

ARTÍCULO ORIGINAL

Evaluación mediante los estados vaginales básicos de la disfunción vaginal según diferentes factores de riesgo y caracterización de la microbiota lactobacilar

Perazzi, Beatriz Elizabeth^{1*}; Maldonado, Verónica²; Losada, Mirta¹; Susuki, Verónica²; Diaz Altuzarra, María del Carmen¹; Cocucci, Silvina¹; Rodriguez, Ana Paula¹; Montalvo, Eduardo¹; Ocampo, Pamela¹; Cora Eliseht, Martha²; Provenzano, Sergio²; Vay, Carlos¹; Tatti, Silvio²; Famiglietti, Angela¹.

¹Laboratorio de Bacteriología Clínica, Departamento de Bioquímica Clínica, Hospital de Clínicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

²Programa de Diagnóstico, Terapéutica y Vacunación del Tracto Genital Inferior, División Ginecología y Obstetricia, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Contacto: Prof. Dra. Beatriz Elizabeth Perazzi; Lavalleja 2726 (1824) Lanús Oeste; beatrizperazzi@gmail.com; bperazzi@ffyb.uba.ar

Resumen

Introducción: La microbiota vaginal es un complejo de microorganismos, que varía según el nivel estrogénico y factores externos que generen disfunción vaginal (DV). Aunque los lactobacilos constituyen una línea de defensa contra la infección vaginal, sus distintas especies pueden contribuir de manera diferente en dicha protección. **Objetivos:** Evaluar la DV mediante los estados vaginales básicos (EVB) y el estudio microbiológico. **Caracterizar** las especies de lactobacilos y su capacidad protectora de la DV en distintos grupos de riesgo. **Materiales y Métodos:** Estudio consecutivo y prospectivo de 658 pacientes sintomáticas y asintomáticas, clasificadas en los siguientes grupos: anticonceptivos orales (ACO), preservativo (PRE), dispositivo intrauterino (DIU), embarazadas, menopáusicas sin terapia hormonal de reemplazo, VPH positivas y control. Se les realizó toma de fondo de saco vaginal para estudio de los EVB mediante BACOVA y cultivo en agar sangre y Tioglicolato modificado para trichomonas. La identificación de las especies de lactobacilos se realizó mediante pruebas convencionales, MALDI-TOF y secuenciación del gen ADNr 16S. Se midió la producción de H₂O₂ de las especies de lactobacilos, mediante un ensayo semicuantitativo. **Método estadístico:** Test de Chi cuadrado y Fisher. Se consideró significativo $p < 0,05$. **Resultados:** Se estudiaron 448 pacientes: 18 - 24 años (n: 65), 25 - 50 años (n: 186) y mayores de 50 años (n: 118) y grupo control (n: 79) y 210 pacientes embarazadas: colonizadas por EGB (n: 37), con candidiasis (n: 25), colonizadas con EGB y con candidiasis (n: 15) y grupo control no colonizadas (n: 133). La VB fue la patología más prevalente en todos los grupos etarios. Un 45,0 % del grupo VPH de 18 - 24 años presentaron DV. En aquellas que utilizaron ACO predominó la microbiota lactobacilar: 18 - 24 años (65,2 %) y 25 - 50 años (67,6 %), al igual que las que utilizaron preservativo de 25 - 50 años (62,7 %). Un 40,7 % del grupo con DIU de 25 - 50 años presentaron DV. Un 20,2 % de las pacientes menopáusicas presentaron DV, con una prevalencia de microbiota lactobacilar de 43,4 % ($p < 0,01$). Se identificaron 78 % de aislamientos de lactobacilos: *L. crispatus* (n: 68), *L. gasseri* (n: 56) y *L. jensenii* (n: 54). Pacientes menopausicas presentaron mayor prevalencia de *L. gasseri* respecto de todos los grupos ($p < 0,01$). Los grupos ACO y PRE mostraron mayor prevalencia de *L. crispatus* al igual que el control respecto de las menopáusicas ($p < 0,01$). El grupo VPH mostró menor prevalencia de *L. crispatus* respecto del control ($p = 0,01$) y similar a las pacientes menopáusicas y mayor prevalencia de *L. gasseri* respecto de ACO y PRE ($p = 0,04$ y $0,02$ respectivamente). Las pacientes embarazadas con candidiasis y las colonizadas con EGB mostraron mayor prevalencia de *L. gasseri* (37,8 % y 40 % respectivamente) que las no colonizadas. Las pacientes embarazadas con candidiasis y colonizadas con EGB no presentaron *L. crispatus* y mostraron mayor prevalencia de *L. gasseri* (66,6 %). Un 96 % de los aislamientos de *L. crispatus* produjeron fuertemente H₂O₂, a diferencia de los de *L. gasseri* que ninguno fue productor fuerte ($p < 0,0001$). El método MALDI-TOF demostró excelente concordancia con la secuenciación del ADNr 16S. **Conclusiones:** Se observó DV en los distin-

