potencialmente patógenos con más frecuencia en comparación con los *Lactobacillus spp.*.

3 Planteamiento del problema

La microbiota vaginal juega un papel importante en la prevención de la proliferación y/o colonización por parte de microorganismos patógenos, su relación con diferentes factores de riesgo, como la menopausia es que al disminuir los niveles de estrógeno, ocasiona una reducción de lactobacilos y una menor producción de ácido láctico, lo que provoca un aumento del pH vaginal, ocasionando que la vagina sea más susceptible a infecciones; sin embargo existe muy poca información sobre el curso de infecciones vaginales en mujeres post menopaúsicas; debido a esto se ha visto la necesidad de estudiar a este grupo de mujeres para proporcionar pruebas más sólidas de una relación causal con las infecciones; utilizando así técnicas moleculares, para la detección de microorganismos potencialmente patógenos, garantizando la eliminación y el alivio de los síntomas, los cuales tienen un impacto en la salud y calidad de vida de las mujeres.

4 Justificación

Las manifestaciones de este tipo de infecciones son bastante similares y carecen de signos o síntomas patognomónicos, razón por la cual el diagnóstico basado exclusivamente en el examen clínico tiene muchas causas de error, debido a esto se ha visto la necesidad de recurrir a técnicas más rápidas y precisas, como el empleo de pruebas moleculares, para la detección de patógenos asociados a estas infecciones.

5 Hipótesis

La detección molecular por PCR de microorganismos patógenos en mujeres que cursan por la postmenopausia, incidirá en la presencia de infecciones vaginales debido a la disminución de los lactobacilos.

6 Objetivo general

Detectar los patógenos responsables de infecciones vaginales en mujeres pre y postmenopáusicas con sospecha de infección, para observar la relación entre la menopausia y la presencia de infección vaginal.

6.1 Objetivos particulares

- Identificar a *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Lactobacillus* por PCR de punto final.
- Identificar a *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* y *Neisseria gonorrhoeae* por PCR en tiempo real.
- Relacionar la existencia de infecciones vaginales con el estado de menopáusico.
- Identificar el método de planificación familiar más frecuente relacionarlo con la aparición de vaginosis bacteriana.

7 Diseño experimental

7.1 Tipo de estudio

Descriptivo-prospectivo-transversal.

7.2 Población de estudio

Se trabajó con 106 muestras de exudados vaginales, 56/106 (53%) mujeres clasificadas como pre menopáusicas y 50/106 (47%) mujeres post menopáusicas de acuerdo a los criterios de Estadios del Envejecimiento Reproductivo (STRAW); con probable diagnóstico de infección vaginal del servicio de displasias del Hospital Juárez de México, durante el primer trimestre del año 2019.

7.3 Criterios de inclusión

- Sospecha clínica de infección por parte del médico especialista
- Sin tratamiento
- Mayores de 18 años

7.4 Criterios de exclusión

- Pacientes con histerectomía
- Muestra insuficiente
- Pacientes con Cáncer cervicouterino

7.5 Material

7.5.1 Material biológico

- Exudados vaginales

7.5.2 Reactivos

- Kit comercial CT/NG/TV BDMAX.
- Kit de extracción de ADN Stratec.
- Isopropanol.
- Bromuro de etidio.
- TBE 10X Invitrogen.
- Marcador Quick-Load® 100 bp DNA.
- Agarosa Sigma.
- Agua inyectable Pisa.
- Primers.

7.5.3 Equipos

- BDMAX Becton Dickinson
- Thermomixer.
- EPOCHH serie 130125D marca BioTek Instrument Inc.
- Centrífuga refrigerada.
- Computadora laptop HP.
- Balanza analítica.
- Micropipetas de 10 μ L, 100 μ L y 1000 μ L Gilson.
- Agitador Vórtex.
- Termociclador.
- Campana de flujo laminar
- Horno de microondas Wirpool.
- Cámara para electroforesis Thermo Scientific.
- Fuente de poder BioRad.
- Gel Doc Ez Imager marca Bio Rad.

7.6 Métodos

7.6.1 Diagrama de flujo



7.6.2 Verificación y diseño de primers

Para verificar la especificidad de los primers seleccionados, se realizó la obtención genómica en la base de datos del NCBI (National Center For Biotechnology Information, por sus siglas en inglés). En la tabla 2 se muestran los primers con el número de pares de bases que amplifica cada uno. De igual forma se verificó mediante un PCR *in silico* los pares de primers, utilizando las plataformas Integrated DNA Technologies (DTI), OligoAnalyzer y MFE primer 3.0 quality control for PCR primers, para verificar la región de hibridación del par de primers.

Tabla 2. Primers obtenidos para la detección de cada uno de los microorganismos.

Microorganismo	Primer Forward	Primer Reverse	Pares de bases
<i>Gardnerella vaginalis</i>	GTGGCCTAACCCCTTTTGGGA	CTGGTAAGGGCGTATGGTGG	506
<i>Candida albicans</i>	AGTCAATCTCTGTCTCCCCTT GC	GTGGTCCTTATTGAGAAAATCT CCG	658
<i>Mycoplasma hominis</i>	AAGGCGAAGGCAGCTTACTG	GATCATCGTTTACGGCGTGG	103
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	TGCAAACGTGCTACAATGGC	TCCAGTCACCGATCCTACCC	266
<i>Lactobacillus crispatus</i>	GGAACCTGCCCCATAGTCTG	GCTGCCTCCCGTATGAGTTT	239
<i>Lactobacillus gasseri</i>	TGCTATCGCTTCAAGTGCTT	AGCGACCGAGAAGAGAGAGA	360

7.6.3 Preparación de primers

Los primers se cuantificarón a 230 y 280 nm mediante un nanofotómetro Pearl marca Implent modelo Implent GmbH serie 3122; los mismos se prepararon a una concentración final de 20 pmol y se llevaron almacenamiento de -20°C hasta su uso. Se verificó cada par de primers determinando la c Cada par de primers se probó de forma individual mediante PCR de punto final para verificar su funcionamiento. El uso de cepas American Type Culture Collection (ATTC) como controles positivos sirvieron para comprobar que los primers amplificaban adecuadamente. Las cantidades utilizadas para la PCR se observan en la Tabla 3 y para el caso de los testigos negativos se utilizó un volumen de 7 µL de H₂O ya que no se cargaba muestra de ADN.

Tabla 3. Cantidades de reactivos utilizados para la identificación da patógenos.

Reactivo	Cantidad
Master Mix	10 µL
Primer Forward	1 µL
Primer Reverse	1 µL
Agua libre de endonucleasas	3 µL
DNA del patógeno	5 µL
Total	20 µL

Las temperaturas empleadas para la estandarización se programaron considerándose **X** como la Ta a encontrar según los resultados obtenidos por cada reacción (Figura 5).

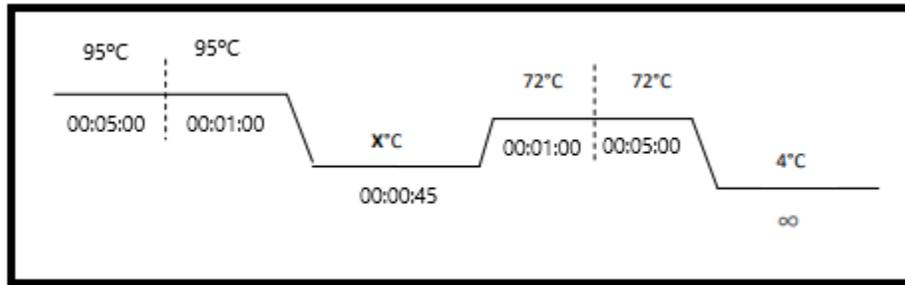


Figura 5. Programa empleado para la estandarización de cada par de primers.

7.6.4 Toma de muestra

La toma de muestra se realizó directamente de la lesión. Es importante instruir e informar a la paciente para evitar que realice duchas vaginales, no estar en su periodo de menstruación, no tener relaciones sexuales por lo menos tres días antes y no aplicar algún tipo de tratamiento local o sistémico durante 10 días previos a la toma de muestra.

Se colocó a la paciente en la mesa de exploración en posición ginecológica, posteriormente se introdujo el espejo vaginal sin lubricante, se localizó el cérvix y se realizó un raspado con el hisopo estéril que se colocará en un medio de transporte hasta ser utilizado.

Se retiró el espejo vaginal del paciente y se desechó en la bolsa roja.

7.6.5 Extracción de ADN

La muestra se mezcló por inversión, se tomó una alícuota de 400 μ L y se transvasó a un tubo de lisis, se dejó incubar en el thermomixer a 70°C por 15 minutos junto con la solución de elución.

