



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E  
INVESTIGACIÓN

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
UNIDAD ACADÉMICA  
COORDINACIÓN DE EDUCACIÓN EN SALUD  
MÉXICO D.F.

**CARACTERIZACIÓN DE LACTOBACILOS BAJO DIFERENTES  
CONDICIONES CLÍNICAS Y CERVICOVAGINALES**

TRABAJO QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN  
GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

PRESENTA:

REBECA CORAL MÉNDEZ ÁVILA

TUTOR DE TESIS  
DR. JUAN CARLOS MARTÍNEZ CHÉQUER

MEXICO, DF

FEBRERO 2015



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.

**CARACTERIZACIÓN DE LACTOBACILOS BAJO DIFERENTES  
CONDICIONES CLÍNICAS Y CERVICOVAGINALES**

TRABAJO QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

PRESENTA:

REBECA CORAL MÉNDEZ ÁVILA

A U T O R I Z A C I O N E S

DR. PELAYO VILAR PUIG  
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA  
U.N.A.M.

DR. ENRIQUE GRAUE WIECHERS  
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE MEDICINA  
U.N.A.M.

**CARACTERIZACIÓN DE LACTOBACILOS BAJO DIFERENTES  
CONDICIONES CLÍNICAS Y CERVICOVAGINALES**

TRABAJO QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

PRESENTA:

REBECA CORAL MÉNDEZ ÁVILA

A U T O R I Z A C I O N E S

DR. OSCAR ARTURO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ  
DIRECTOR GENERAL  
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD  
HOSPITAL DE GÍNECO OBSTETRICIA NO. 4 "LUIS CASTELAZO AYALA"  
IMSS

DR. JUAN CARLOS MARTÍNEZ CHÉQUER  
TUTOR DE TESIS  
DIRECTOR DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN EN SALUD  
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD  
HOSPITAL DE GÍNECO OBSTETRICIA NO. 4 "LUIS CASTELAZO AYALA"  
IMSS

## ÍNDICE GENERAL

	Pág
Resumen	5
Introducción	7
Marco Teórico	8
Planteamiento del problema	13
Justificación	14
Objetivos	15
Metodología	
Diseño	16
Universo	16
Procedimiento	16
Criterios de inclusión	17
Tamaño de Muestra y Muestreo	17
Variables	18
Análisis Estadístico	19
Consideraciones éticas	19
Cronograma	21
Resultados	22
Discusión	34
Conclusiones	38
Referencias	39

## RESUMEN

# CARACTERIZACIÓN DE LACTOBACILOS BAJO DIFERENTES CONDICIONES CLÍNICAS Y CERVICOVAGINALES

Méndez Ávila Rebeca Coral<sup>1</sup>, Salcedo Vargas Mauricio<sup>2</sup>, Martínez Chéquer, Juan Carlos<sup>3</sup>

1. Residente de tercer año de Ginecología y Obstetricia, UMAE HGO4, México, DF. 2.1 Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. 3. Director de Educación e Investigación en Salud en UMAE Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 "Luis Castelazo Ayala". IMSS.

**Introducción:** El microbioma vaginal está compuesto por múltiples microorganismos, dentro de estas especies están los denominados *Lactobacillus spp* entre ellos se encuentran: *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii* y *L. gasseri*. La presencia conjunta entre *Lactobacilos* y otras bacterias (*Gardnerella* y *Atopobium*) no siempre resulta generador de vaginosis bacteriana (VB). Se reconoce ampliamente que el desbalance entre lactobacilos como la flora dominante y otras bacterias Gram negativas pueden dar como resultado una vaginosis bacteriana.

**Objetivo:** Caracterizar el tipo de lactobacilos presentes bajo diferentes condiciones clínicas y cervicovaginales en mujeres mexicanas.

**Material y Métodos:** Posterior a la obtención del consentimiento informado, se llevó a cabo un estudio observacional en 89 mujeres que acudieron a la consulta externa de primera vez. Se clasificaron en 5 grupos de acuerdo a la presencia de descarga transvaginal y/o datos clínicos, incluyendo a un grupo de mujeres con embarazo. En todos los grupos se tomó una muestra de raspado cervical para el aislamiento de *Lactobacillus spp*, mediante metodología estandarizada. Se estimaron medidas de tendencia central y dispersión para el análisis de todas las variables. El protocolo fue autorizado por el Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud de la UMAE HGO 4 con el título original de Detección de bacteriófagos en muestras de raspados del cérvix uterino R-2013-3606-24. El presente trabajo sirvió de base para la posterior identificación de los bacteriófagos.

**Resultados:** El aislamiento de *Lactobacillus spp* se realizó en 65 muestras, donde predominó la presencia de *Atopobium* y *Gardnerella* en más del 95%. En los grupos que incluyeron mujeres con recurrencia de infección, aparentemente sanas y con proceso infeccioso agudo (grupo 2, 3, y 4 respectivamente), predominó la presencia conjunta de *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, y *L. iners*, este último estuvo ausente en el grupo 3 (mujeres con microbioma aparentemente sano). En este estudio se encontró la presencia de *A. vaginae* y *G. vaginalis* en los 5 grupos de estudio con predominancia en el grupo de mujeres embarazadas.

**Conclusiones:** Todas las mujeres incluidas en este estudio fueron portadoras de microbioma mixto, constituida por *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *L. iners*, *L. gasseri* y *L. jensenii*. *L. iners* estuvo ausente en el grupo de las mujeres

aparentemente sanas, que a pesar de cursar con *G. vaginalis* no tuvieron datos de VB quizá por tratarse de cepas de menor virulencia o especie centinela. Todas las embarazadas estudiadas presentaron *G. vaginalis* y *A. vaginae*, especies asociadas con la presentación de parto pretérmino.

**Palabras clave:** Lactobacilos, Atopobium, Gardnerella, vaginosis bacteriana.

## INTRODUCCIÓN

Los lactobacilos son bacterias que forman parte del microbioma vaginal de las mujeres en sus años reproductivos. *Lactobacillus spp* requiere condiciones especiales para su desarrollo, debido a que necesita condiciones anaeróbicas. Entre los diversos ejemplos encontrados se encuentran: *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii* y *L. gasseri* [1]. El ecosistema vaginal es dinámico y contiene microbiota que es protectora contra la invasión de patógenos incluyendo aquellas que causan infecciones del tracto genital, urinario y de transmisión sexual. Se reconoce ampliamente que el desbalance entre lactobacilos como flora dominante y otras, principalmente anaerobias Gram negativas pueden dar como resultado vaginosis bacteriana (VB). Los lactobacilos tienen un papel clave en la inhibición del crecimiento de otras especies bacterianas a través de diferentes mecanismos; pueden ser capaces de interferir con la adherencia de otras especies en las células de epitelio vaginal produciendo compuestos que inhiben la adhesión, estos son ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. De los lactobacilos mencionados se reconoce que *L. crispatus* es uno de los lactobacilos más estables como mecanismo protector en la generación de VB. Se ha mostrado un vínculo entre los lactobacilos y *G. vaginalis* encontrado comúnmente en mujeres sanas ó en mujeres con VB. La presencia conjunta de bacterias (*G. vaginalis* y *A. vaginae*) con lactobacilos bajo condiciones de desequilibrio en el microbioma está vinculada con la presencia de parto pretérmino.



## MARCO TEÓRICO

Las bacterias ácido-lácticas representan un tipo de organismos relacionados funcionalmente por su capacidad de producir ácido láctico durante el metabolismo homo- y hétero- fermentativo. Estas son mayormente Gram-positivas y son organismos anaeróbicos facultativos, los cuales carecen de proceso de esporulación. La clasificación según Dellaglio y colaboradores en el año 2004 las agruparon en 7 grupos filogenéticos: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus*. Cabe mencionar que estos grupos tienen importancia en diversos rubros como los alimenticios, los productos fermentados, las carnes, los vegetales, los vinos y harinas. [2]

En el ser humano, el *Lactobacillus spp* requiere condiciones especiales para su desarrollo, debido a que necesita condiciones anaeróbicas. Estas bacterias son parte del microbioma vaginal de las mujeres en años reproductivos. Entre los diversos ejemplos se encuentran: *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii* y *L. gasseri* [1] Las especies de Lactobacilos (*L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri*, *L. vaginalis* y *L. jensenii*) que dominan la microbiota vaginal hispano-mestiza, son similares a las que predominan en las mujeres de Europa y Norteamérica. Estos resultados están de acuerdo con estudios realizados por Akunam et al. en Nigeria y, más recientemente por Damelin et al. en Sudáfrica. [3-5]

El ecosistema vaginal es dinámico y contiene microbiota que es protectora contra la invasión de patógenos, incluyendo aquellos que causan infecciones del tracto urinario, genital e infecciones de transmisión sexual.[3, 5-7] Se reconoce ampliamente que el desbalance entre lactobacilos como la flora dominante y otras, principalmente anaerobias Gram negativas pueden dar como resultado una VB. [5, 7-9]

Los lactobacilos son las bacterias más conocidas de la microbiota vaginal normal. Tienen un papel clave en la inhibición del crecimiento de otras especies bacterianas. Metabolizan el glucógeno epitelial, tienen capacidad de producir ácido láctico, y especies reactivas de oxígeno tales como  $H_2O_2$  y bacteriocinas lo que las convierte en principales candidatas para la vigilancia de la salud vaginal, porque estas sustancias son desfavorables para el desarrollo de muchas otras especies bacterianas [10], a través de interferir con la adherencia de otras especies bacterianas en las células del epitelio vaginal ó estéricamente. *L. crispatus* parece ser uno de los más estables y exclusivos, comparado con *L. iners* que es menos estable y exclusivo, en consecuencia mujeres que están colonizadas por *L. crispatus* tienen un riesgo disminuido para el desarrollo de VB y las mujeres que están colonizadas por *L. iners* tienen un mayor riesgo para la misma. [6, 11]