tos grupos de riesgo, asociada a levaduras y/o VB, resaltándose el efecto protector de *L. crispatus* en ACO y preservativo y en este último con reacción inflamatoria. Contrariamente, las pacientes con VPH y con DIU mostraron una tendencia a desarrollar DV, en coincidencia con la disminución de *L. crispatus* y el aumento de *L. gasseri*. En la menopausia predominó *L. gasseri*, especie relacionada con la predisposición a DV. En las pacientes embarazadas no colonizadas predominó *L. crispatus*, mientras que en las colonizadas por EGB y/o con candidiasis predominó *L. gasseri* asociado a estos microorganismos de origen intestinal.

Palabras clave: disfunción vaginal, estados vaginales básicos, especies de lactobacilos, grupo etario, embarazo, anticoncepción, virus del papiloma humano.

Abstract

Introduction: The vaginal flora is a complex of microorganisms which varies according to the estrogenic level and external factors that generate vaginal dysfunction (VD). While lactobacilli constitute a line of defense against vaginal infection, their different species can contribute differently in such protection. **Objectives:** To evaluate the VD by the basic vaginal states (BVS) and the microbiological study, and characterize the species of lactobacilli and their protective capacity against VD, in different risk groups. **Material and methods:** Consecutive, prospective study that included 658 symptomatic and asymptomatic patients. Patients were classified in the following groups: oral contraceptives (OC), condoms (CO), intrauterine device (IUD), pregnant and menopausal patients (no hormone replacement therapy, no contraception), human papillomavirus (HPV) - positive and controls. All patients underwent clinical examination and took vaginal fornix to study BVS by BAVACO and culture on blood agar and modified thioglycolate medium for trichomonas. The species of lactobacilli were identified by conventional tests, MALDI-TOF and 16S rDNA gene sequencing. The production of H₂O₂ by different species of lactobacilli was measured by a semiquantitative test. **Statistical method:** Chi square test [2] and Fisher. $P < 0.05$ was considered significant. **Results:** The patients studied (n: 448) were 18 - 24 years old (n: 65), 25 - 50 years old (n: 186), 50 years old or older (n: 118) and a control group (n: 79). Also, 210 pregnant patients were studied: colonized by GBS (n: 37), with candidiasis (n: 25), colonized with GBS and candidiasis (n: 15) and control non-colonized group (n: 133). Bacterial vaginosis was the most prevalent pathology in all age groups. The HPV patients of the 18 - 24 age group showed VD of 45.0 %. In patients who used OC, a predominance of lactobacillar microbiota was observed (65.2 %) in the 18 - 24 age group and (67.6 %) in the 25 - 50 age group, like those who used CO of 25 - 50 years (62.7 %) with inflammatory reaction. Patients who used IUD of the 25 - 50 age group showed VD of 40.7 %. Also, 20.2 % of menopausal patients had VD and the prevalence of lactobacillar microbiota was 43.4 % ($p < 0.01$). About 78 % isolates of lactobacilli were identified: *L. crispatus* (n: 68), *L. gasseri* (n: 56) and *L. jensenii* (n: 54). Menopausal patients had higher prevalence of *L. gasseri* with respect to all groups ($p < 0.01$). The CO and OC groups showed higher prevalence of *L. crispatus* like the control with respect to menopausal patients ($p < 0.01$). The HPV group showed lower prevalence of *L. crispatus* with respect to the control ($p = 0.01$) and similar to menopausal patients and higher prevalence of *L. gasseri* with respect to OC and CO ($p = 0.04, 0.02$ respectively). Pregnant patients with candidiasis and the ones colonized by GBS showed higher prevalence of *L. gasseri* (37.8 % and 40 % respectively) compared to non-colonized. Pregnant patients with candidiasis and colonized with GBS did not present *L. crispatus* and showed higher prevalence of *L. gasseri* (66.6 %). Ninety-six percent of *L. crispatus* isolates were strong producers of H₂O₂, unlike *L. gasseri* isolates, none of which were strong producers ($p < 0.0001$). The MALDI-TOF method showed excellent agreement with 16S rDNA sequencing. **Conclusions:** VD was observed in the different risk groups associated with the presence of BV and/or yeasts, highlighting the protective effect exerted by *L. crispatus* in OC and CO and in the latter with inflammatory reaction. In contrast, patients with HPV infection and IUD showed a tendency to develop DV, coinciding with a decrease in *L. crispatus* and an increase in *L. gasseri*. Menopause patients showed predominance of *L. gasseri*, species related to the predisposition to VD. *L. crispatus* predominated in pregnant patients non-colonized, while in the GBS colonized ones and/or with candidiasis predominated *L. gasseri* associated with these intestinal-origin microorganisms.