Una vez terminado el calentamiento se añadió 400 μ L de isopropanol, se mezcló por inversión 4-5 veces y se centrifugó a 13 000 rpm durante 1 minuto a 4°C, posteriormente se trasvasó a la columna de separación y se centrifugó a 13 000 rpm por 2 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante. Se colocó la columna en un nuevo tubo colector y se añadió 500 μ L de buffer de lavado (R1). Se centrifugó a 13 000 rpm durante 2 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se colocó la

columna en un nuevo tubo de colector, se adicionó 700 μ L de solución de lavado (R2). Se centrifugó a 13 000 rpm durante 2 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se colocó la columna en un tubo colector con tapa, se agregaron 55 μ L de solución de elución y se centrifugó a 10 000 rpm durante 2 minutos a 4°C. Se retiró la columna y se mezcló suavemente.

7.6.6 Cuantificación de ácidos nucleicos

Se usó un espectrofotómetro modelo EPOCHH serie 130125D marca BioTek Instrument Inc. a una longitud de onda 260/230 nm y se cuantificó la concentración del ADN extraído de los exudados vaginales.

7.6.7 PCR de punto final y electroforesis en gel de agarosa

Se adicionaron los reactivos de la tabla 3 en un tubo Ependorff de 0.2mL colocados en un cooler. Se mezcló suavemente en vortex de 3-5 segundos y se centrifugó ligeramente en una mini centrifuga por 5 segundos a temperatura ambiente.

Se programó el termociclador con las condiciones de ciclado mostradas en la tabla 4 y 5, se colocaron los tubos en la placa del equipo y se inició el programa de PCR. Terminada cada reacción de amplificación, se preparó un gel de agarosa al 2%. Para ello en un matraz Erlenmeyer se colocaron 50 mL de amortiguador de TBE 1X y 1.0 g de agarosa, se calentó la mezcla en horno de microondas a intervalos de 15 segundos entre los cuales mezcló suavemente. Una vez disuelta la agarosa se adicionaron 2 μ L de bromuro de etidio, se mezcló bien y se trasvasó en un molde provisto con un peine.

Las muestras se adicionaron en cada pozo del gel de agarosa, cargando 5 μ L de cada producto, en el primer pozo se cargó el marcador de peso molecular de 50–1350 pb. Se realizó la electroforesis a 90 V por 1 hora.

Posterior al tiempo de corrida los geles fueron revelados con el equipo Gel Doc Ez Imager marca Bio Rad y analizados con el software ImageLab 5.

Tabla 4. Condiciones para la detección de *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* y *Mycoplasma hominis* por PCR de punto final.

	95°C por 5 minutos
	94°C por 1 minuto
30 ciclos	60°C por 45 segundos
	72°C por 1 minuto
	72°C por 5 minutos
	4°C HOLD

Tabla 5. Condiciones para la detección de *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri* y *Ureaplasma urealyticum* por PCR de punto final.

	95°C por 5 minutos
	94°C por 1 minuto
30 ciclos	61°C por 45 segundos
	72°C por 1 minuto
	72°C por 5 minutos
	4°C HOLD

7.6.8 PCR en tiempo real

7.6.8.1 Preparación de las muestras

Se destapó el tubo de tampón de muestras BD MAX UVE y se introdujo el hisopo en el tubo con la punta hacia abajo. Se sujetó la torunda por el tapón y se rompió con cuidado el vástago por la marca. Se cerró bien el tapón en el tubo de muestras BD MAX UVE y se colocó en el bloque térmico de precalentamiento BD.

7.6.8.2 Funcionamiento del sistema BD MAX

Se extrajo el número necesario de tiras de reactivos individuales del kit BD MAX. Se colocó una 1 tira de reactivos individual en la gradilla del sistema BD MAX, empezando por la posición 1 de la gradilla A, por cada muestra que se vaya a analizar. Se montó un 1 tubo de extracción (envoltorio metalizado blanco) en la posición 1 de cada tira de reactivos y un 1 tubo de mezcla maestra (envoltorio metalizado verde) en la posición 2 de cada tira de reactivos individual.

Se colocaron los tubos en las gradillas del sistema BD MAX correspondientes a las tiras de reactivos individuales que se montaron anteriormente. Se añadió el número necesario de tarjetas de PCR BD MAX en el sistema, se cargó la gradilla en el equipo y se dio Iniciar. Al finalizar la corrida, se comprobaron los resultados.

7.6.8.3 Análisis estadístico

Los datos fueron descritos con frecuencias y porcentajes para poder determinar la relación entre el estado menopáusico y la presencia de infecciones vaginales, se utilizó la prueba de chi-cuadrada, con un nivel de significancia del 95%. Para la asociación de variables se calculó la razón de momios y sus intervalos de confianza (IC) del 95%. Del mismo modo, se determinó la relación entre los métodos de planificación familiar y la presencia de VB, empleando el programa Startical Product and Service Solutions (SPSS) versión 20.

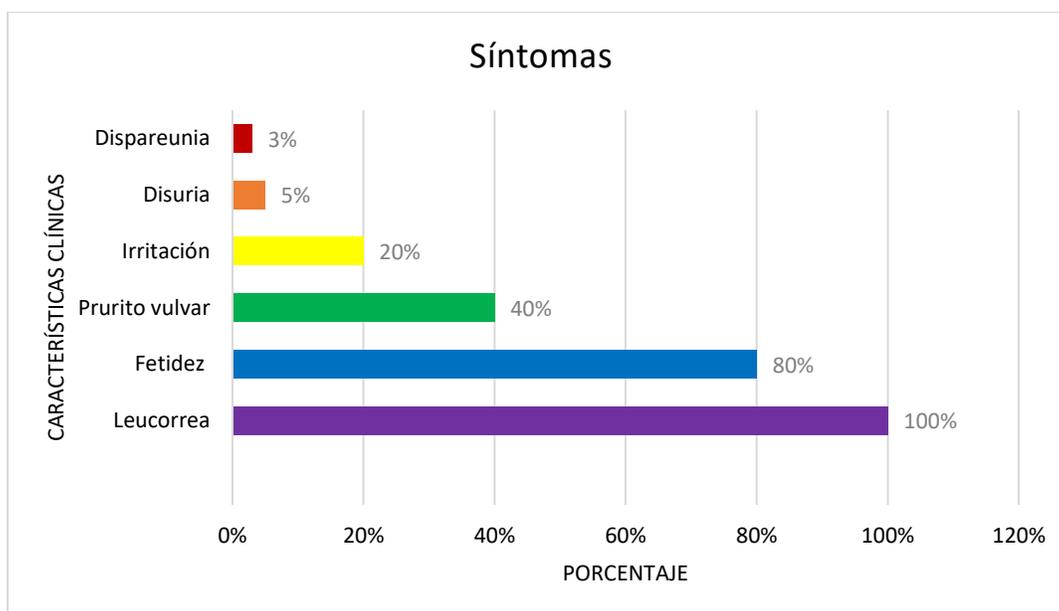
8 Resultados

8.1 Consulta de expedientes

Se realizó una consulta de los expedientes de las 106 pacientes con el fin de obtener manifestaciones clínicas que presentaban al momento de la infección y conocer si usaban algún tipo de método de planificación familiar (MPF).

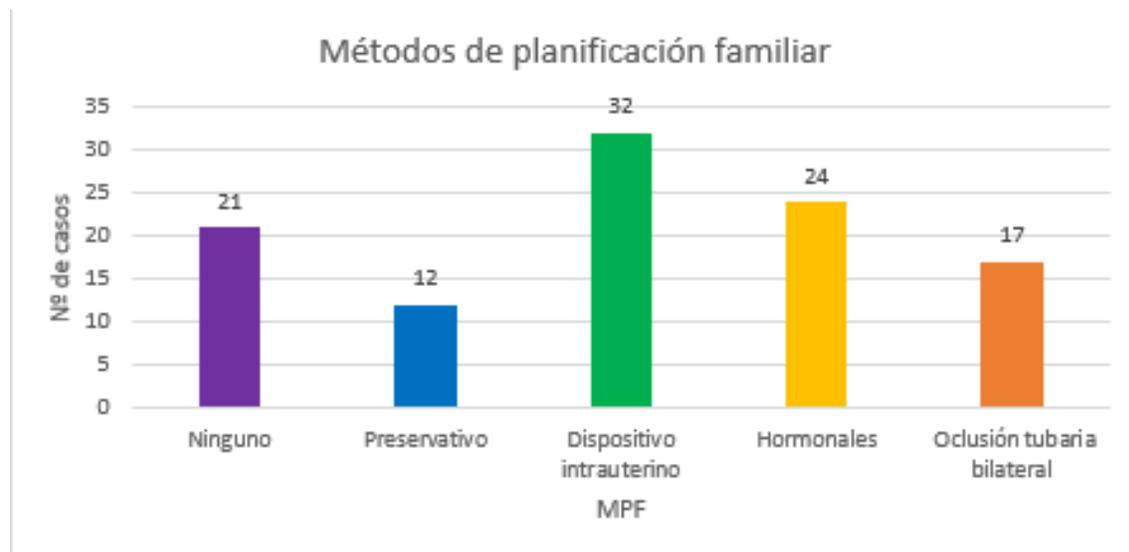
En una mujer sana la presencia de leucorrea y fetidez vaginal no es normal, así que se compilaron principalmente esas dos variables, obteniéndose que 106/106 (100%) de las pacientes obtuvo un resultado positivo para leucorrea y 95/106 (80%) para fetidez.