Castro y colaboradores en 2013, describieron los efectos mutuos de comensal y patógenos: *G. vaginalis* y lactobacilos vaginales, uno sobre el otro con respecto a la adherencia a las células epiteliales iniciales. La

adhesión es un primer paso en la colonización y el primer paso de la formación de biopelículas, y por lo tanto juega un papel crítico en la patogénesis. Los lactobacilos podrían inhibir la adherencia de *G. vaginalis* causantes de VB a través de impedimento estérico ó mediante receptores de enmascaramiento. *L. crispatus*, tiene un mayor tamaño que *L. iners* e interfiere eficientemente con la adhesión de *G. vaginalis*, lo que sugiere que el tamaño de cada bacteria puede ser uno de los factores que afectan la adhesión. La comprensión de las interacciones entre los lactobacilos, que normalmente componen la microflora saludable y los anaerobios que caracterizan el ecosistema vaginal, en los casos de VB, es de extrema importancia para ayudar a desentrañar la etiología de esta condición. Se ha mostrado un vínculo entre los lactobacilos y *G. vaginalis* encontrada comúnmente en mujeres sanas o en mujeres con VB: mientras que *G. vaginalis* aislada de un paciente con VB mostró un potencial de virulencia superior, *L. iners* era más resistente a la interferencia de *G. vaginalis*. Se ha podido explicar el por qué *L. iners* se encuentra normalmente en concentraciones más altas en pacientes con VB; una prueba más de la existencia del carácter virulento y no virulento para las cepas de *G. vaginalis*. [3, 11] *L. iners*, *L. gasseri* y *L. jensenii* fueron aislados a partir de mujeres con microbiota normal y VB. La presencia de estas especies de lactobacilos en las mujeres podrían ser debido a su pobre resistencia a la colonización, lo que permite el crecimiento excesivo de otras bacterias o debido a su mejor resistencia para las condiciones ambientales asociadas con VB. [3]

El reporte de un estudio longitudinal en mujeres embarazadas ha demostrado que las que albergan estas especies de lactobacilos, en particular *L. gasseri*, *L. iners*, son más susceptibles a VB en comparación con las mujeres colonizadas por *L. crispatus*. También se ha sugerido que *L. iners* puede convertirse en una parte dominante de la microbiota vaginal cuando el microbioma está en una etapa de transición entre anormal y normal. [3, 12]

Sin embargo, la presencia de lactobacilos no siempre puede ser beneficiosa, porque ciertos lactobacilos no contribuyen al bienestar vaginal. En general, una condición de *Lactobacillus* deficiente, caracterizada por un sobrecrecimiento de los anaerobios, se asocia con el desarrollo de numerosas infecciones, tales como VB y vaginitis aerobia, y promueve la adquisición de enfermedades de transmisión sexual, incluyendo gonorrea, clamidia, sífilis, tricomoniasis; muchos producen peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, y así, estos compuestos pueden inhibir la crecimiento de otras especies bacterianas. [6]

La composición de la flora vaginal en las mujeres de edad reproductiva ha sido bien descrita y en términos generales se pueden clasificar como normal y consistente con VB según la definición de los criterios Nugent Gram. [13] Las dos últimas categorías de la flora vaginal muestran clara asociación con resultados adversos tales como el parto pretérmino y la adquisición de enfermedad de transmisión sexual, quizás, debido en parte

a la producción local de citoquinas asociadas con estos cambios. [14]

Una gran cantidad de mujeres en el mundo sufren de infección vaginal comúnmente conocida como VB, se encuentra con más frecuencia en las mujeres en edad fértil, pero también puede ser encontrada en la menopausia, y poco común en niñas. En las mujeres caucásicas la prevalencia es de 5 a 15%, en África y en las Afroamericanas del 45 a 55%. En Asia la prevalencia está menos estudiada, pero en general es de alrededor de 20 a 30%. Aproximadamente la mitad de las mujeres con VB no tienen síntomas. Sin embargo, a menudo las mujeres admiten un aumento de la secreción vaginal y refieren un olor desagradable cuando son interrogadas.[15]

La alta prevalencia, alta tasa de recaída, y las complicaciones asociadas, hacen de la VB un trastorno de suma importancia a nivel mundial.[6, 15, 16] La VB es una causa común de descarga vaginal anormal, así mismo es un continuo de síntomas físicos relacionados a los cambios en la microbiota vaginal por *Lactobacillus* dominada por mezcla de anaerobios incluyendo *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella spp*, *Atopobium*, *Peptostreptocci*, *Mobiluncus spp*, y otros organismos que causan incremento del pH. La VB está fuertemente asociada con el número de problemas de salud reproductiva tales como parto pretérmino, enfermedad pélvica inflamatoria e incremento en la vulnerabilidad a infecciones sexualmente transmitidas, incluyendo VIH.[6, 10, 15, 17] Existen dos teorías que tratan de explicar la existencia y la recurrencia la VB: 1) los lactobacilos desaparecen debido a factores ambientales tales como duchas vaginales, agresiones frecuentes de pH debido a la relación sexual u otros factores y 2) algunos lactobacilos son atacados por virus específicos (bacteriófagos) y no son capaces de recolonizar la vagina, facilitando un sobre crecimiento anaeróbico. [15]

Los recientes avances en técnicas moleculares han aumentado nuestro conocimiento acerca del ecosistema microbiano de la VB, asociando algunas bacterias por primera vez. Una de las más interesantes pueden ser *Atopobium vaginae*, bacteria anaerobia más resistente asociada con VB. Se ha descrito una relación inversa entre la desaparición de especies de lactobacilos y el desarrollo de *Gardnerella vaginalis* y *Atopobium vaginae* en particular. Aunque *G. vaginalis* y *A. vaginae* están comúnmente presentes en la flora normal, en altas concentraciones vaginales son muy específicas para VB y están asociadas a recurrencia después de tratamiento.[18]

La VB está asociada con la disminución de la cantidad de lactobacilos existentes en la vagina. Al día de hoy se carece de una prueba definitiva de las modalidades de tratamiento en la cura de esta enfermedad, [16] sin embargo, datos recientes han sido de utilidad en el perfeccionamiento de las hipótesis relacionadas con su patogénesis. *Gardnerella* está siempre presente en la flora vaginal de las mujeres con VB y esto ha sido confirmado por varias técnicas moleculares. Los factores más virulentos, tales como adherencia y

citotoxicidad, están asociados con *G. vaginalis* que con otras bacterias. [19]

Se ha demostrado que *Gardnerella vaginalis* sólo se asocia con la adquisición de enfermedades de transmisión sexual y la producción de citoquinas. Por lo tanto, se podría argumentar que la óptima salud vaginal debe definirse estrictamente como la presencia de lactobacilos sin evidencia de *G. vaginalis*. [14, 20] La hipótesis de que *Gardnerella* es el patógeno necesario para el inicio de la alteración de la flora vaginal no niega el concepto de que la VB, especialmente aquella que es sintomática, sea causada por una comunidad de bacterias. Es probable que *G. vaginalis* sea una razón necesaria pero no suficiente para la producción de síntomas que caracterizan una VB. Recientemente se ha sugerido que puede haber diferencias en las propiedades de virulencia entre diferentes cepas de *Gardnerella*. [6, 19]

Se ha descrito que la microflora vaginal, en los casos de VB, forma una biopelícula de múltiples especies en las que *G. vaginalis* es la cepa bacteriana dominante. Las biopelículas son estructuras bacterianas unidas a una superficie y embebidas en una matriz protectora y se sabe que son más resistentes que las células planctónicas a la respuesta inmune del huésped y también para la terapia con antibióticos. [6]

Las biolaminillas de *G. vaginalis* se caracterizaron por un aumento de la tolerancia al peróxido de hidrógeno y ácido láctico cuando se compararon con las células planctónicas. Sin embargo, no está claro si algún acontecimiento provoca una caída en el población de lactobacilos, que a su vez hace que las condiciones sean propicias para el crecimiento de otras bacterias, especialmente asociadas a VB como *G. vaginalis*, que sean capaces de desplazar a los lactobacilos, o si estos dos factores no están directamente relacionados. [6]

El microbioma vaginal durante el embarazo se ha investigado por varios grupos de muestreo del fondo de saco posterior de la vagina, el epitelio de la pared vaginal o la secreción vaginal durante la gestación. Por ejemplo, una preponderancia de lactobacilos específicos: *L. acidophilus* y *L. iners*, pero no para *L. crispatus* o *L. jensenii*, estaban en el fondo de saco posterior de las mujeres embarazadas en la ciudad de México; en mujeres japonesas embarazadas con bajos puntajes de Nugent documentados se detectaron especies utilizando PCR, que incluyó: *L. crispatus* 61%; *L. jensenii* 30%; *L. gasseri* 34%; y *L. iners* 40%. En mujeres embarazadas belgas se encontraron cultivos específicos para: *L. crispatus* 25%; *L. gasseri* 23%; *L. jensenii* 15%; y *L. rhamnosus* 11%. No obstante, también se ha detectado un porcentaje relativamente alto de *L. gasseri* y *L. iners* en población Europea. [21]

La infección, manifiesta ó subclínica, se cree que representa aproximadamente el 25-40% de todos los partos pretérmino. [22] Una condición es la VB, la cual está asociada con un riesgo significativo de nacimientos

pretérmino. Es una condición relativamente común en mujeres embarazadas, 23% en mujeres de raza negra y 9% de mujeres caucásicas están afectadas [23]

El tratamiento para la vaginosis incluye tres antibióticos aprobados: metronidazol, tinidazol y clindamicina. Tanto metronidazol y clindamicina se puede aplicar localmente en la vagina o tomar por vía oral con similar eficacia y son efectivos en el embarazo. A fin de evaluar el tratamiento completo, *curación* se define como la puntuación de Nugent de 0 a 3 y todos criterios Amsel negativos.[15]

El efecto del tratamiento para VB sobre las tasas de reducción de nacimientos pretérmino no han sido significativas; la terapia con metronidazol vaginal se ha asociado con un mayor riesgo de parto pretérmino en algunos grupos. La resistencia a agentes antimicrobianos pueden deberse a la supervivencia de ambos microorganismos como biolaminillas sobre el epitelio vaginal después de la terapia farmacológica. Aunque es evidente que los microorganismos vaginales asociados con VB se relacionan con un mayor riesgo de parto pretérmino (*G. vaginalis* y *A. vaginae*), el papel de los taxones de la flora microbiana específica es mucho menos clara y sus efectos específicos sobre el resultado del embarazo no se conocen del todo aún, sin embargo, se sospecha de una alta relación con la generación de parto pretérmino.[18, 22-24]

El parto pretérmino, definido como un parto antes de 37 semanas de gestación, se produce en 5-13% de todos los embarazos y son atribuidos en gran parte a la VB. El aumento de los niveles de ácido láctico por bacterias productoras y especies de lactobacilos también se asociaron con una disminución en el riesgo de parto pretérmino, sin embargo no se ha encontrado efectos similares en los niveles para *Atopobium*, que también produce ácido láctico. Hubo una asociación significativa de *Atopobium* y un mayor riesgo de parto pretérmino (RR, 1,44; IC95%, 1.1 - 1.87), pero esto se modificó fuertemente por grupos raciales/etnia.[22] La prevalencia de VB durante el embarazo oscila de 6 a 55% y está asociada con un riesgo dos veces mayor de parto pretérmino y con aumento del riesgo de aborto espontáneo entre las 13 y 24 semanas de gestación. [5, 15, 18]

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el ser humano, el *Lactobacillus spp* requiere condiciones especiales para su desarrollo, debido a que necesita condiciones anaeróbicas. Estas bacterias también son parte del microbioma vaginal de las mujeres en años reproductivos. Las especies de *Lactobacillus* (*L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri*, *L. vaginalis* y *L. jensenii*) que dominan la microbiota vaginal hispano-mestiza realizan funciones importantes como barrera natural contra infecciones por parte de otros microorganismos.[7]

Se reconoce ampliamente que el desbalance entre lactobacilos como la flora dominante y otras, principalmente anaerobios Gram- negativos pueden dar como resultado una VB. La comprensión de las interacciones entre los lactobacilos, que normalmente componen la microflora saludable y los anaerobios que caracterizan el ecosistema vaginal como en el caso de VB, es de extrema importancia para ayudar a desentrañar la etiología de esta condición.