Key words: vaginal dysfunction, basic vaginal states, *Lactobacillus* species, age group, pregnancy, contraception, human papilloma virus.

Introducción

La microbiota vaginal es un complejo sistema de microorganismos relacionados entre sí y en permanente equilibrio que varía desde el nacimiento, con un predominio de lactobacilos en la primera semana de vida, hasta la menarca, caracterizada por la presencia de microbiota intermedia correspondiente a bacterias de localización intestinal y de piel. En la pubertad, como consecuencia de la maduración estrogénica, la vagina normal contiene más de 18 especies de lactobacilos, con un franco predominio de *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri* y *L. jensenii* y, en menor proporción, una gran variedad de especies de bacterias aeróbicas y anaeróbicas e inclusive de levaduras [1]. Esta microbiota vuelve a alterarse en la menopausia, asemejándose a la etapa prepúber con predominio de bacilos gram negativos [2]. La falta de lactobacilos en la mucosa vaginal favorece el desarrollo de oportunistas y el desarrollo de vaginosis bacteriana y mayor riesgo de contraer infecciones de transmisión sexual como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) [2].

Se ha determinado, desde hace tiempo, que las bacterias productoras de ácido láctico (LAB) son las encargadas de mantener en equilibrio la microbiota vaginal, evitando así las infecciones del tracto genitourinario. En las mujeres adultas sanas, el pH es de 4,5 y a su vez las especies predominantes de lactobacilos mantienen el pH bajo a través de su actividad de fermentación, la que protege el área contra la invasión de microorganismos indeseables [3]. La producción de ácido láctico se considera que es el principal mecanismo de protección contra las infecciones vaginales; aunque, algunas especies de lactobacilos producen también peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Sin embargo, existen discrepancias con respecto al efecto protector del H_2O_2 sobre el microambiente vaginal, ya que se ha podido comprobar que las diferentes especies y, más aún, cepas de la misma especie de lactobacilos difieren en la capacidad de producción del mismo [4,5].

Otro de los temas importantes para tener en cuenta de la microbiota vaginal es que se ha demostrado que es región específica, es decir que varía según la población de mujeres que se estudie, no sólo con respecto al grupo etario sino de la región donde habitan [6]. De allí radica la importancia de determinar las poblaciones de lactobacilos específicas de la Argentina.

En la menopausia existen grandes cambios en las células epiteliales como disminución del glucógeno, que podrían contribuir a la comprensión de los mecanismos generales de la colonización por microorganismos asociados a la vaginosis bacteriana (VB) [7].

El concepto clínico de disfunción vaginal (DV) abarca un número elevado de síndromes, y se ha demostrado en estudios previos la dimensión alarmante de los mismos, dado que un 68% de las mujeres asintomáticas en edad fértil mostraron indicadores indubitables de un estado anormal del contenido vaginal, revelando alteraciones generadoras de disfunción de la vagina [8].