Por otro lado, también se evaluó el prurito vulvar 42/106 (40%), irritación 21/106 (20%), disuria 5/106 (5%) y dispareunia siendo la que obtuvo el porcentaje más bajo con 3/106 (3%). (Gráfica 1)



Gráfica 1. Características clínicas de las pacientes con infección vaginal.

Asimismo a todas las pacientes se les realizó un cuestionario confidencial y se recolectaron los datos para saber qué tipo de MPF estaban usando al momento del estudio o si lo utilizaron en algún momento de su vida; de las cuales 21/106 (20%) de ellas refirieron no utilizar ninguno en el momento del estudio. El dispositivo intrauterino (DIU) con 32/106 (30%) mujeres y los anticonceptivos hormonales con 24/106 (23%), fueron los métodos más usados y el preservativo con tan solo 12/106 (11%) pacientes fue el más bajo. (Gráfica 2)



Gráfica 2. Recuento de métodos de planificación familiar.

8.2 Verificación de primers por PCR in silico

Antes de iniciar con la detección de los microorganismos se realizó la verificación de los primers con las plataformas biotecnológicas, todo esto con el fin de conocer diferentes factores que podrían afectar la eficiencia de la reacción, como el contenido de CG, temperatura de alineamiento y especificidad, evitando así el alineamiento en secuencias no deseadas y evitando de igual forma, la generación de hairpin o dímeros entre los mismos oligonucleótidos y también verificar el alineamiento de los primers seleccionados para las secuencias a amplificar.

Results

RESUSPENSION

DILUTION

SEQUENCE	5'- CTG GTA AGG GCG TAT GGT GG -3'
COMPLEMENT	5'- CCA CCA TAC GCC CTT ACC AG -3'
LENGTH	20
GC CONTENT	60 %
MELT TEMP	57.7 °C
MOLECULAR WEIGHT	6269.1 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	197200 L/(mole·cm)
nmole/OD ₂₆₀	5.07
µg/OD ₂₆₀	31.79

Figura 6. Resultados de la verificación de primers en la plataforma Integrated DNA Technologies.

Primer list

Primer ID	Sequence (5' → 3')	Binding	Length	GC(%)	T _m (°C)	ΔG (kcal/mol)
P1	AGTCAATCTCTGTCTCCCCTTGC	 P1	23	52.17	62.55	-24.67
P2	GTGGTCCTTATTGAGAAAATCTCCG	 P2	25	44.00	60.30	-24.75

Hairpin list

No hairpins found.

Dimer list

No dimers found.

Figura 7. Resultados de la verificación de primers en la plataforma MFEprimer 3.0. quality control for PCR primers.

Es de interés señalar que esta herramienta también nos ofrece información respecto a la longitud del fragmento que amplifican los cebadores evaluados, en este caso el análisis señala que el tamaño de los productos de reacción esperados para los diferentes microorganismos son: *Gardnerella vaginalis* es de 506 pares de bases (bp), para *Mycoplasma hominis* es 103 bp, para *Ureaplasma urealyticum* es de 266 bp, para *Candida albicans* es de 658 bp, para *Lactobacillus crispatus* 239 bp y para *Lactobacillus gasseri* es de 360 pb.

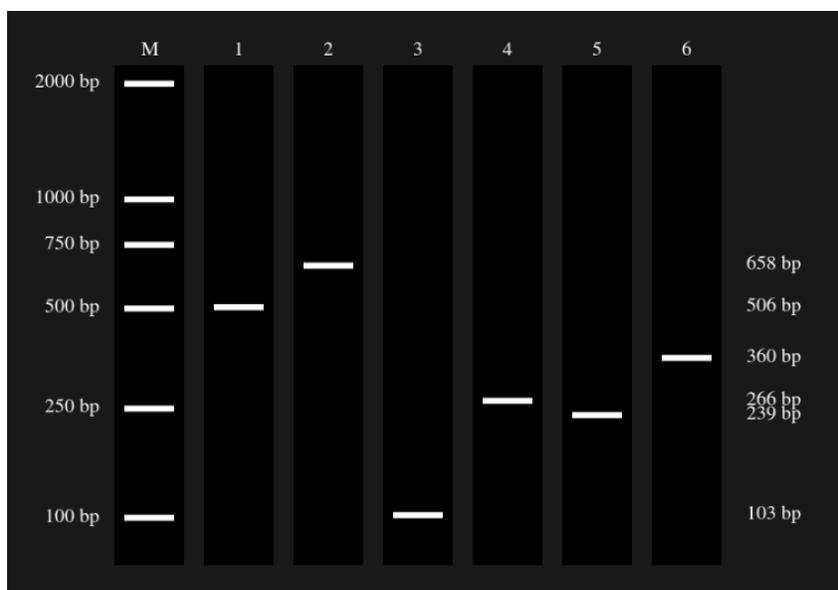


Figura 8. Electroforesis virtual de la detección de los productos amplificados por PCR de los diferentes patógenos. Carril M: Marcador de peso molecular 100 bp, carril 1: *Gardnerella vaginalis*, carril 2: *Candida albicans*, carril 3: *Mycoplasma hominis*, carril 4: *Ureaplasma urealyticum*, carril 5: *Lactobacillus crispatus* y carril 6: *Lactobacillus gasseri*.

8.3 Verificación de los primers por PCR de punto final

Se realizó la PCR a diferentes temperaturas para determinar la T_m óptima para el funcionamiento de cada par de primers de forma individual para cada microorganismo. El uso de controles positivos (cepas ATTC: *Gardnerella vaginalis* 14018™, *Candida albicans* 10231™, *Mycoplasma hominis* 43523™, *Ureaplasma urealyticum* 33698™, *Lactobacillus crispatus* 33820™ y *Lactobacillus gasseri* 33323™) sirvió para comprobar que los primers amplificaban adecuadamente. Iniciado con 57°C ya que fue la T_a obtenida a partir de las evaluaciones *in silico*. Posteriormente, se evaluaron también las temperaturas más altas. A continuación, se presenta la imagen de los resultados obtenidos.

➤ Controles positivos

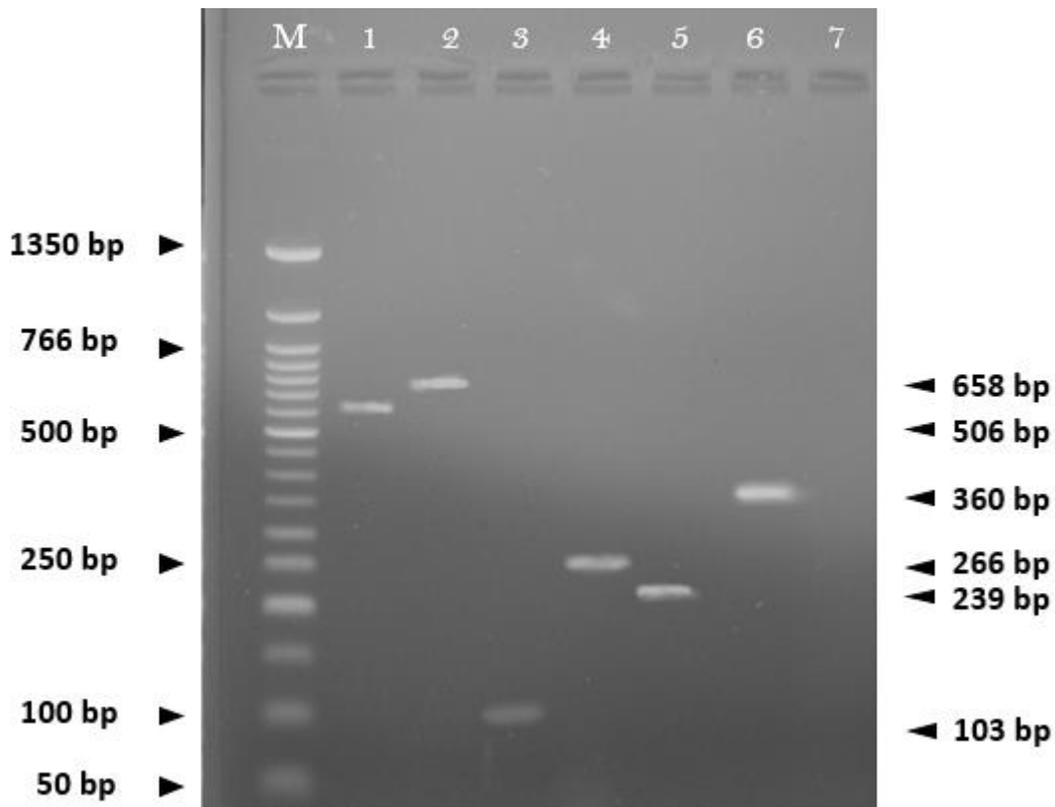


Figura 9. Primers estandarizados por PCR de punto final de los diferentes patógenos. Carril M: Marcador de peso molecular 50 bp a 1350 bp, carril 1: *Gardnerella vaginalis*, carril 2: *Candida albicans*, carril 3: *Mycoplasma hominis*, carril 4: *Ureaplasma urealyticum*, carril 5: *Lactobacillus crispatus* y carril 6: *Lactobacillus gasseri*.