Se ha mostrado un vínculo entre los lactobacilos, *Atopobium* y *G. vaginalis* encontrados comúnmente en mujeres sanas o en mujeres con VB: mientras *G. vaginalis* aislada de un paciente VB mostró un potencial de virulencia superior, *L. iners* era más resistente a la interferencia de *G. vaginalis*. Se ha podido explicar el por qué *L. iners* se encuentra normalmente en concentraciones más altas en pacientes con VB constituyendo una prueba más de la existencia del carácter virulento y no virulento para las cepas de *G. vaginalis*. [3, 11]

La presencia de lactobacilos no siempre puede ser beneficiosa, porque ciertos lactobacilos no contribuyen al bienestar vaginal. En general, una condición de *Lactobacillus* deficiente, caracterizado por un sobrecrecimiento de los anaerobios, se asocia con el desarrollo de numerosas infecciones, tales como VB y vaginitis aerobia, y promueve la adquisición de enfermedades de transmisión sexual; muchos producen peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, y así, estos compuestos pueden inhibir el crecimiento de otras especies bacterianas. [6] La infección, manifiesta ó subclínica como en el caso de la VB, se cree que representa aproximadamente el 25-40% de todos los partos pretérmino.[22] por lo que nos planteamos la siguiente pregunta: **¿Cuáles son los lactobacilos presentes bajo diferentes condiciones clínicas y cervicovaginales en mujeres mexicanas?**

## JUSTIFICACIÓN

El problema de salud en la mujer es uno de los problemas prioritarios de salud en México y en el mundo. La alta prevalencia, alta tasa de recaída, y las complicaciones asociadas, hacen de la VB un trastorno de suma importancia a nivel mundial. [6, 11, 15, 16] La VB es una causa común de descarga vaginal anormal, así mismo es un continuo de síntomas físicos relacionados a los cambios en la microbiota vaginal por *Lactobacillus* dominada por una mezcla de anaerobios incluyendo *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella spp*, *Atopobium*, *Peptostreptocci*, *Mobiluncus spp*, y otros organismos que causan incremento del pH. La VB está fuertemente asociada con el número de problemas de salud reproductiva tales como parto pretérmino, enfermedad pélvica inflamatoria e incremento en la vulnerabilidad a infecciones sexualmente transmitidas, incluyendo VIH. [6, 10, 11, 15-17] . Por lo que identificar a los lactobacilos presentes bajo diferentes condiciones clínicas y cervicovaginales en mujeres mexicanas es un asunto de importancia.

## OBJETIVOS

Caracterizar el tipo de lactobacilos presentes bajo diferentes condiciones clínicas y cervicovaginales en mujeres mexicanas.

### Objetivos Particulares

1. Identificar la presencia de *Gardnerella vaginalis* y *Atopobium vaginae* en las muestras de estudio.
2. Identificar la proporción de lactobacilos, *Gardnerella vaginalis* y *Atopobium vaginae* en los diferentes grupos de estudio.



## METODOLOGÍA

- **Diseño:**

Se desarrolló un estudio tipo *encuesta transversal* con enfoque analítico y por recolección de datos prospectivo que fue sometido para su evaluación ante el Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud de la UMAE HGO 4 con el título original de Detección de bacteriófagos en muestras de raspados del cérvix uterino, el cual lo autorizó R-2013-3606-24. El presente trabajo es la base para la posterior identificación de los bacteriófagos bajo diferentes condiciones clínicas y cervicovaginales en mujeres mexicanas.

- **Universo de estudio:**

Mujeres que acudieron a la consulta externa de primera vez referidas de las unidades de atención médica Unidades de Medicina Familiar y Hospitales Generales del área de influencia de la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 "Luis Castelazo Ayala".

- **Procedimiento:**

En el periodo de abril a diciembre del año 2013, se invitó a participar a las mujeres que acudieron a su cita para consulta externa de primera vez. Se realizó el procedimiento de consentimiento informado entre las mujeres que cumplieron los criterios de elegibilidad. Posterior a ello, se aplicó un cuestionario sociodemográfico realizado *ad hoc* para el estudio. Se realizó la exploración física de las pacientes y se registraron las características de la descarga transvaginal y área genital, así mismo se registró la sintomatología referida por las pacientes.

La muestra de raspado cervical se realizó utilizando un cepillo cervical (Cervix brush) de acuerdo a la técnica clásica para la citología exfoliativa. La muestra así fue depositada en un tubo conteniendo solución de lisis de DNA adicionada con lisozima 10U/mL e incubada a 37°C por 30 min, en seguida se agregó solución de SDS y Proteínasa K (10 ug/uL) dejando incubarla durante 2 horas a 65°C.

### **Purificación y crecimiento de las Bacterias**

Las muestras se obtuvieron de mujeres sanas y enfermas con cervicovaginitis. Se midió el pH vaginal con papel indicador. Para el aislamiento de *Lactobacillus spp*, se apilaron en placas de Agar Rogosa con pH de 5.2 y fueron incubadas a 37°C por 48 hrs en condiciones anaerobias. Después se utilizó medio MRS para el crecimiento Bacteriano. Para la identificación de los lactobacilos, se midió la habilidad para crecer en medio Rogosa,

tinción Gram positiva, forma de varilla y fenotipo catalasa-negativa. Los cultivos purificados fueron mantenidos a -80 Centígrados en caldo MRS con glicerol al 10%.

Se realizaron análisis bioquímicos como: prueba de fermentación de azúcar y producción de gas en caldo MRS mediante técnicas estandarizadas de laboratorio.

**Tabla 1.** Caracterización de la descarga transvaginal y área genital

Secreción vaginal	Secreción clara, blanco floccular, no homogénea	si	no	Flujo blanquecino espeso en grumos, agregados adherentes	si	no	Secreción abundante con burbujas, amarillenta	si	no	Secreción maloliente blanco grisácea homogénea	si	no
Vulva y vagina	Ninguna			Eritema, prurito vulvar, inflamación, leucorrea			Eritema, cuello con colpitis, leucorrea profusa y mal oliente			No hay inflamación. Leucorrea maloliente, abundante		
pH vaginal	<4.5			<4.5			>4.5			>4.5		
KOH 10%	Negativo			Negativo			Ocasional			Positivo		
	vagina normal			cándida			tricomonas			vaginosis		
Otros												

**Criterios de Selección:**

- **Criterios de Inclusión**

Mujeres mayores de 15 años, con reporte de vida sexual activa, derechohabientes IMSS vigentes, que aceptaron participar consintiendo la exploración física y la toma de muestra de raspado de cérvix uterino mediante especuloscopia. Entre el grupo de mujeres embarazadas, aquellas que no tuvieran contraindicación para la toma de muestra mediante cepillo cervical.

- **Criterios de No Inclusión:**

Mujeres portadoras de diabetes mellitus tipo 2 ó con antecedente de lupus eritematoso sistémico ó alguna de sus variantes, antecedente de síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, antecedente de insuficiencia renal aguda o ser portadora de insuficiencia renal crónica. Portadora de síndrome de inmunodeficiencia humana VIH o SIDA. Obesidad mórbida (IMC >35Kg/m<sup>2</sup>). Mujeres embarazadas con historia de ruptura de membranas ó reporte de actividad uterina al momento del estudio así como mujeres que no aceptaron participar.

- **Tamaño de muestra y muestreo:**

Se planteó el cálculo del número de sujetos necesarios para la realización de este estudio, cuyo objetivo fue la

estimación de una proporción[25], ligada a la tipificación de los lactobacilos en una población de mujeres con diferentes características clínicas.

Con base en la prevalencia de VB reportada para mujeres en edad fértil del 45 a 55%.

$$n = \frac{Z\alpha^2 P(1 - P)}{i^2}$$

Se realizó el cálculo de tamaño muestral

n=	95	Número de sujetos necesarios
Z $\alpha^2$	1.96	Valor de Z correspondiente al riesgo alfa fijado de 0.05
P=	0.45	Valor de la proporción de vaginosis que se supone existe en la población
1-P	0.55	Complemento de la proporción
i <sup>2</sup>	0.10	Precisión con que se desea estimar el parámetro

- **Variables:**

**Nombre de la Variable:** Diferentes condiciones clínicas y cervicovaginales en mujeres mexicanas.

**Tipo:** Cualitativa

**Función:** Dependiente

**Definición conceptual:** Presencia de descarga transvaginal, presencia ó ausencia de eritema, prurito, cuantificación de pH vaginal y la condición de embarazo.

**Definición operacional:** Se realizó la exploración física de las pacientes y se registraron las características de la descarga transvaginal y área genital, así mismo se registró la sintomatología referida por las pacientes.

La muestra de raspado cervical se realizó utilizando un cepillo cervical (Cervix brush) de acuerdo a la técnica clásica para la citología exfoliativa. La muestra así fue depositada en un tubo conteniendo solución de lisis de DNA adicionada con lisozima 10U/mL e incubada a 37°C por 30 min, en seguida se agregó solución de SDS y Proteinasa K (10 ug/uL) dejando incubarla durante 2 horas a 65°C.

**Escala:** Nominal

**Indicador:** Grupo 1. Mujeres con descarga transvaginal y sin datos clínicos (amarillo),

Grupo 2. Mujeres con antecedentes de tratamientos múltiples para cervicovaginitis (rojo),

Grupo 3. Mujeres sin descarga transvaginal y sin datos clínicos (azul),

Grupo 4. Mujeres con descarga transvaginal y con datos clínicos (verde),

Grupo 5. Mujeres embarazadas.