El origen de la DV puede responder a factores etiológicos sistémicos o a factores externos, entre los que se incluyen los

procesos infecciosos y en ese contexto se debe considerar la influencia de los anticonceptivos. Se han detectado diferencias en las frecuencias de los síndromes de DV en función del tipo de anticoncepción utilizado, a saber, anticonceptivos orales combinados, implante de dispositivo intrauterino (DIU) o preservativos [8,9]. Si bien existen reportes acerca del efecto de métodos anticonceptivos sobre la microbiota, en el país hay muy pocos estudios diseñados en una comunidad medianamente uniforme que hayan investigado la influencia que ejercen cada uno de estos métodos sobre la microbiota vaginal y sobre los lactobacilos en particular [10]. Tampoco es bien conocido el impacto que ejerce el virus del papiloma humano (VPH) sobre la microbiota vaginal.

El embarazo se asocia a un gran número de infecciones del tracto genital relacionadas con complicaciones perinatales [11,12]. Por otra parte, cabe aclarar que durante el embarazo se producen cambios hormonales como el aporte de estrógeno, que influyen en la microbiota lactobacilar. Teniendo en cuenta la publicación de Perazzi *et al.* [11], quienes describieron una mayor prevalencia de candidiasis en las pacientes colonizadas con EGB, sería importante estudiar las diferentes especies de lactobacilos en dichas pacientes.

Los objetivos de este trabajo fueron: evaluar la DV mediante los estados vaginales básicos (EVB) a través de la metodología del balance del contenido vaginal (BACOVA) y el estudio microbiológico, caracterizar las especies de lactobacilos y determinar su capacidad protectora de la disfunción vaginal en los distintos grupos etarios y subgrupos de riesgo y evaluar la utilidad de diferentes metodologías en la identificación de dichas especies.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio consecutivo, prospectivo, experimental, transversal y de prevalencia, en el cual se incluyeron pacientes mayores de 18 años, con inicio de relaciones sexuales, que presentaron, o no, síntomas al momento de la consulta; atendidas en la División Ginecología del Hospital, entre octubre del 2013 y noviembre de 2016.

Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital y todas las pacientes dieron su consentimiento informado. La población estudiada se clasificó en los siguientes grupos:

- 1) Control: en edad fértil de 18 a 49 años no incluidas en los otros grupos
- 2) Pacientes que utilizaron anticonceptivos orales (ACO)
- 3) Pacientes que utilizaron preservativo (PRE)
- 4) Pacientes que utilizaron DIU
- 5) Pacientes con lesiones causadas por el virus del papiloma humano (VPH)
- 6) Menopáusicas sin tratamiento hormonal de reemplazo (THR), sin VPH y sin método anticonceptivo
- 7) Pacientes embarazadas colonizadas y no colonizadas por EGB y/o con candidiasis.

Los diferentes métodos anticonceptivos fueron utiliza-

dos por las pacientes por un período mayor a 6 meses.

Asimismo, los distintos grupos de riesgo se estratificaron por grupo etario para el análisis de los resultados.

Los criterios de exclusión fueron: uso de antibióticos (ATB) locales o sistémicos dentro de los 15 días previos a la consulta, malformaciones genitales, pacientes en tratamiento con corticoides o quimioterapia, sin inicio de relaciones sexuales, quienes no tengan abstinencia sexual dentro de las 48 horas previas al estudio, pacientes inmunocomprometidas con colagenopatías, vasculopatías y/o transplantadas.

A todas las pacientes se les realizó examen clínico y toma de fondo de saco vaginal para el estudio microbiológico por metodología convencional y estudio de los EVB mediante BACOVA.

El estudio microbiológico del contenido vaginal incluyó los siguientes exámenes:

1. Extendidos para coloración de Gram y May-Grunwald Giemsa prolongado.
2. Observación en fresco con 1 ml de solución fisiológica (SF).
3. Determinación de pH de la secreción vaginal.
4. Observación en fresco con 1 ml de KOH al 10 % y prueba de aminas.
5. Cultivo en medio líquido (Tioglicolato modificado) para *T. vaginalis*, con incubación de 7 días a 37°C en atmósfera de 5 % de CO₂ [13].
6. Cultivo en agar base Columbia con 5 % de sangre humana y en agar Man Rogosa con incubación de 48 horas, a 37°C en atmósfera de 5 % de CO₂, conservando la muestra en medio de Stuart.

La detección de candidiasis se realizó a través de la observación en fresco con solución fisiológica (SF) y con KOH al 10 % y por cultivo en agar Sabouraud y agar sangre.