➤ Muestras clínicas

Se iniciaron las reacciones con Ta de 60°C para *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* y *Mycoplasma hominis* ya que fue el valor obtenido mediante los análisis in silico con diferentes herramientas informáticas. A esta temperatura se obtuvieron las bandas esperadas y no hubo productos inespecíficos desde la primera verificación.

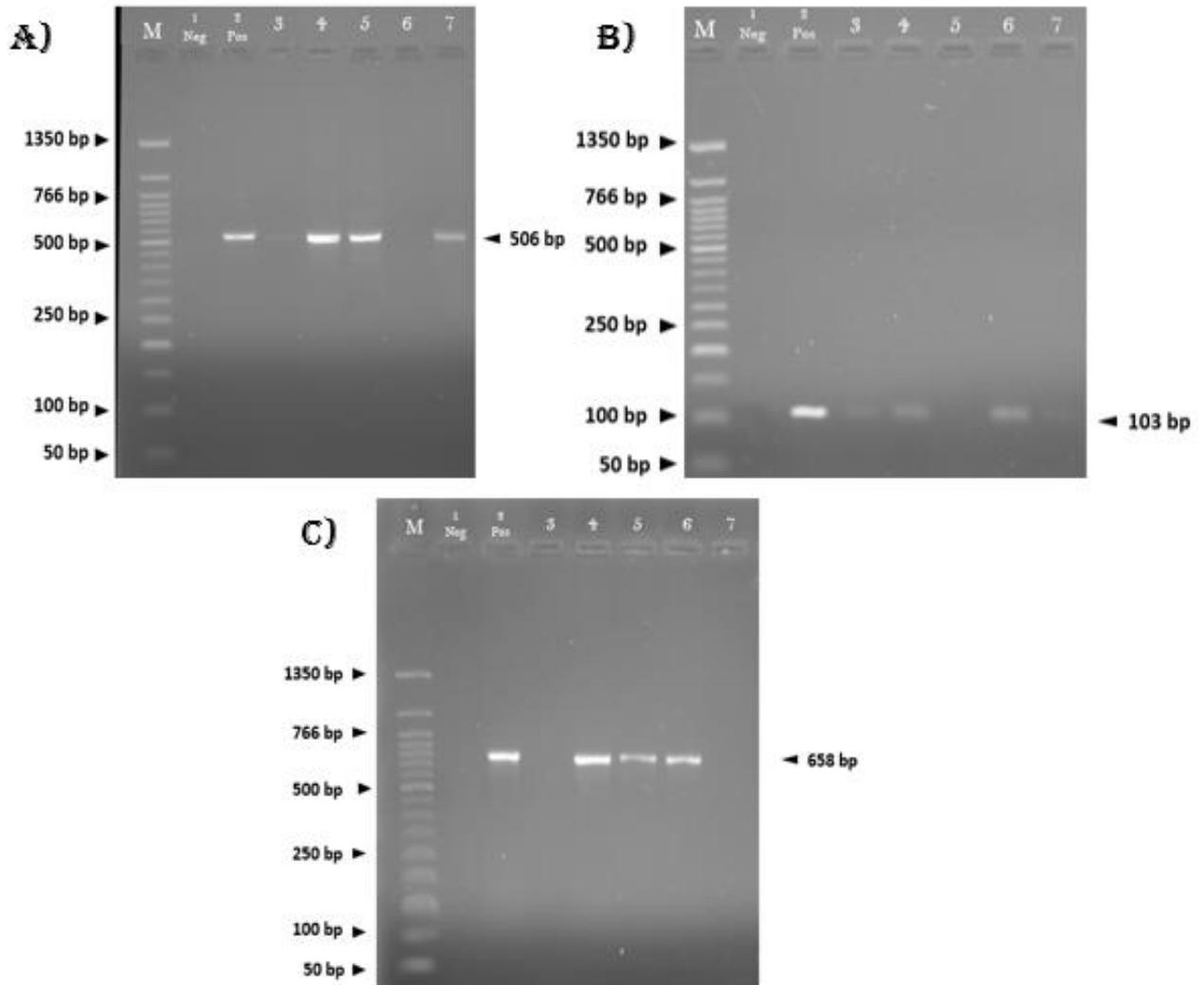


Figura 10. Detección de productos obtenidos por PCR de punto final efectuada a 60°C. Carril M: marcador de peso molecular 50 bp a 1350 bp, carril 1: control negativo, carril 2: control positivo y carriles 3-7 muestras clínicas. En la imagen A) *Gardnerella vaginalis*, B) *Mycoplasma hominis* y C) *Candida albicans*

Para la verificación de amplificación de *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri* y *Ureaplasma urealyticum*, los primers se alinearon correctamente después de modificar la Ta ya que a 60°C no se obtuvieron bandas lo cual es un indicador que esta temperatura no es óptima para la reacción, contrario al resultado de evaluar Ta a 61°C obteniendo las bandas esperadas.

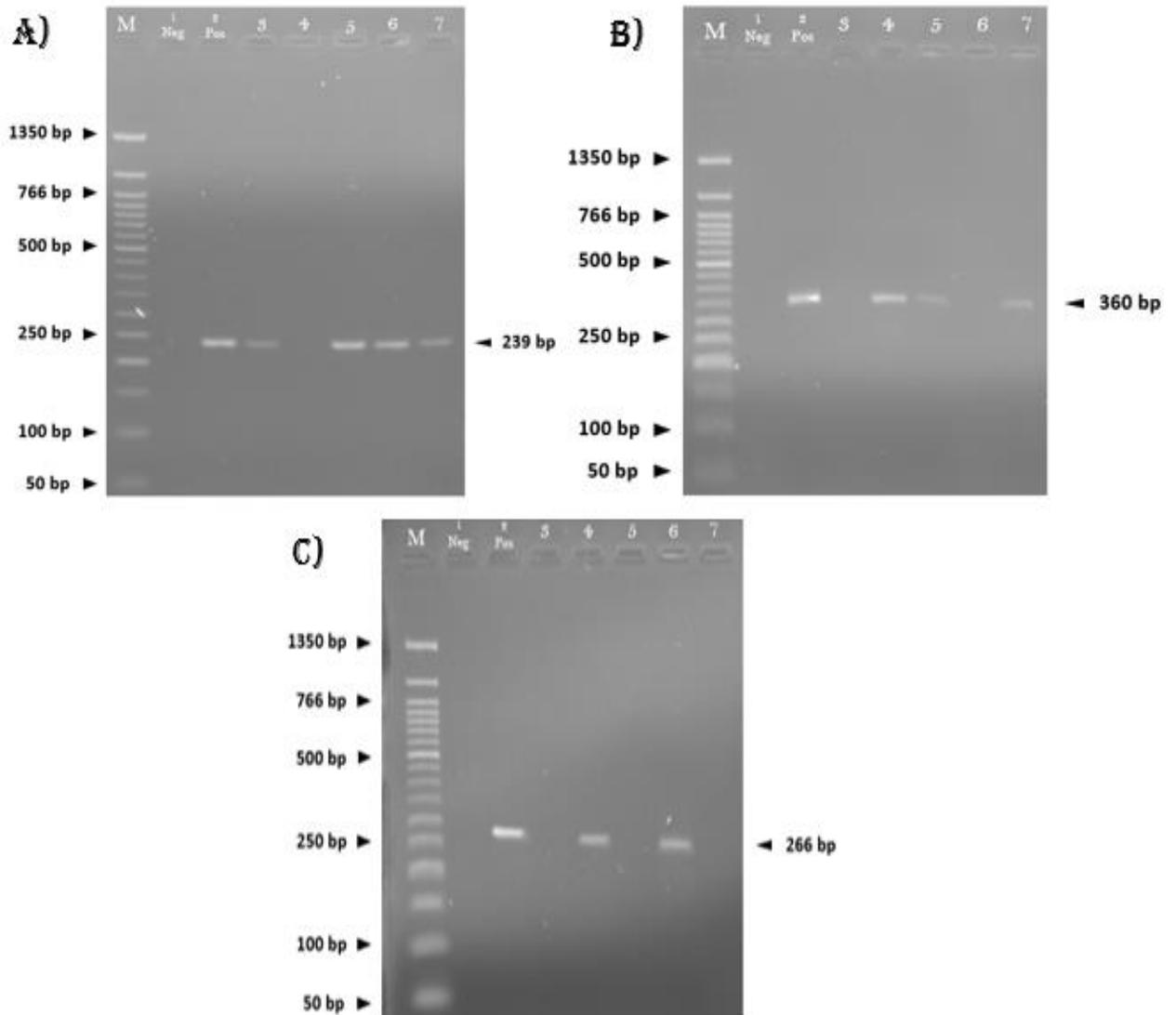


Figura 11. Detección de productos obtenidos por PCR de punto final efectuada a 61°C. Carril M: marcador de peso molecular 50 bp a 1350 bp, carril 1: control negativo, carril 2: control positivo y carriles 3-7 muestras clínicas. En la imagen A) *Lactobacillus crispatus*, B) *Lactobacillus gasseri* y C) *Ureaplasma urealyticum*.