**Nombre de la Variable:** Tipo de lactobacilos

**Tipo:** Cualitativa

**Función:** Independiente

**Definición conceptual:** El microbioma vaginal de las mujeres en edad reproductiva se caracteriza mediante técnicas de cultivo y son predominantemente lactobacilos. La comunidad en detalle está constituida por *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii*, o la combinación de estas especies y una pequeña porción de mujeres tienen un perfil mixto con *Gardnerella*, *Prevotella*, *Atopobium*, *Megasphaera*, y *Streptococcus*.

**Definición operacional:** A partir de la muestra de raspado cervical obtenida utilizando un cepillo cervical (Cervix brush) de acuerdo a la técnica clásica para la citología exfoliativa se reportó la presencia ó ausencia de lactobacilos y bacterias.

**Escala:** Nominal

**Indicador:** presente / ausente

Se recolectó información sobre variables concernientes a los antecedentes gineco obstétricos, edad, ocupación económica, escolaridad, vida sexual activa y número de parejas sexuales, método de planificación usado, toxicomanías, antecedentes familiares oncológicos, estado de nutrición dieta.

- **Análisis Estadístico:**

Se realizó un análisis de limpieza de datos buscando la consistencia de la información capturada con la registrada en los cuestionarios. Se realizó un análisis univariado empleando medidas de tendencia central y dispersión. Se calcularon frecuencias y porcentajes. Así mismo se estimaron medidas de asociación. Para el cálculo de las medidas se empleó el software Stata 11.0 para Windows.

## CONSIDERACIONES ÉTICAS

La realización de este estudio se hizo en concordancia con la legislación vigente en nuestro país, en estricto apego al Título segundo de la Ley General de Salud en materia de Investigación en Salud: “Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos”, en específico el Capítulo dos. [26] y a la Declaración de Helsinki vigente.

La protección de los derechos y bienestar de los pacientes en este estudio como sujetos de investigación

también tuvo correspondencia con las “Guías de la Buena Práctica Clínica” (GCP por sus siglas en inglés), [27] creadas y continuamente mejoradas por la “Conferencia Internacional de Armonización” (ICH por sus siglas en Inglés).

La inmersión de los participantes de este estudio, se realizó previo consentimiento informado, el cual fue realizado en base a los estándares mínimos y necesarios de la legislación nacional e internacional vigentes.

La información que se obtuvo como parte de este estudio es estrictamente confidencial. La información que pudiera ser utilizada para identificar al (los) paciente(s) (nombre, teléfono y dirección) fue guardada de manera confidencial. Los datos personales son guardados por separado de los cuestionarios para mantener la confidencialidad de los resultados de las pruebas clínicas.

Sólo el equipo de investigadores responsables del IMSS sabe qué pacientes estuvieron participando en este estudio. Nadie **tendrá** acceso a la información sobre el paciente.

Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias, no se dará información que pudiera revelar la identidad de alguno de los participantes. La identidad será protegida y ocultada. Para proteger la identidad, nombre y toda información que pudiera ser utilizada para identificar a cualquiera de los pacientes, no estará vinculada con la información de expedientes y con los resultados del estudio. Se guardará la información en bases de datos seguras que estarán protegidas por una clave de acceso. Toda la información será destruida siete años después de concluir el estudio.

Cualquier efecto adverso (esperado o no), será resuelto de manera pronta y especializada por el personal médico especializado del Hospital de donde proviene el paciente.

La realización de este estudio requirió de un consentimiento informado y en todo momento se estuvo vigilando el cumplimiento de lo propuesto por la Declaración Belmont.

### CRONOGRAMA DE TRABAJO

Actividad	Abr-Jun 2013	Jul-Sep	Oct-Dic	Ene-Mar 2014	Abr-Jun	Oct-Nov
Revisión bibliográfica	X	X				
Elaboración del Protocolo y presentación de cartel.		x				
Obtención de todos los materiales y reactivos así como muestras		X	X	X		
Familiarización con técnicas generales		X	x			
Diseño de primers para amplificación de DNA de bacteriofagos por medio de PCR.		X				
Obtención de resultados				X	X	X
Interpretación y tratamiento de resultados					X	X
Conclusiones					X	X
Escritura de tesis y correcciones					X	X
Versión final de tesis						X

## RESULTADOS

Se recolectaron 89 muestras de raspados del cérvix uterino de mujeres (Tabla 1).

**Tabla 1. Frecuencia de características clínicas y datos de infección vaginal en las muestras de raspado del cérvix uterino de mujeres**

<b>Grupo de Mujeres n=89</b>	n	%
Grupo 1. Mujeres con descarga transvaginal y sin datos clínicos (amarillo)	22	24.72
Grupo 2. Mujeres con antecedentes de múltiples tratamientos para cervicovaginitis (rojo)	4	4.49
Grupo 3. Mujeres sin descarga transvaginal y sin datos clínicos (azul)	12	13.48
Grupo 4. Mujeres con descarga transvaginal y con datos clínicos (verde)	18	20.22
Grupo 5. Mujeres embarazadas	33	37.08

**Tabla 2. Características de edad de las mujeres participantes en el estudio**

Edad años (n=89)	34.82 ± 13.53*
	30 (16, 79)†
Grupos de mujeres estudiadas‡	
Grupo 1 n=22	35.72 ± 11.37
Grupo 2 n=4	42.25±18.89
Grupo 3 n=12	43.91±13.37
Grupo 4 n=18	39.27±18.40
Grupo 5 n=33	27.57±6.36

\*Media y Desviación Estándar. † Mediana (Valor mínimo y valor máximo). ‡ Anova p=0.0006

El 74.12% de las mujeres estudiadas refirieron al momento de la entrevista haber nacido en la Ciudad de México, 4.71% su lugar de nacimiento fue el Estado de México. El resto de las mujeres nacieron en diferentes entidades federativas y 1 mujer refirió haber nacido en China. La mayoría de las mujeres tuvieron como lugar de residencia la Ciudad de México (95%), 2.30% en Estado de México y 2.30% en Michoacán.

**Tabla 3. Características de Ocupación Económica\* de las mujeres en estudio**

Grupos de Mujeres	n=89					
	Estudiantes/De empleados	Funcionarios, directores y jefes	Profesionistas y técnicos	Trabajadores auxiliares en actividades administrativas	Comerciantes, empleados en ventas y agentes de ventas	Trabajadores en servicios personales y vigilancia
Grupo 1 n=22	2 (9.09%)	1 (4.55%)	8 (36.36%)	1 (4.55%)	1 (4.55%)	<b>9 (40.91%)</b>
Grupo 2 n=4	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	<b>3(75%)</b>
Grupo 3 n=12	0 (0%)	0 (0%)	2 (16.67%)	0 (0%)	1 (8.33%)	<b>9 (75%)</b>
Grupo 4 n=18	3 (16.67%)	0 (0%)	<b>8 (44.44%)</b>	0 (0%)	1 (5.56%)	6 (33.33%)
Grupo 5 n=33	1 (3.03%)	0 (0%)	14 (42.42%)	0 (0%)	1 (3.03%)	<b>17 (51.52%)</b>

\* Sistema Nacional de Clasificación de Ocupaciones. INEGI. 2011

Las características de ocupación se agruparon de acuerdo al Sistema Nacional de Clasificación de Ocupación según lo propuesto por INEGI en 2011. Lo que se encontró fue que la mayoría de las mujeres del Grupo 1, 2, 3 y 5 correspondieron a trabajadoras en servicios personales y de vigilancia; en el Grupo 4 refirieron ser profesionistas y técnicas.

**Tabla 4. Escolaridad por niveles\* de las mujeres en estudio**

Grupos de Mujeres	Educación Básica	Educación Media Superior	Educación Superior	Posgrado	Sin dato
n=89					
Grupo 1 n=22	<b>8 (36.36%)</b>	5 (22.73%)	1 (4.55%)	2 (9.09%)	6 (27.27%)
Grupo 2 n=4	<b>3 (75.00%)</b>	1 (25.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
Grupo 3 n=12	<b>7 (58.33%)</b>	5 (41.67%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
Grupo 4 n=18	<b>10 (55.56%)</b>	4 (22.22%)	0 (0.00%)	1 (5.56%)	3 (16.67%)
Grupo 5 n=33	8 (24.24%)	<b>17 (51.52%)</b>	0 (0.00%)	2 (6.06%)	6 (18.18%)

\*Clasificación de Educación por Niveles. SEP. 2011

La escolaridad fue agrupada mediante la Clasificación de Educación por niveles de acuerdo a lo propuesto por la Secretaría de Educación Pública en 2011 siendo la educación la predominante en todos los grupos, excepto en el grupo 5 que fue la Educación media superior la predominante.



**Tabla 5. Antecedentes obstétricos\* de las mujeres estudiadas**

Paridad (n=79)	n	%
Nuligesta	10	12.66
Primigesta	9	11.39
Secundigesta	10	12.66
Multigesta	12	15.19
Nulípara	0	0
Primípara	9	11.39
Multípara	29	36.71

\*GTPAL (por sus siglas en inglés: gravida, term, preterm, abortions, living)

Para los antecedentes obstétricos de las mujeres estudiadas se empleó la clasificación GTPAL (por sus siglas en inglés: gravida, term, preterm, abortions, living)

Clasificación GTPAL:

Nuligesta: Paciente que no está y nunca ha estado embarazada

Primigesta: Paciente que está embarazada por primera vez

Secundigesta: Paciente que está gestante por segunda vez

Multigesta: Paciente que está gestante por tercera ó cuarta vez

Nulípara: Mujer que nunca ha llegado a completar un embarazo más allá del periodo de aborto (<20SDG), puede haber tenido ó no uno o más aborto (espontáneos ó electivos)

Primípara: Mujer que ha parido una sola vez uno ó más fetos viables

Multípara: Mujer que ha llevado 2 ó más embarazos a más de 20 SDG

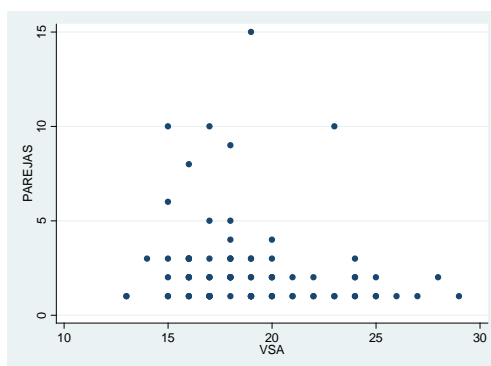
**Tabla 6. Antecedentes ginecológicos de las mujeres participantes en el estudio**

Edad de la menarca <i>años</i> (n=89)	12.80 ± 1.42*	
Edad de inicio de vida sexual activa <i>años</i>	18.92 ± 3.36*	
Número de parejas sexuales	2 (1, 15)†	
Categorías de Número de parejas sexuales‡	n	%
≤ 5 parejas	82	92.13
>5 parejas	7	7.87
Edad de la Menopausia <i>años</i> (n=12)	50.91 ± 3.47*	

\*Media y Desviación Estándar. † Mediana (Valor mínimo y valor máximo). ‡Fte. Chan JK et al. 2003

La edad promedio de la menarca fue de 12 años y la edad promedio de inicio de vida sexual activa fue a los 18 años, teniendo una desviación estándar de 3 años. El número de parejas sexuales varió de 1 hasta 15 siendo la mediana 2 parejas sexuales. Se preguntó el número de parejas sexuales sin tomar en cuenta si eran estables ó no, ni la duración de la convivencia con cada una de las parejas. El 92.13% de las mujeres refirieron haber tenido menos de 5 parejas sexuales. En 12 mujeres se documentó menopausia y la edad promedio fue de 50 años, también con una desviación estándar de 3 años.