La investigación de *T. vaginalis* se realizó a través de la observación microscópica directa con SF, la coloración de May-Grunwald Giemsa prolongado y el cultivo en tioglicolato modificado [13,14]. El diagnóstico de VB se realizó utilizando el criterio de Nugent cuando el *score* fue ≥ 7 [15] y el criterio de Amsel, es decir, la presencia de 3 o más de los siguientes criterios [16]:

- Observación de *clue-cells* en la coloración de Gram [célula cubierta con bacilos cortos gram negativos y/o alteración de la morfología celular].
- pH $\geq 4,5$.
- Prueba de aminas positiva.
- Descarga vaginal fina y homogénea.

En el caso de las pacientes asintomáticas, el diagnóstico de VB se efectuó solamente utilizando el criterio de Nugent.

El estudio del BACOVA, incluyó el análisis morfológico del contenido vaginal en función de la relación del valor numérico (VN) y la reacción inflamatoria vaginal (RIV), identificándose cinco EVB: microbiota normal (I), microbiota normal más reacción inflamatoria (II), microbiota intermedia (III), VB (IV) y vaginitis microbiana inespecífica (V) (Fotos 1 a 5) [17]. El valor numérico se determinó evaluando los diferentes mor-

fotipos en la coloración de Gram según el criterio de Nugent [15]. La cuantificación de leucocitos se evaluó mediante tinción de May-Grunwald Giemsa y se expresó como número de leucocitos por campo (400X) calculando el recuento medio de leucocitos dentro de 10 campos microscópicos no adyacentes [17].

La investigación de la portación de estreptococo grupo B (EGB) se realizó en hisopado anal e introito vaginal en la semana 35 a 37 de embarazo. Ambos hisopos se sembraron en caldo Todd Hewitt suplementado con colistina (10 µg/ml) y ácido nalidíxico (15 µg/ml). Luego de 24 horas de incubación a 37°C se realizaron subcultivos en agar cromogénico, con posterior incubación a 37°C en atmósfera de 5 % de CO₂ durante 48 horas. Las colonias compatibles con EGB se identificaron con las pruebas bioquímicas convencionales.

Para el aislamiento de las distintas especies de lactobacilos se utilizó el agar sangre y el agar Man Rogosa y la identificación se efectuó por medio de pruebas convencionales basadas en la fermentación de hidratos de carbono [18], mediante Espectrometría de Masa BD™ Bruker MALDI-TOF (Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz, con detector de iones por Tiempo de Vuelo), utilizando una base de datos que incluyó más de 90 especies de lactobacilos, considerando un *score* $\geq 1,7$ para nivel de especie [19], a través de secuenciación del gen ADNr 16S [método de referencia] [20].

Se midió la producción de H₂O₂ por parte de las diferentes especies de lactobacilos, mediante un ensayo semicuantitativo (Merckquant Peroxide Test), expresándose los resultados en los siguientes rangos: negativo, 1 - 3, 3 - 10 y 10 - 30 mg/l de H₂O₂ [21].

Para comparar las prevalencias de los EVB y de las especies de lactobacilos en los distintos grupos etarios y subgrupos de riesgo se utilizó el test de Chi cuadrado (χ^2) y el test de Fisher.

Foto 1: EVB I.- MICROBIOTA NORMAL (MN): Lactobacilos: observación en la coloración de Gram (1000X) del contenido vaginal.

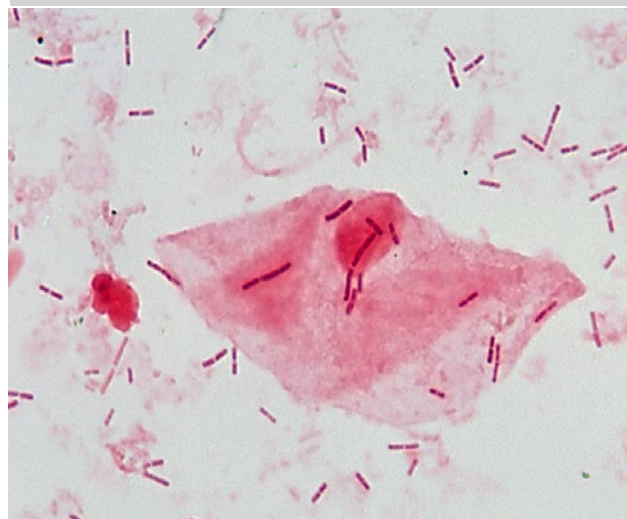


Foto 2. EVB II.-MICROBIOTA NORMALCON REACCIÓN INFLAMATORIA (MN+RIV): Levaduras con pseudohifas: observación en la coloración de Gram (1000X) del contenido vaginal.