Verificados todos los primers, se realizó el recuento de cada uno de los patógenos en las 106 muestras; dentro de las muestras positivas se obtuvo como más frecuente *Gardnerella vaginalis* con 49/106 (46%), seguido por *Mycoplasma hominis* con 14/106 (13%), *Candida albicans* con 13/106 (12%) y *Ureaplasma urealyticum* con 5/106 (5%) (Gráfica 3).

8.4 PCR en tiempo real, sistema BD MAX

La detección de *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* se llevó a cabo por el procesamiento de las muestras mediante el equipo automatizado BDMAX, en el cual se realizó la extracción de ADN y posteriormente la PCR en tiempo real.

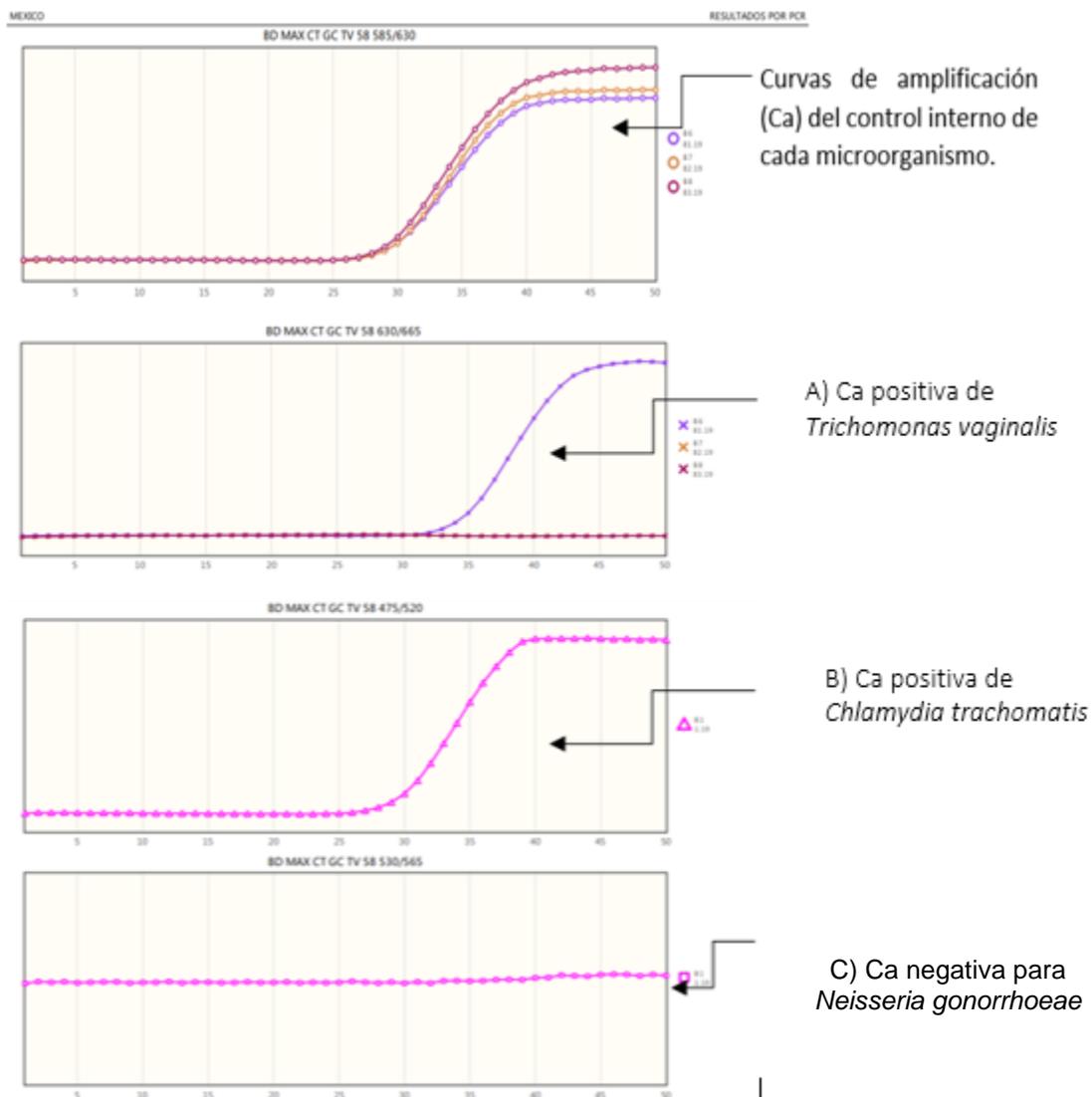
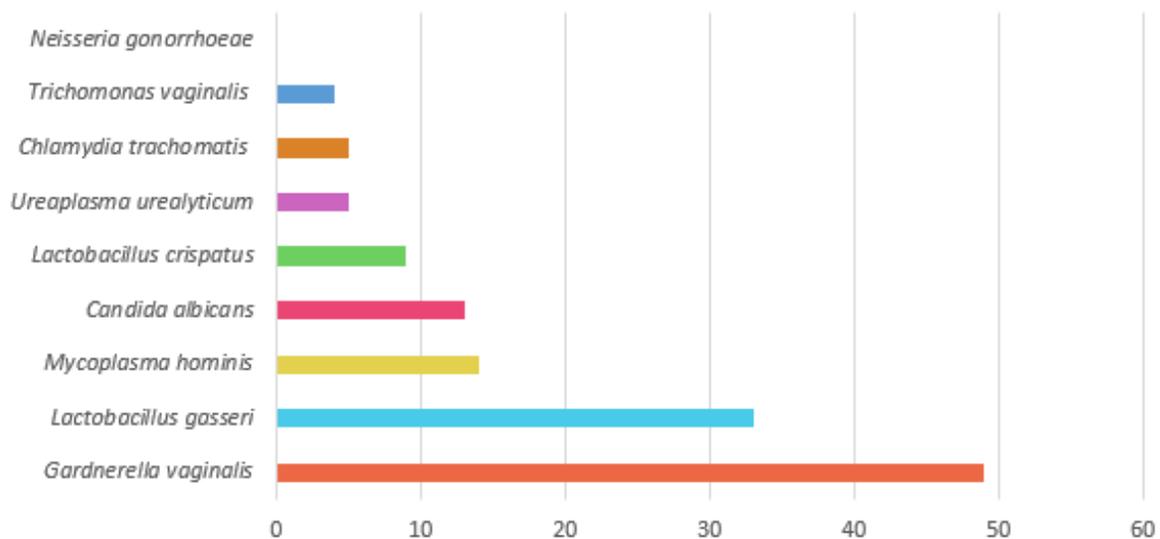


Figura 12. Detección por PCR en tiempo real. A) Se observa una curva de amplificación (Ca) positiva para *Trichomonas vaginalis*, en B) se observa una CA positiva para *Chlamydia trachomatis* y C) se obtuvo una CA negativa para *Neisseria gonorrhoeae*.

Cada cartucho del ensayo, incluye controles de calidad llamados “Control de procesamiento de muestra” (SPC), incluido en el tubo de extracción. El SPC supervisa los pasos de extracción del ADN, la presencia de inhibidores en la PCR, asegura que las condiciones de la reacción de PCR sean las adecuadas y que los reactivos para la PCR sean funcionales.

El sistema BD MAX interpreta automáticamente los resultados de las pruebas; observando las curvas de amplificación se logró identificar la presencia o ausencia de los diferentes patógenos en cada una de las muestras.