**Gráfico 1. Relación entre la edad de inicio de vida sexual activa y número de parejas sexuales**



rho de pearson p=0.15

Se estimó la relación lineal entre la edad de inicio de vida sexual activa y el número de parejas sexuales, el valor estimado no fue estadísticamente significativo (rho=0.15 p>0.05)

**Tabla 8. Métodos de planificación familiar de las mujeres participantes en el estudio**

Métodos (n=89)	n	%
Ninguno	39	43.82
Tabletas	6	6.74
Inyectables	6	6.74
Dispositivo Intrauterino	12	13.48
OTB	10	11.24
Otros	16	17.98
Tiempo de uso de algún método <i>años</i> <sup>†</sup> (n=40)	7.2 ± 7.82*	
Tabletas	3.33 ± 3.82*	
Inyectable	5.5 ± 5.64*	
Dispositivo Intrauterino	8.83 ± 6.87*	
Otro	8.06 ± 9.94*	

\*Media y Desviación Estándar. <sup>†</sup>Anova p=0.4969

Entre el uso de métodos de planificación familiar de las mujeres participantes que fueron documentados el 43% refirió no utilizar ninguno, y el más frecuente fue el uso de “otro” método, que no se encontró dentro de los listados. Entre las mujeres que utilizaron algún método, el tiempo promedio fue de 7 años.

**Tabla 9. Toxicomanías de las mujeres participantes en el estudio**

Tabaquismo (n=89)	n	%
No	67	75.28
Si	22	24.72
Número de cigarrillos a la semana	14 (2, 49)*	
Alcoholismo	n	%
No	76	85.39
Si	13	14.61

\*Mediana (valor mínimo, valor máximo)

Cuando se exploró el reporte de toxicomanías, se identificó que el 75% no reportó consumo de tabaco. Entre las que si reportaron consumo de cigarrillos, el consumo promedio fue de 14 cigarrillos a la semana. 85% de las mujeres también reportaron no consumir bebidas alcohólicas. El volumen del consumo de la bebida alcohólica no fue estimado a través de la entrevista.

**Tabla 10. Antecedentes familiares oncológicos de las mujeres participantes en el estudio**

Participantes (n=89)	n	%
No	77	86.52
Si	12	13.48
Tipo de Cáncer (n=12)	n	%
Ca Mama	4	33.33
Ca CU	1	8.33
Ca Colon	1	8.33
Ca Estómago	1	8.33
Ca Pulmón, próstata, piel	1	8.33
Ca Testicular	1	8.33
No sabe	3	25.00

Se exploraron los antecedentes familiares oncológicos y sólo doce mujeres refirieron tener algún antecedente, 33% correspondió a Cáncer de Mama, seguido por la referencia de no saber el tipo de cáncer y el resto de mujeres que refirieron antecedentes correspondió al 8% aproximadamente.

**Tabla 11. Características de edad y frecuencia de visita a ginecología de las participantes en el estudio**

Edad de primera visita al Ginecólogo <i>años</i> (n=89)	22.41 ± 8.04*	
Edad en que se realizó el primer PAP <i>años</i> (n=65)	25.16 ± 5.72*	
Frecuencia de Visita al Ginecólogo (n=64)	n	%
Nunca	1	1.56
Casi nunca	15	23.44
Algunas veces	32	50.00
Frecuentemente	12	18.75
Muy frecuentemente	4	6.25
Resultado del PAP (n=73)	n	%
Normal	57	78.08
Infección por hongo ó bacteria	7	9.59
VPH	1	1.37
Otra Causa	1	1.37
No sabe	7	9.59

\*Media y Desviación Estándar

Se caracterizó la edad y frecuencia de visita al ginecólogo. La edad promedio en que reportaron haber visitado al ginecólogo fueron 22 años y la edad en que reportaron haberse realizado su primer PAP fueron 25 años. Entre las 64 mujeres que respondieron visitar al ginecólogo, 50% de las mujeres reportaron visitarlo algunas veces. De las 73 mujeres que reportaron haberse realizado PAP, 78% reportaron un resultado normal, seguido por 9.59% de Infección por hongo ó bacteria y ese mismo porcentaje para la respuesta de “No Sabe”.

**Tabla 12. Características antropométricas de las mujeres participantes en el estudio**

Grupos de Mujeres	Peso <i>kg</i> *†	Talla <i>m</i> *†	IMC <i>kg/m2</i> *†	Estado de Nutrición‡			
				Bajo Peso	Normal	Sp	Ob
Grupo 1 <i>n</i> =22	70.69 ± 14.76	1.56 ± .05	28.70 ± 5.12	1 (4.55%)	3 (13.64%)	9 (40.91%)	9 (40.91%)
Grupo 2 <i>n</i> =4	73.00 ± 4.76	1.54 ± .05	30.86 ± 1.84	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (25.00%)	3 (75.00%)
Grupo 3 <i>n</i> =12	70.55 ± 12.63	1.55 ± .05	29.08 ± 3.47	0 (0.00%)	1 (8.33%)	7 (58.33%)	4 (33.33%)
Grupo 4 <i>n</i> =18	66.77 ± 12.15	1.54 ± .07	27.80 ± 3.68	0 (0.00%)	4 (22.22%)	7 (38.89%)	7 (38.89%)
Grupo 5 <i>n</i> =33	70.32 ± 9.34	1.57 ± .05	28.27 ± 3.01	0 (0.00%)	7 (21.21%)	18 (54.55%)	8 (24.24%)

\*Media y Desviación Estándar. †ANOVA  $p > 0.05$ . ‡Fte. OMS 2012. Sp: Sobrepeso. Ob: Obesidad

Se evaluaron las características antropométricas de las mujeres de acuerdo al grupo de estudio. En el Grupo 1 el 40% de las mujeres resultó clasificado en Sobrepeso y un porcentaje similar en obesidad. En el Grupo 2, 75% su clasificación correspondió a Obesidad. En el Grupo 3 la mayoría se ubicó en sobrepeso. En el Grupo 4 el 38% resultó con clasificación en sobrepeso y obesidad y para el Grupo 5 el 54% resultó con clasificación en sobrepeso.

**Tabla 13. Frecuencia de consumo de alimentos de las mujeres participantes en el estudio**

Frecuencia de consumo	Carne n=88	Fruta n=88	Verduras n=89	Condimentos n=81	AP n=61
1 vez por semana	7 (7.95%)	6 (6.82%)	3 (3.37%)	13 (16.05%)	12 (19.72%)
2 veces por semana	28 (31.82%)	7 (7.95%)	4 (4.49%)	7 (8.64%)	8 (13.11%)
3 veces por semana	31 (35.23%)	11 (12.50%)	11 (12.36%)	3(3.70%)	9 (14.75%)
4 veces por semana	9 (10.23%)	9 (10.23%)	11 (12.36%)	-	5 (8.20%)
5 veces por semana	5 (5.68%)	12 (13.64%)	13 (14.61%)	1 (1.23%)	-
6 veces por semana	2 (2.27%)	4 (4.55%)	3 (3.37%)	1 (1.23%)	1 (1.64%)
7 veces por semana	5 (5.68%)	38 (43.18%)	44 (49.44%)	56 (69.14%)	12 (19.67%)
1 ves cada quince días	1 (1.14%)	1 (1.14%)	-	-	14 (22.5%)

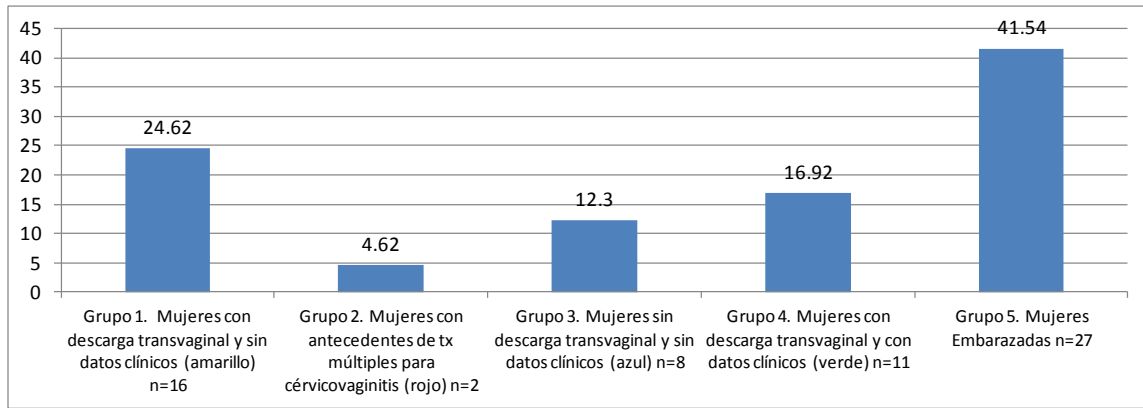
AP: Alimentos procesados incluyendo enlatados, embutidos y con conservadores

Se caracterizó el patrón de alimentación de las mujeres mediante un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos. El reporte se hace entre los principales grupos de alimentos, para el consumo de carne, la mayoría reportó consumirla 3 veces por semana, el 43% reportó consumirla 7 veces por semana, y 49% reportó consumir verduras 7 veces a la semana. El uso de condimentos fue reportado un consumo de 7 veces por semana en el 69% y el 22% reportó consumir alimentos procesados, incluyendo embutidos, enlatados y con conservadores 1 vez cada quince días.