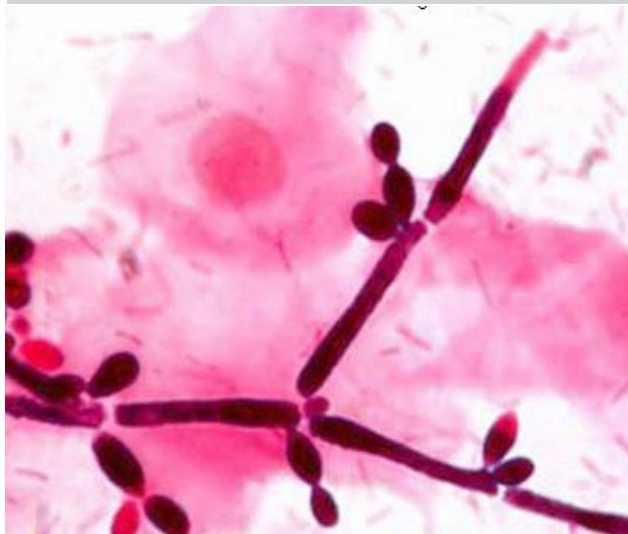


Foto 3. EVB III.-MICROBIOTA INTERMEDIA (MI): Lactobacilos y morfotipos compatibles con anaerobios: observación en la coloración de Gram (1000X) del contenido vaginal.

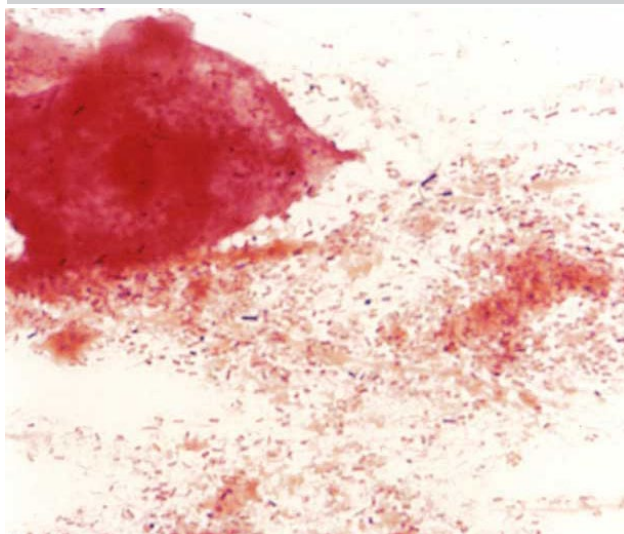


Foto 4. EVB IV.-VAGINOSIS BACTERIANA (VB): Morfotipos compatibles con anaerobios: observación en la coloración de Gram (1000X) del contenido vaginal.