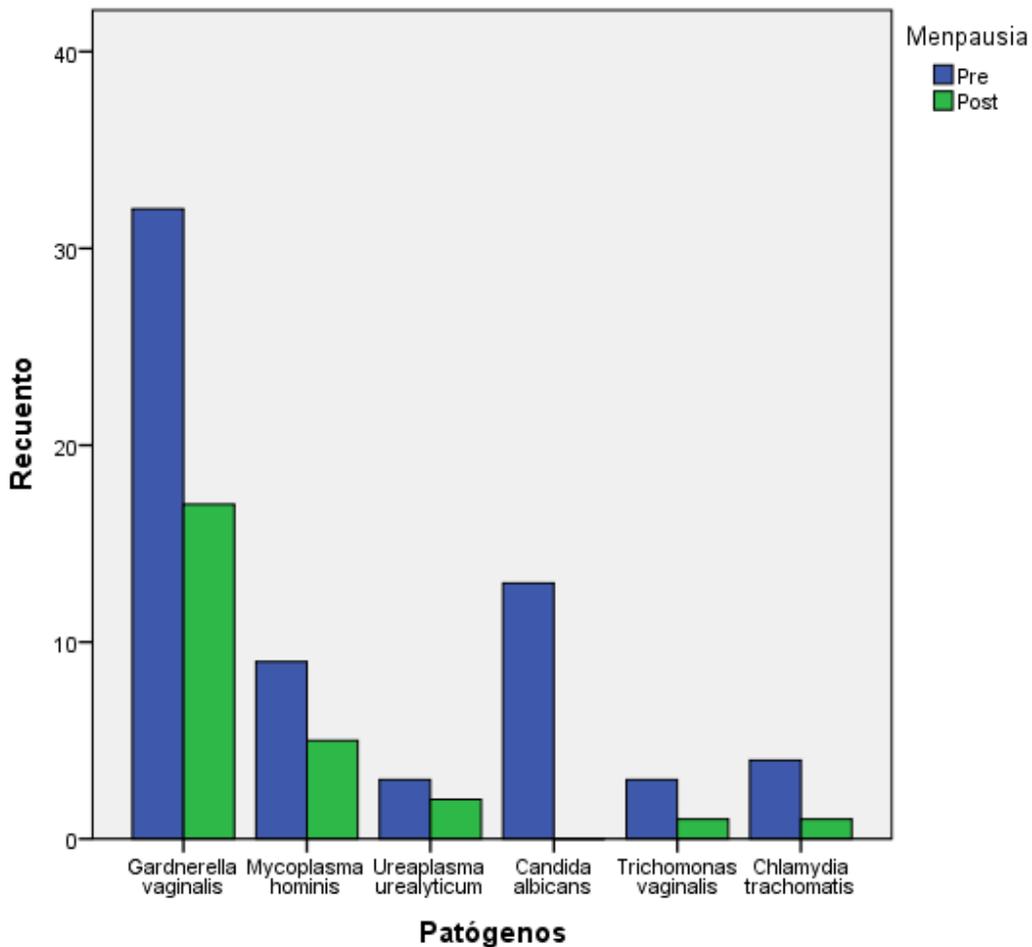
Se realizó el recuento de cada uno de los patógenos causantes de infecciones de transmisión sexual (ITS) en las 106 muestras; dentro de las muestras positivas se obtuvo como más frecuente *Chlamydia trachomatis* con 5/160 (5%) seguida por *Trichomonas vaginalis* con 4/160 (4%), mientras que para *Neisseria gonorrhoeae* no se encontró ninguna muestra positiva, lo que equivale a 0/160 (0%). (Gráfica 3)



Gráfica 3. Recuento de los microorganismos patógenos encontrados en las 106 muestras por PCR de punto final y tiempo real.

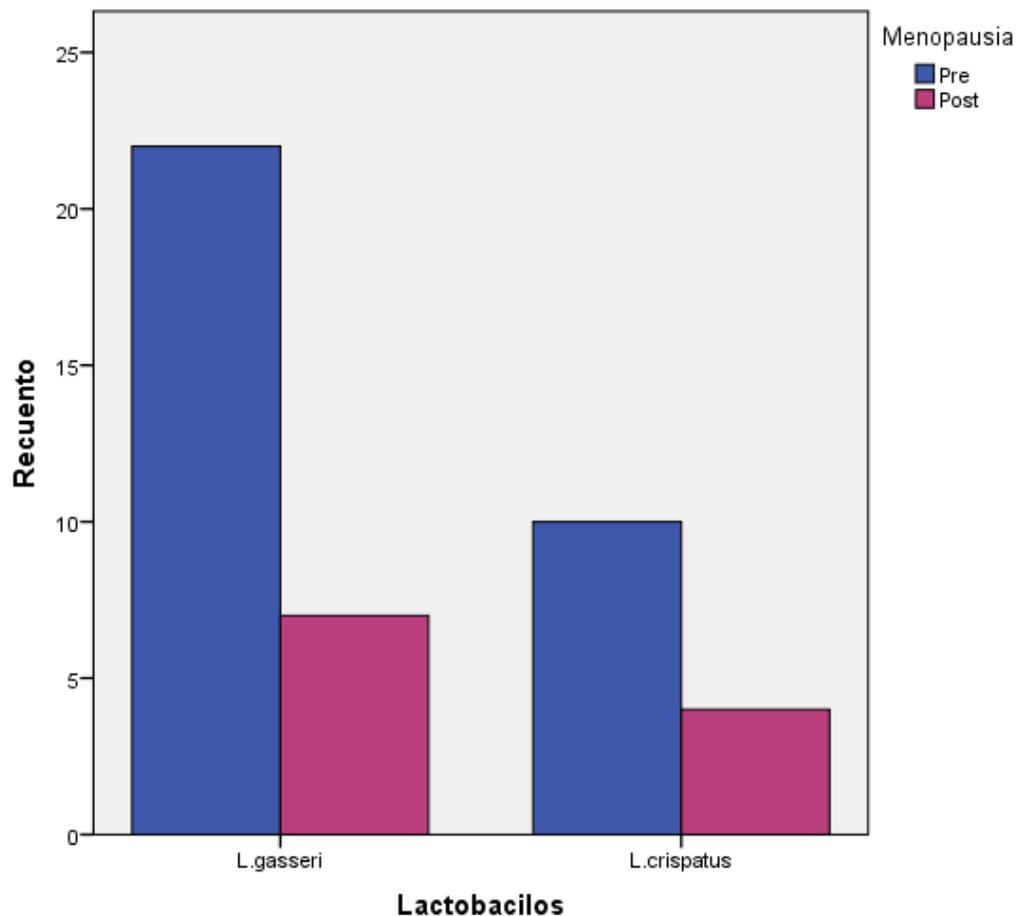
8.5 Distribución de microorganismos patógenos y Lactobacilos entre mujeres pre y post menopáusicas

Una vez obtenido el porcentaje total de cada microorganismo patógeno, se compararon las frecuencias de cada uno de ellos, teniendo en cuenta que en más de la mitad de la población se encontró una coinfección, tanto en pacientes pre como post menopáusicas y se observó que en ambos grupos de mujeres la vaginosis bacteriana causada por *Gardnerella vaginalis* fue la más común seguida por la candidiasis, mientras que las infecciones por transmisión sexual fueron las menos frecuentes en pacientes postmenopáusicas. (Gráfica 4)



Gráfica 4. Recuento de microorganismos patógenos en pacientes pre y post menopáusicas obtenidos del análisis de los geles de agarosa y del sistema BD MAX; con la prueba de chi-cuadrada de Pearson ($p < 0.05$) se determinó si existía o no diferencias significativas entre las dos variables.

Por otro lado, se compararon las frecuencias de lactobacilos (*L. gasseri* y *L. crispatus*) en los dos grupos de mujeres, encontrando una frecuencia más alta de *L. gasseri* y menor de *L. crispatus* en las mujeres pre menopáusicas, así como para las mujeres postmenopáusicas, no obstante, al comparar ambos grupos de mujeres las frecuencias más altas de los lactobacilos se encontraron en el grupo de mujeres pre menopáusicas sin encontrar diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$). (Gráfica 5)



Gráfica 5. Recuento de lactobacilos en pacientes pre y post menopáusicas obtenidos del análisis de los geles de agarosa.

8.6 Distribución entre las infecciones vaginales y la menopausia

Al realizar la prueba de chi-cuadrada de Pearson para comparar la frecuencia de las infecciones vaginales y el estado de menopausia, se encontró diferencia

estadísticamente significativa entre las dos variables ($p < 0.05$), con mayor proporción de infecciones en las mujeres pre menopáusicas siendo un factor condicionante para presentar una infección vaginal (RM=15.3, IC del 95%, $p < 0.05$).

Una vez realizada la estadística entre las infecciones vaginales y la menopausia, se seleccionaron solamente las muestras de las mujeres pre menopáusicas para la identificación de los factores de riesgo más frecuentes, quedando un total de 56 muestras.