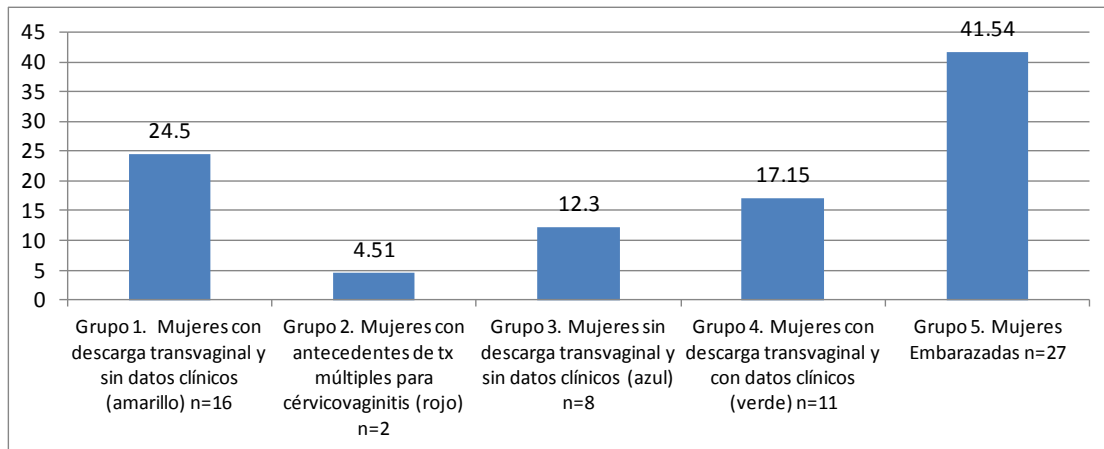
**Tabla 14. Datos clínicos de las mujeres participantes en el estudio**

<b>Secreción (n=89)</b>	n	%
No	11	12.50
Si	77	87.5
<b>Secreción clara, blanca flocular, no homogénea (n=77)</b>	28	36.36
Secreción blanquecina espesa en grumos, agregados adherentes	45	58.44
Secreción abundante con burbujas, amarillenta	3	3.90
Secreción maloliente blancogrisácea homogénea	1	1.30
<b>Características vulvares y vaginales (n=89)</b>		
No	36	40.45
Si	53	59.55
Eritema, prurito vulvar, inflamación, leucorrea (n=53)	47	88.68
Eritema, cérvix con colpitis, leucorrea profusa y mal oliente	4	7.55
Leucorrea maloliente, abundante. Sin inflamación	2	3.77
<b>pH Vaginal (n=89)</b>		
≤4.5	78	87.64
>4.5	7	7.87
No especifico	4	4.49

**Gráfico 2. Presencia de Atopobium vaginae por grupo de estudio**

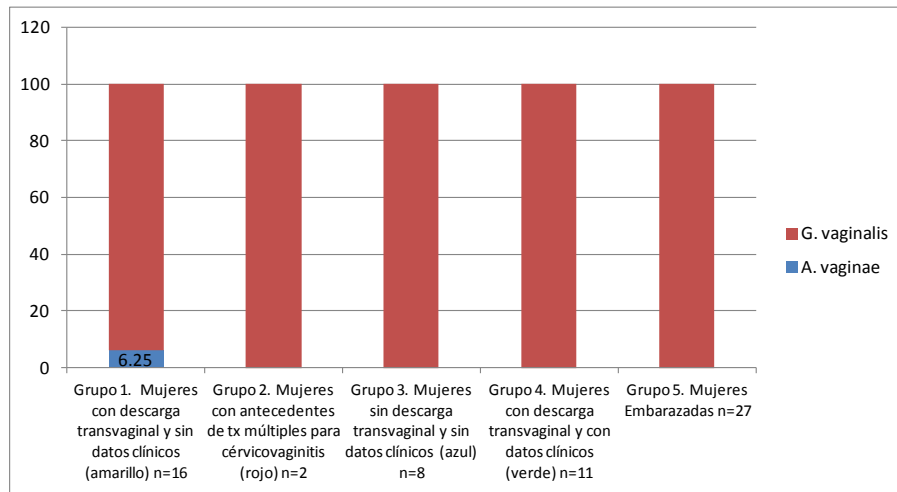


**Gráfico 3. Presencia de Gardnerella vaginalis por grupo de estudio**



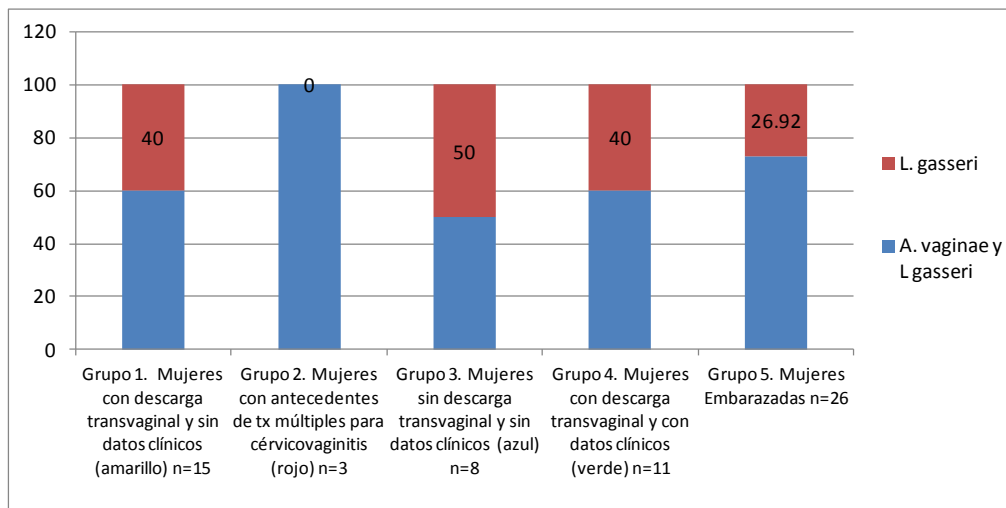
Se identificó presencia de *Atopobium vaginae* y *Gardnerella vaginalis* en los cinco grupos de estudio, con predominancia en el grupo de mujeres embarazadas (41.54%).

**Gráfico 4. Presencia conjunta de *Atopobium vaginae* y *Gardnerella vaginalis* por grupo de estudio**



Cuando se evaluó la presencia conjunta de *Gardnerella vaginalis* y *Atopobium vaginae* en los cinco grupos, solo en el grupo de mujeres con descarga transvaginal y sin datos clínicos el 6.45% de las mujeres tenía solamente *A. vaginae*.

**Gráfico 5. Presencia conjunta de *Atopobium vaginae* y *Lactobacillus gasseri* por grupo de estudio**

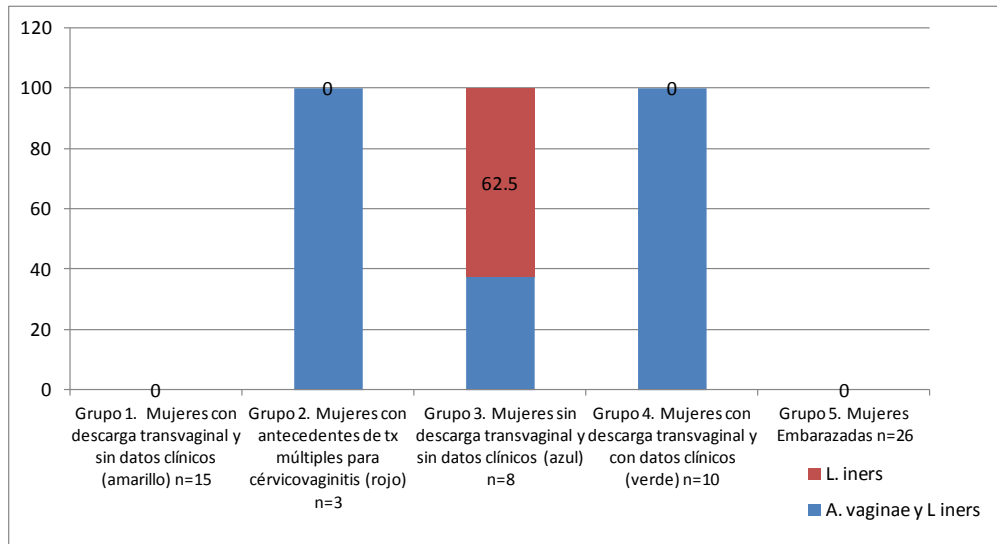


Se hizo la evaluación de la presencia conjunta de bacterias y lactobacilos, se inició analizando el *Atopobium vaginae* con *Lactobacillus gasseri* por grupo de estudio.

En el grupo de mujeres con antecedentes de tratamientos múltiples para cervicovaginitis se identificó la presencia conjunta de *A. vaginae* y *L. gasseri* en el 100% del grupo. En el grupo 1, grupo 3 y grupo 4 aproximadamente la mitad de la muestra presentó *L. gasseri* solamente y en el grupo 5 sólo el 25% presentó *L. gasseri*.

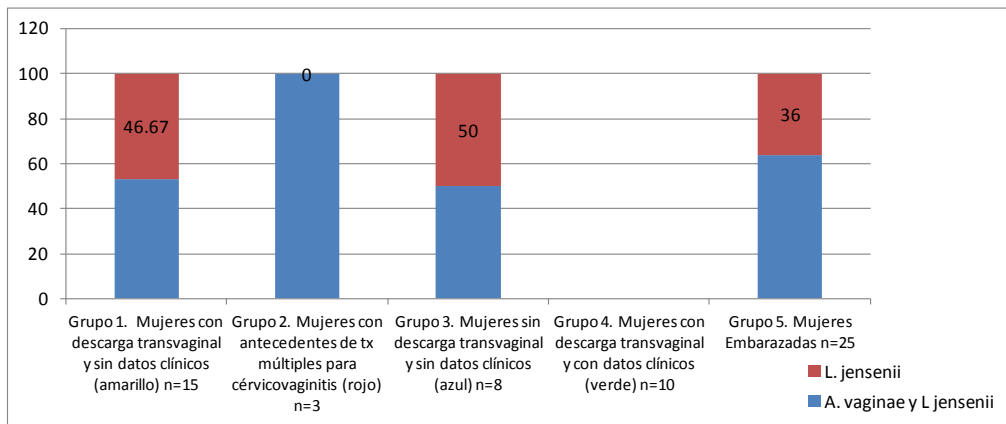


**Gráfico 6. Presencia conjunta de *Atopobium vaginae* y *Lactobacillus iners* por grupo de estudio**



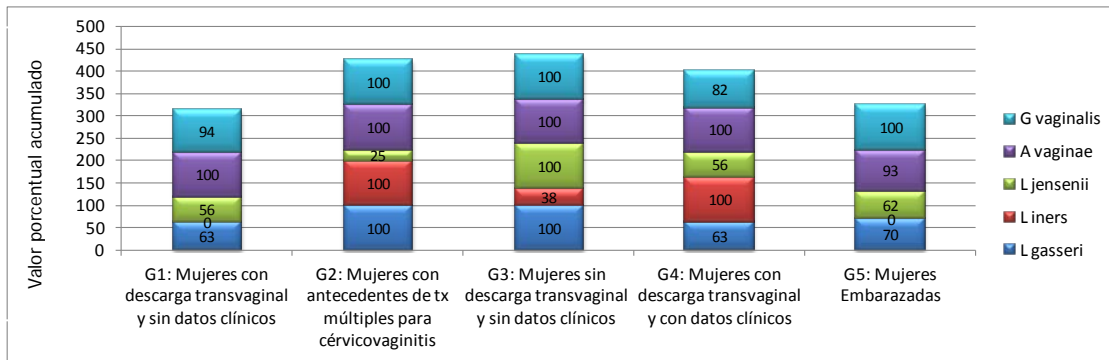
En el grupo 3, correspondiente a mujeres sin descarga transvaginal y sin datos clínicos, el 62% solo presentó *L. iners*.

**Gráfico 7. Presencia conjunta de *Atopobium vaginae* y *Lactobacillus jensenii* por grupo de estudio**



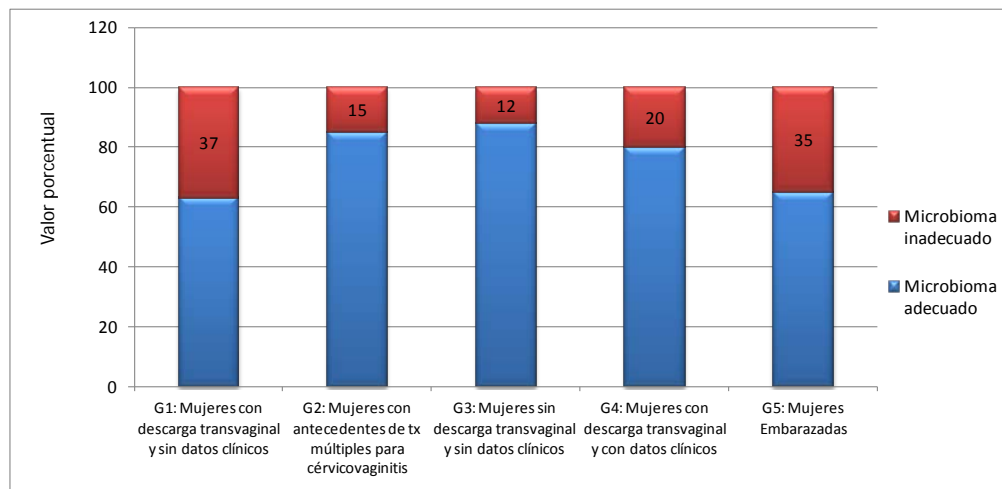
La presencia exclusiva de *L. jensenii* se identificó en los grupos 1, 3 y 5, en cerca del 50% de los casos.

**Gráfico 8. Microbioma por grupo de estudio**



Se realizó la descripción del microbioma por grupo de estudio, en los grupos 1 y 5, no se observó presencia de *L. iners*. Estos dos grupos presentan distribuciones y microbioma similares entre sí, y diferentes de los grupos 2, 3 y 4. En estos grupos predomina la presencia conjunta de *G. vaginalis*, *A. vaginae* y *L. gasseri* alternando con *L. iners* y *L. jensenii*.

**Gráfico 9. Característica de Microbioma por grupo de estudio**



La presencia de microbioma inadecuado, descrito por la presencia de *A. vaginae* y *G. vaginalis* se observó similar en los grupos 1 y 5, y a su vez, esos grupos son diferentes con los grupos 2, 3 y 4, donde estos últimos comparten la misma proporción de microbioma adecuado.

## DISCUSIÓN

El análisis del microbioma se realizó en 65 muestras, y se documentó la presencia de algún lactobacilo en todos los grupos. En la literatura se refiere que las especies de lactobacilos: *L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri*, *L. vaginalis* y *L. jensenii* son las que dominan la microbiota vaginal de la mujer hispano-mestiza.[3-5, 20]

En nuestro estudio, en los grupos que incluyeron mujeres con recurrencia de infección, aparentemente sanas y con proceso infeccioso agudo (grupos 2, 3 y 4 respectivamente) predominó la presencia conjunta de *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *L. gasseri*, *L. jensenii* e *L. iners*, este último estando ausente en el grupo 3, es decir, mujeres con microbioma aparentemente sano. Esto puede explicarse debido a que la asociación de *L. iners* y VB es muy alta, Similar a lo descrito por Castro, Henriques y colaboradores en 2013 y Martínez Peña y colaboradores también en 2013 en otros estudios que establecen que las mujeres colonizadas con *L. iners* tienen un mayor riesgo para desarrollar VB.[6, 11]

Aun cuando en la literatura se ha demostrado que la flora bacteriana vaginal de mujeres aparentemente sanas se mantiene estable durante el tiempo y dominada por una sola especie de lactobacilos ó un grupo de especies cercanamente relacionadas de lactobacilos. [20]. La coexistencia de múltiples especies de lactobacilos como la encontrada en nuestro estudio no es común, debido a la exclusión competitiva de una especie sobre la otra, situación que no se presentó en nuestro estudio. Esto puede ser explicado por factores particulares del huésped que influyen fuertemente en la capacidad de las especies para colonizar el ambiente como la edad, menarca, ciclo menstrual, infecciones, métodos de planificación familiar, número de parejas sexuales, frecuencia de actividad sexual así como hábitos y prácticas de duchas vaginales.[28] De los factores encontrados en la población estudiada, cerca del 8% tuvo más de 5 parejas sexuales y casi la mitad del total no usó ningún método de planificación familiar, lo que podría estar vinculado con la coexistencia de múltiples especies de lactobacilos.

En las mujeres estudiadas no se encontró *L. crispatus*, otro lactobacilo que se ha documentado como presente en el microbioma y que debido a los compuestos que produce es capaz de inhibir la adhesión de otras especies bacterianas ó interferir estéricamente., es decir *L. crispatus* parece ser uno de los lactobacilos más estables y exclusivos que su presencia genera una disminución del riesgo para el desarrollo de VB.[6, 11], es decir, que estas mujeres no tuvieron la protección que confiere la presencia de *L. crispatus*.

Al estar la VB fuertemente asociada con un número de problemas en salud reproductiva se ha tratado de explicar la existencia y la recurrencia de la VB mediante dos teorías, 1) los lactobacilos desaparecen debido a factores ambientales tales como duchas vaginales, agresiones frecuentes de pH debido a relaciones sexuales u

otros factores y 2) algunos lactobacilos son atacados por virus específicos (bacteriófagos) y no son capaces de reconlonizar la vagina facilitando el sobrecrecimiento anaeróbico.[15]

En este estudio se encontró presencia de *Atopobium vaginae* y *Gardnerella vaginalis* en los cinco grupos de estudio, con predominancia en el grupo de mujeres embarazadas, así mismo se encontró la presencia conjunta de *G. vaginalis* y lactobacilos, similar a estudios que han detectado esta presencia concomitante. Este resultado sugiere que la presencia de lactobacilos podría no excluir patógenos potenciales en la vagina, por ejemplo, la presencia de *G. vaginalis* no está estrictamente relacionada a manifestaciones clínicas.[29]

Se podría argumentar que la óptima salud vaginal debe definirse estrictamente como la presencia de lactobacilos sin evidencia de *G. vaginalis*[14, 20], la hipótesis de que *G. vaginalis* es el patógeno necesario para el inicio de la alteración de la flora vaginal no niega el concepto de que la VB, especialmente aquella sintomática, sea causada por una comunidad de bacterias, es probable que *G. vaginalis* sea una razón necesaria pero no suficiente para la producción de síntomas que caracterizan a la VB. Recientemente se ha sugerido que puede haber diferencias en las propiedades de virulencia entre diferentes cepas de *Gardnerella* [6, 19] y se ha introducido un concepto de especie centinela ligado a una vagina aparentemente sana pero portadora de *G. vaginalis*. [20, 29] La especie centinela es particularmente sensible a los cambios en las características biológicas, físicas ó químicas del ambiente y responde con un incremento en el tamaño de la población. Un hallazgo como el nuestro (presencia de *G. vaginalis* sin datos clínicos) puede ayudar a predecir el riesgo de que una mujer contraiga una infección debido a ajustes en la composición del microbioma.[20] Otra aplicación del concepto de especie centinela puede ser empleado en la detección temprana de VB, la cual es caracterizada por el crecimiento de varios microorganismos potencialmente patógenos habitualmente presentes pero en un número mucho menor.