8.7 Distribución entre los métodos de planificación familiar y la VB

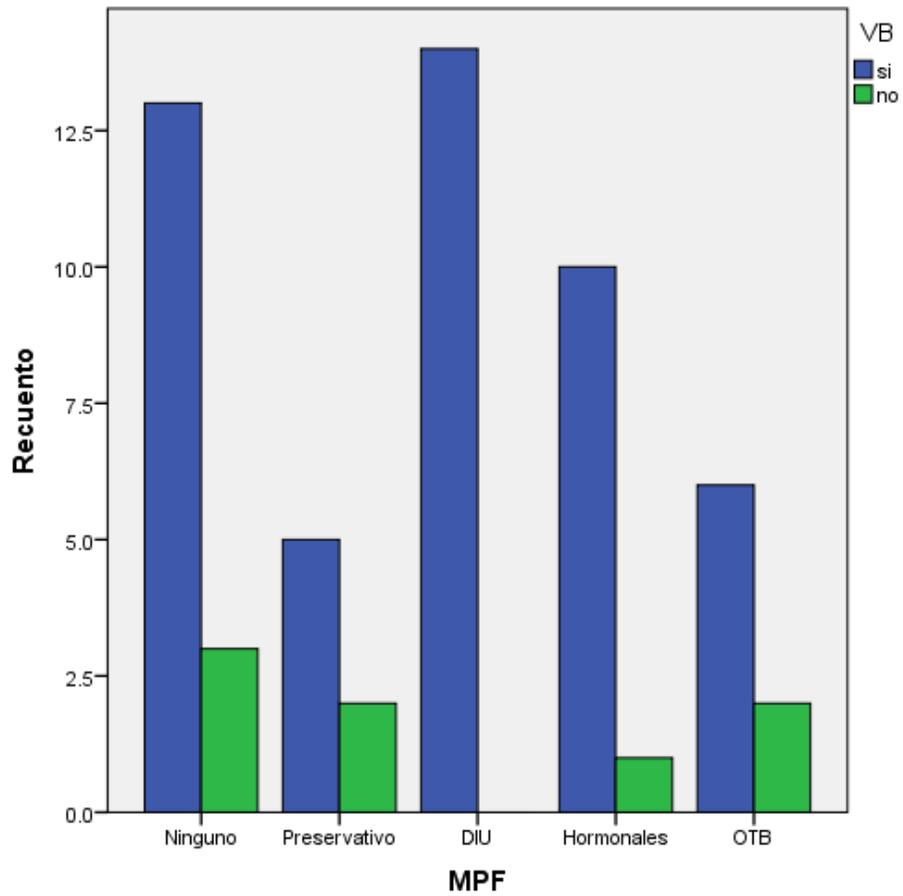
La VB fue la condición más común, con 33 casos (59%), seguida la candidiasis con 11 casos (20%).

Con respecto al método de planificación familiar (MPF), 16 pacientes refirieron no utilizar ninguno en el momento del estudio. El dispositivo intrauterino (DIU) con 14 y los anticonceptivos hormonales con 10 pacientes fueron los métodos más usados y el preservativo con 5 pacientes fue el más bajo. (Gráfica 6)

El análisis estadístico en conjunto indica que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$). Sin embargo, al comparar cada método por separado se hallaron diferencias estadísticamente significativas; en el caso del DIU, la OTB y el preservativo son factores condicionantes de riesgo débil de la VB y los métodos hormonales un factor protector.

Tabla 6. Relación entre los factores de riesgo con significancia estadística y la vaginosis bacteriana estudiados en el grupo de mujeres premenopáusicas.

Factor de riesgo (MPF)	Razón de momios (RM)	Intervalo de confianza (IC)	Valor de p
DIU	1.2	0.9-1.5	0.08
Hormonales	0.4	0.03-4.8	0.48
OTB	1.4	0.18-11.1	0.72
Preservativo	1.7	0.22-13.6	0.60



Gráfica 6. Prevalencia de vaginosis bacteriana en relación con MPF como factores de riesgo.

9 Discusión

El presente trabajo insiste en la importancia que tienen las IV como uno de los principales problemas de nuestros días, provocando importantes problemas en la vida reproductiva de la mujer como la enfermedad pélvica inflamatoria, esterilidad, embarazo ectópico (44), entre otros, puesto que la tasa de morbilidad va en aumento cada año en la población mexicana.

Se estudió la vaginosis bacteriana, la candidiasis y la tricomoniasis debido que a nivel mundial son las infecciones que se presentan con mayor frecuencia y que presentan un riesgo muy importante en las mujeres en cualquier edad; en el HJM se tiene la presencia de estas infecciones ya que es un hospital que atiende mujeres de todas las edades y la presencia de estos padecimientos pero también hay que mencionar que en este trabajo se tomaron en cuenta otros MO que ocasionan complicaciones a las mujeres como son: *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis*.

Para el diagnóstico de las IV es importante mencionar que los resultados obtenidos, están relacionados con la calidad de la muestra (45), por consiguiente en este trabajo se aprendió a realizar una toma de muestra de los exudados vaginales, teniendo en cuenta todas las medidas necesarias para reducir el porcentaje de error.

Respecto a los síntomas que se pueden presentar en una IV, desde un flujo hasta el shock séptico,(46) al analizar las manifestaciones clínicas se encontró la frecuencia más alta en el flujo vaginal, resultados que concuerdan con Medina R. y cols. en 2010 puesto que, expresaron un 97% de las pacientes presentaban flujo vaginal asociándolo como principal síntoma de infección.

Dinc y cols. en 2010 refieren que los criterios de selección empleados para el diseño de los primers son una parte muy importante debido a que, de estos parámetros depende el éxito de la amplificación mediante PCR. Para llevar a cabo el diseño de

los primers se hizo la búsqueda en Genbank de las secuencias de los diferentes microorganismos con los que se trabajó. El cumplimiento de los parámetros para el diseño de cada par de primers fue evaluado y verificado mediante diferentes herramientas bioinformáticas (primer 3 plus, pcr in silico, IDT), con los resultados obtenidos se ratificó que la formación de estructuras secundarias como dímeros y hairpins no presentaban impedimento para su adecuado funcionamiento.

Al final de la PCR, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa. Ahora bien, mediante cepas ATCC se verificó la integridad de cada uno de los primers y posterior a esto, se detectó cada uno de los patógenos en cada una de las muestras clínicas de manera correcta.

La PCR en tiempo real se utilizó para la detección de los patógenos que causan ITS, por medio del sistema BD MAX, que utiliza una serie de reactivos líticos para llevar a cabo la lisis celular y la extracción de ADN.(47) Este sistema al final de cada ciclo de amplificación, interpola automáticamente los algoritmos de cálculo para obtener los resultados. Durante el estudio no se presentó ningún resultado inválido o inhibición de la PCR y los controles internos amplificaron adecuadamente, datos que coinciden con Pineda S. 2015.

Al analizar el estado de menopausia como un factor de riesgo relacionado con las infecciones vaginales se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas; la mayor prevalencia se observó en el grupo de mujeres pre menopáusicas, datos que concuerdan con los de González et al 2007, que obtuvieron una prevalencia de 60%, similar al 53% de este trabajo.

Por otra parte, se aprecia que las mujeres post menopáusicas son el grupo que tiene frecuencias más bajas de lactobacilos, lo cual concuerda con los resultados de M. Brotman en el 2015, que debido al cese de la actividad hormonal y en

consecuencia baja o nulas cantidades de estrógeno,(48) hallaron frecuencias más bajas de estos microorganismos.

En el caso de las mujeres pre menopáusicas sin algún tipo de infección se obtuvo una frecuencia más grande, al analizar los geles de agarosa se pudo observar que las bandas se encontraban muy marcadas, lo cual permite pensar en una vaginosis citolítica. La vaginosis citolítica se produce por el sobre crecimiento de los lactobacilos, lo que ocasiona un aumento del ácido láctico que provoca citólisis de las células epiteliales; los síntomas se asemejan a los que se presentan en la vaginitis candidiásica incluyendo leucorrea de aspecto grumoso.(49)

En el análisis de los factores de riesgo y las mujeres premenopáusicas, al estudiar los diferentes métodos de planificación familiar, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas para la VB, las prevalencias más bajas se presentaron en pacientes que refirieron el uso de preservativo, mientras que las más altas se presentaron en pacientes con dispositivo intrauterino. Con respecto al uso de preservativo, el papel protector de este frente a infecciones de transmisión sexual al evitar contacto está bien documentado. Smart S et al 2010 y en este trabajo se obtuvieron los mismos resultados.

10 Conclusiones

- Se logró detectar a *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Lactobacillus* por PCR de punto final.
- Se logró detectar a *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* y *Neisseria gonorrhoeae* por PCR en tiempo real.
- La técnica de PCR demostró ser lo suficientemente sensible y específica para la detección de todos microorganismos descritos en este trabajo.

11 Perspectivas

Este trabajo da un panorama probable de la situación epidemiológica de nuestra población, asimismo proporciona evidencia de que existe diferencia en la microbiota vaginal entre los grupos de mujeres con pre y postmenopausia, no obstante se necesitan estudios futuros que recluten a un mayor número de mujeres para incrementar los hallazgos, de igual manera se proporciona un impulso para futuros estudios longitudinales diseñados para controlar, modular y restaurar la homeostasis de la microbiota vaginal, lo que proporcionaría pruebas más sólidas de la relación de estas dos variables y, en última instancia, mejorar el tratamiento y la prevención de las infecciones vaginales en cada etapa de la mujer.

12 Referencias

1. Cesar JA, Mendoza-Sassi RA, González-Chica DA, Menezes EH, Brink G, Pohlmann M, et al. Prevalence of self-reported vaginal discharge and associated factors in pregnant women. *Cadernos de saude publica*. 2009;25(12):2705-14.
2. Álvarez-Calatayud G, Suárez E, Rodríguez JM, Pérez-Moreno J. La microbiota en la mujer; aplicaciones clínicas de los probióticos. *Nutrición Hospitalaria*. 2015;32(1).
3. Martínez WM. Actualización sobre vaginosis bacteriana. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 2013;39(4):427-41.
4. Vázquez A, Jakobsson T, Ahrné S, Forsum U, Molin G. Vaginal Lactobacillus flora of healthy Swedish women. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(8):2746-9.
5. Martín R, Soberón N, Vázquez F, Suárez JE. La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2008;26(3):160-7.
6. Boris S, Suárez JE, Vázquez F, Barbés C. Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infection and immunity*. 1998;66(5):1985-9.
7. Hawes SE, Hillier SL, Benedetti J, Stevens CE, Koutsky LA, Wølnner-Hanssen P, et al. Hydrogen peroxide—producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections. *Journal of Infectious Diseases*. 1996;174(5):1058-63.
8. Nes IF, Diep DB, Håvarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V, Holo H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1996;70(2-4):113-28.
9. Catlin BW. *Gardnerella vaginalis*: characteristics, clinical considerations, and controversies. *Clinical Microbiology Reviews*. 1992;5(3):213-37.
10. Barragán LH. Conocer la proporción de cervicitis en mujeres con factores de riesgo en una población de 145 mujeres del municipio de Asunción Ixtaltepec. *Revista de Enfermedades del Tracto Genital Inferior*. 2007;1(1):6-13.
11. Hernández JAS, García LLC, González EV, Gordillo LV, Tapia JAR. Diagnóstico clínico, de laboratorio y tratamiento de la vaginosis por *Gardnerella vaginalis*. *Universitas médica*. 2007;48(4).
12. Reddy SP, Rasmussen WG, Baseman JB. Molecular cloning and characterization of an adherence-related operon of *Mycoplasma genitalium*. *Journal of bacteriology*. 1995;177(20):5943-51.

13. Claudio MZ, Gómez D, Lavayén S, Galeano MG. Infecciones de transmisión sexual por *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis*. *Salud (i) ciencia (Impresa)*. 2013;20(1):37-40.
14. Alarcón T, BAQUERO M, DOMINGO D, LÓPEZBREA M, ROYO G. Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón 17. Diagnóstico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. 2004.
15. Li Y-H, Brauner A, Jonsson B, van der Ploeg I, Söder O, Holst M, et al. *Ureaplasma urealyticum*-induced production of proinflammatory cytokines by macrophages. *Pediatric research*. 2000;48(1):114.
16. Hasebe A, Mu HH, Cole BC. A Potential Pathogenic Factor from *Mycoplasma hominis* is a TLR 2-Dependent, Macrophage-Activating, P50-Related Adhesin. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2014;72(3):285-95.
17. Pineda-Murillo J, Uribarren-Berrueta TdNJ, Castañón-Olivares LR. Candidosis vaginal: Revisión de la literatura y situación de México y otros países latinoamericanos. *Revista Médica de Risaralda*. 2017;23(1):38-44.
18. Diéguez IS. Tricomoniasis, una visión ampliada. *Iatreia*. 2014;27(2):199-205.
19. De Seta F, Restaino S, De Santo D, Stabile G, Banco R, Buseti M, et al. Effects of hormonal contraception on vaginal flora. *Contraception*. 2012;86(5):526-9.
20. Cadena D, Miranda N, Calderón N. Tricomoniasis urogenital. *Rev Paceaña Med Fam*. 2006;3(4):84-9.
21. Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clinical microbiology reviews*. 1997;10(1):160-84.
22. Roca B, editor Infecciones por clamidias. *Anales de medicina interna*; 2007: SciELO Espana.
23. García-Mendiola R, Aguilera-Arreola MG, Contreras-Rodríguez A. *Neisseria gonorrhoeae*. *Revista chilena de infectología*. 2017;34(3):263-4.
24. Morales Parra GI. Aspectos clínicos y diagnóstico de laboratorio de la vaginosis bacteriana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 2015;14(5):611-23.
25. Perea E. Infecciones del aparato genital femenino: vaginitis, vaginosis y cervicitis. *Medicine*. 2010;10(57):3910-4.
26. Calderone RA, Clancy CJ. *Candida and candidiasis*: American Society for Microbiology Press; 2011.

27. Miller WC, Ford CA, Morris M, Handcock MS, Schmitz JL, Hobbs MM, et al. Prevalence of chlamydial and gonococcal infections among young adults in the United States. *Jama*. 2004;291(18):2229-36.
28. Cadena D, Miranda N, Calderón N. Tricomoniasis urogenital. *Rev Paceaña Med Fam*. 2006;3(4):84-9.
29. Hernández JAS, García LLC, González EV, Gordillo LV, Tapia JAR. Diagnóstico clínico, de laboratorio y tratamiento de la vaginosis por *Gardnerella vaginalis*. *Universitas médica*. 2007;48(4):382-95.
30. Reynaud A. Infecciones vaginales por *Candida*: diagnóstico y tratamiento. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*. 2007;57(3).
31. Carrada-Bravo T. Tricomoniasis vaginal. Informe de un caso y revisión de la literatura. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*. 2006;53(3):151-6.
32. Gliniewicz K, Schneider M, Ridenhour BJ, Williams C, Song Y, Farage M, et al. Comparison of the vaginal microbiomes of premenopausal and postmenopausal women. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:193.
33. Eschenbach DA, Hillier S, Critchlow C, Stevens C, DeRouen T, Holmes KK. Diagnosis and clinical manifestations of bacterial vaginosis. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1988;158(4):819-28.
34. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *The American journal of medicine*. 1983;74(1):14-22.
35. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *Journal of clinical microbiology*. 1991;29(2):297-301.
36. Schwebke J, Hillier S, Sobel J, McGregor J, Sweet R. Validity of the Vaginal Gram Stain for the Diagnosis of Bacterial Vaginosis. *Journal of Lower Genital Tract Disease*. 1997;1(2):95.
37. Workowski KA, Berman SM. Centers for Disease Control and Prevention sexually transmitted disease treatment guidelines. *Clinical infectious diseases*. 2011;53(suppl_3):S59-S63.
38. Fernández J, Martínez A, Castillón R, Tamariz J. Vaginosis bacteriana en trabajadoras sexuales que acuden a un centro especializado de referencias de enfermedades de transmisión sexual y SIDA. *Revista Medica Herediana*. 2010;21(1):32-8.

39. Fredricks DN. Molecular methods to describe the spectrum and dynamics of the vaginal microbiota. *Anaerobe*. 2011;17(4):191-5.
40. Waters DL, Shapter FM. The polymerase chain reaction (PCR): general methods. *Cereal Genomics*: Springer; 2014. p. 65-75.
41. Montes AMS, Rodríguez ASS, Borunda JSA. *Biología molecular*: McGraw-Hill Interamericana; 2016.
42. Beas Zárate C, Ortuño Sahagún D, Socorro Armendáriz Borunda J. *Biología molecular: fundamentos y aplicaciones*: Mc Graw Hill; 2009.
43. Martín JA, Galán MAB, Jiménez JAL, Guerra LO, Valdés FV. *microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales*.
44. Reyes AE. Infecciones de transmisión sexual: Un problema de salud pública en el mundo y en Venezuela. *Comunidad y Salud*. 2016;14(2):63-71.
45. García J, Cantón R, García S, Gómez-Lus M, Martínez M, Rodríguez-Avial C, et al. *Procedimientos en Microbiología Clínica, Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2004.
46. Mondeja A, Diana L, Almanza Martínez C, Fernández Limia O. Diagnóstico y prevalencia de infecciones vaginales. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 2010;36(2):62-103.
47. Mitchell M, Dizon D, Libke R, Peterson M, Slater D, Dhillon A. Development of a real-time PCR assay for identification of *Coccidioides immitis* by use of the BD Max system. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(3):926-9.
48. Heredia S, Cervantes García E, Senabre Gallego J, Cano Pérez C, Lorente Betoret M, Barber Valdés X, et al. *Actualidad Científica*.
49. Guevara A, Santiago V, Domínguez A. Vaginosis citolítica: una entidad clínica poco conocida. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*. 2011;71(1):45-8.