En la literatura se ha reportado que las pacientes con VB muestran incremento en la complejidad de las comunidades vaginales, similar a lo encontrado en nuestro estudio en los diferentes grupos.[20] Una implicación clínica relevante está en los hallazgos que indican que una concentración vaginal elevada de *A. vaginae* y *G. vaginalis* puede ser una clara definición de VB que estará asociada al parto pretérmino, por lo que la identificación precisa de la microflora encontrada en la VB debe realizarse y llevar al clínico a reexaminar el tratamiento de la vaginosis durante el embarazo.[18]

La presencia generalizada de *G. vaginalis* en todos los grupos de estudio lo podemos explicar porque en microbiomas donde se ha aislado *L. gasseri*, *L. jensenii* e *L. iners* se ha documentado una pobre resistencia a la colonización, lo que permite el crecimiento excesivo de otras bacterias o debido a su mejor resistencia para las condiciones ambientales asociadas con VB.[3] El concepto de especie centinela no es ampliamente utilizado,

sin embargo al día de hoy, la definición de condiciones no compatibles con un microbioma adecuado no siempre pueden ser atribuidas a una sola especie, ya que ahora se observa el surgimiento de un conjunto de organismos.[29]

Una limitante para este estudio fue la imposibilidad de detección de *L. crispatus*, esta ausencia puede ser debida a la no determinación bioquímica ó a la ausencia de *L. crispatus* en el microbioma vaginal. Haber contado con esta información hubiera dado sustento al hallazgo de la proporción identificada de aquellas mujeres con menor riesgo de desarrollar VB. A pesar de que las pérdidas de sujetos en los estudios tienen impacto sobre la precisión con que se estima el parámetro poblacional, no tenemos elementos para pensar que pudieran haber sido pérdidas sistemáticas con posibilidad de condicionar un sesgo muestral ó de selección. Este proyecto es parte basal para subsecuentes estudios como el de la identificación de bacteriófagos en un intento de comprender de mejor forma la relación existente entre la respuesta del huésped ante la presencia de diferentes agentes bajo condiciones ambientales y/o clínicas diferentes, tratando adicionalmente de ahondar en el conocimiento de la interrelación dinámica de todos ellos como una posible explicación ante la presencia y de determinados patógenos y la eventual morbilidad desprendida de ella, de tal manera debe cuestionarse la presencia de agentes patógenos y no patógenos como entes pasivos en la homeostasis del organismo. Más bien la presencia de los mencionados agentes debe ser entendida como parte de una simbiosis-parasitosis según existan las condiciones que favorezcan una u otra condición, como podría ser el caso de las características demográficas de las mujeres mexicanas que fueron estudiadas que provinieron del centro de la república mexicana. Estas condiciones estudiadas como fueron: la edad de inicio de vida sexual activa, prácticas sexuales, métodos de planificación familiar, seguimiento y control con citología cervicovaginal; grado de obesidad (IMC), edad, calidad en la alimentación, toxicomanías, antecedente de infecciones del tracto genital inferior femenino con múltiples tratamientos farmacológicos; y presencia de descarga transvaginal ocasional o persistente tratada o no ésta última, son múltiples variables que deberán ser contrastadas entre sí para tener una precisión alta al momento de que se realice la identificación genética de los potenciales bacteriófagos asociados al microbioma identificado en las mujeres mexicanas en este estudio.

Posteriormente deberán realizarse estudios en el área ginecológica tratando de relacionar los hallazgos obtenidos en el presente estudio con factores asociados a la presencia del virus de papiloma humano (VPH), debido a su alta prevalencia en el cáncer de cérvix en nuestro país, específicamente estudiando si alguno de los lactobacilos identificados, juega un papel facilitador o protector a nivel del epitelio cervical que pudiera intervenir en la generación de esta entidad ó de sus lesiones intraepiteliales precursoras.

Del mismo modo, deberán realizarse estudios en el área de la obstetricia debido a la fuerte evidencia de la

relación entre diversos patógenos como son el *S. beta* hemolítico del grupo B; *Ureplasma* y *Mycoplasma* identificados con la presencia del parto pretérmino, una entidad de muy mal pronóstico para el feto que nace con antelación a la culminación de su desarrollo intrauterino. Finalmente resulta conveniente el desarrollo de nuevas técnicas y uso de estrategias novedosas con la finalidad de desarrollar oportuna y eficientemente probióticos que incrementen el crecimiento de *L. crispatus* en el microbioma vaginal, condición que potencialmente podría disminuir el riesgo para el desarrollo de VB y por ende las consecuencias previamente mencionadas.

## CONCLUSION

Todas las mujeres incluidas en este estudio fueron portadoras de un microbioma mixto, constituida por *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *L. iners*, *L. gasseri* y *L. jensenii*, con mención especial en el grupo de las mujeres aparentemente sanas, en donde *L. iners* estuvo ausente, condición que explica que no hubiera reporte de sintomatología, corroborando que estas mujeres presentaron al momento del estudio menor riesgo de desarrollar VB, a pesar de cursar con *G. vaginalis*, la cual probablemente se asoció a cepas de menor virulencia, o como previamente se documentó, se contemple como célula centinela.

Es de relevancia mencionar que ninguna de las muestras estudiadas de las mujeres en nuestros grupos seleccionados presentó *L. crispatus*, lactobacilo reconocido como un factor protector contra VB, caracterizado por la capacidad de reconocimiento de adhesión para otras células, principalmente bacterianas; por lo que se explica que todas las mujeres de nuestro estudio presentaron un factor de riesgo incrementado para desarrollo de VB, asociado a la presencia de otros lactobacilos y bacterias ya descritas, y por la ausencia de *L. crispatus* (factor protector).

Es considerable reconocer que en el grupo de las mujeres embarazadas se deberá ser más cuidadoso durante el control prenatal, puesto que se encontró *G. vaginalis* y *A. vaginae* en todas ellas, lo que nos debe llevar a la reflexión acerca del incremento en la posibilidad de la presentación de parto pretérmino, tal y como se documenta en la literatura mundial.

## BIBLIOGRAFÍA.

1. Martín, R., et al., *Diversity of the Lactobacillus group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut*. Journal of Applied Microbiology, 2007. **103**(6): p. 2638-2644.
2. Dellaglio, F., S. Torriani, and G.E. Felis, *Reclassification of Lactobacillus cellobiosus Rogosa et al. 1953 as a later synonym of Lactobacillus fermentum Beijerinck 1901*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004. **54**(3): p. 809-812.
3. Pendharkar, S., et al., *Identification and characterisation of vaginal lactobacilli from South African women*. BMC Infect Dis, 2013 **26**(13): p. 43.
4. Damelin, L.H., et al., *Identification of predominant culturable vaginal Lactobacillus species and associated bacteriophages from women with and without vaginal discharge syndrome in South Africa*. Journal of Medical Microbiology, 2011. **60**(2): p. 180-183.
5. Witkin, S.S., et al., *Influence of Vaginal Bacteria and d- and l-Lactic Acid Isomers on Vaginal Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer: Implications for Protection against Upper Genital Tract Infections*. mBio, 2013. **4**(4): p. e00460-13.
6. Martínez-Peña, M.D., G. Castro-Escarpulli, and M.G. Aguilera-Arreola, *Lactobacillus species isolated from vaginal secretions of healthy and bacterial vaginosis-intermediate Mexican women: a prospective study*. BMC Infectious Diseases, 2013. **13**: p. 189-189.
7. Vásquez, A., et al., *Vaginal Lactobacillus Flora of Healthy Swedish Women*. Journal of Clinical Microbiology, 2002. **40**(8): p. 2746-2749.
8. Spiegel, C.A., *Bacterial vaginosis*. Clinical Microbiology Reviews, 1991. **4**(4): p. 485-502.
9. Eade, C.R., et al., *Identification and Characterization of Bacterial Vaginosis-Associated Pathogens Using a Comprehensive Cervical-Vaginal Epithelial Coculture Assay*. PLoS ONE, 2012. **7**(11): p. e50106.
10. Schellenberg, J.J., et al., *Molecular Definition of Vaginal Microbiota in East African Commercial Sex Workers*. Applied and Environmental Microbiology, 2011. **77**(12): p. 4066-4074.
11. Castro, J., et al., *Reciprocal Interference between Lactobacillus spp. and Gardnerella vaginalis on Initial Adherence to Epithelial Cells*. Int J Med Sci 2013. **10**(9): p. 1193-1198.
12. Verstraelen, H., et al., *Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that L. crispatus promotes the stability of the normal vaginal microflora and that L. gasseri and/or L. iners are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora*. BMC Microbiol, 2009. **2**(9): p. 116.
13. Nugent, R.P., M.A. Krohn, and S.L. Hillier, *Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation*. Journal of Clinical Microbiology, 1991. **29**(2): p. 297-301.
14. Brotman, R.M., et al., *Bacterial Vaginosis Assessed by Gram Stain and Diminished Colonization Resistance to Incident Gonococcal, Chlamydial, and Trichomonal Genital Infection*. The Journal of Infectious Diseases, 2010. **202**(12): p. 1907-1915.
15. Donders, G., *Diagnosis and management of bacterial vaginosis and other types of abnormal vaginal bacterial flora: a review*. . Obstet Gynecol Surv, 2010. **65**(7): p. 462-73.
16. Kumar, N., et al., *Bacterial vaginosis: Etiology and modalities of treatment—A brief note*. Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences, 2011. **3**(4): p. 496-503.
17. Livengood, C.H., *Bacterial Vaginosis: An Overview for 2009*. Reviews in Obstetrics and Gynecology, 2009. **2**(1): p. 28-37.
18. Menard, J., et al., *High vaginal concentrations of Atopobium vaginae and Gardnerella vaginalis in women undergoing preterm labor*. Obstet Gynecol Surv, 2010. **115**(1): p. 134-40.
19. Schwebke, J.R., M.S. Flynn, and C.A. Rivers, *Prevalence of Gardnerella vaginalis among women with*



- Lactobacillus*-predominant vaginal flora. Sexually Transmitted Infections, 2014. **90**(1): p. 61-63.
20. Vitali, B., et al., *Dynamics of Vaginal Bacterial Communities in Women Developing Bacterial Vaginosis, Candidiasis, or No Infection, Analyzed by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Real-Time PCR*. Applied and Environmental Microbiology, 2007. **73**(18): p. 5731-5741.
  21. Hyman, R.W., et al., *Diversity of the Vaginal Microbiome Correlates With Preterm Birth*. Reproductive Sciences, 2014. **21**(1): p. 32-40.
  22. Foxman, B., et al., *Mycoplasma, bacterial vaginosis-associated bacteria BVAB3, race, and risk of preterm birth in a high-risk cohort*. American Journal of Obstetrics & Gynecology, 2014. **210**(3): p. 226.e1-226.e7.
  23. Klebanoff, M.A., et al., *Is bacterial vaginosis a stronger risk factor for preterm birth when it is diagnosed earlier in gestation?* American Journal of Obstetrics & Gynecology, 2005. **192**(2): p. 470-477.
  24. Brocklehurst, P., et al., *Antibiotics for treating bacterial vaginosis in pregnancy*. Cochrane Database Syst Rev, 2013. **31**(1): p. CD000262.
  25. Argimon Pallás, J. and J. Jiménez Villa, *Tamaño de la Muestra*, in *Métodos de Investigación Clínica y Epidemiológica*, J. Argimon Pallás and J. Jiménez Villa, Editors. 2004, Elsevier: Madrid, España. p. 136.
  26. Secretaría de Salud, *Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Título Segundo*. 2001.
  27. Guideline for Good Clinical Practice E6, *International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*. 1996.
  28. Zhou, X., et al., *Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods*. Microbiology, 2004. **150**(8): p. 2565-2573.
  29. Coolen, M.J.L., et al., *Characterization of Microbial Communities Found in the Human Vagina by Analysis of Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of 16S rRNA Genes*. Applied and Environmental Microbiology, 2005. **71**(12): p. 8729-8737.