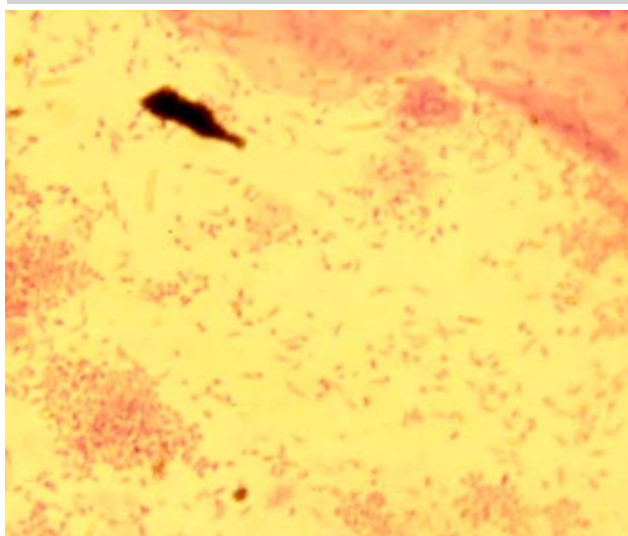
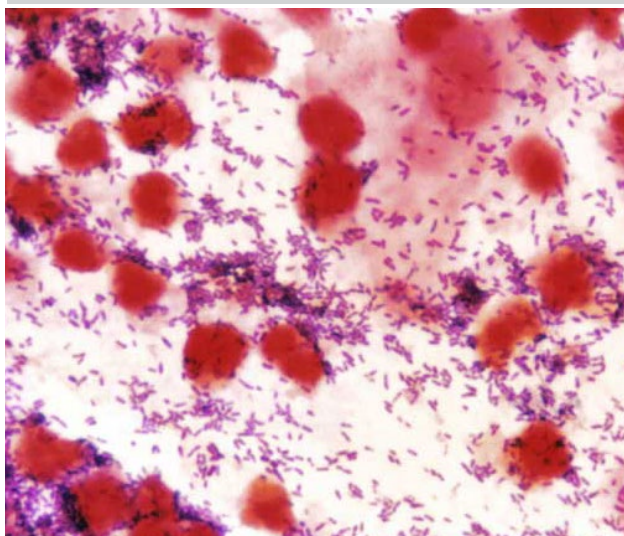


Foto 5. EVB V.-VAGINITIS MICROBIANA INESPECIFICA (VMI): Morfotipos bacterianos extraños: corineformes: observación en la coloración de Gram (1000X) del contenido vaginal.



Resultados

Se estudiaron 448 pacientes no embarazadas, quienes se dividieron en 3 grupos etarios, de 18 a 24 años ($n= 65$), de 25 a 50 años ($n= 186$) y mayores a 50 años ($n= 118$) y en un grupo control ($n= 79$). En los 3 grupos etarios se observó un predominio de pacientes asintomáticas con prevalencias para los grupos de 18 a 24 años, 25 a 50 años y mayores de 50 años de 72,3 %, 69,9 % y 86,4 %, respectivamente. También se estudiaron 210 mujeres embarazadas divididas en tres grupos, colonizadas por EGB ($n= 37$), con candidiasis ($n= 25$), colonizadas con EGB y con candidiasis ($n= 15$) y en un grupo control no colonizadas ($n= 133$).

La distribución de los EVB en cada grupo etario y en el control, correspondientes a las pacientes no embarazadas,

Tabla I. Distribución de los estados vaginales básicos (EVB) según cada grupo etario y en el control

GRUPO DE ESTUDIO	18-24 años (n=65)		25-50 años (n=186)		>50 años (n=118)		Control (n=79)	
	n	%	N	%	N	%	n	%
I	27,0	41,6	79,0	42,5	72,0	61,0	41,0	51,9
II	8,0	12,3	45,0	24,2	20,0	16,9	11,0	13,9
III	3,0	4,6	6,0	3,2	2,0	1,7	5,0	6,3
IV	13,0	20,0	29,0	15,6	14,0	11,9	14,0	17,7
V	14,0	21,5	27,0	14,5	10,0	8,5	8,0	10,2
Total	65,0	100	186	100	118	100	79	100

se observa en la tabla I. Las prevalencias de EVB de desbalance del contenido vaginal (III, IV y V) (DCV) en el grupo de 18 a 24 años, de 25 a 50 años y mayores de 50 años fueron similares a las prevalencias de EVB con microbiota normal (I y II) respecto del control, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas (p= 0,20; 0,98 y 0,08, respectivamente).

La distribución de los patógenos (levaduras, VB y trichomonas) según los EVB en cada grupo etario y en el control se observa en la tabla II. La VB se asoció exclusivamente a los EVB IV y V en todos los grupos etarios y en el control. Las levaduras se asociaron principalmente al EVB I en todos los grupos etarios y en el control y en menor medida a los EVB II al V, en los grupos de 18 a 24 años y de 25 a 50 años. Tanto el grupo de 18 a 24 años como los grupos de 25 a 50 y mayor de 50 años presentaron mayores prevalencias de VB (41,5 %; 25,8 % y 19,5 %) que de levaduras (18,4 %; 14,0 % y 7,6 %), respectivamente, resultando estas diferencias estadísticamente significativas para todos los grupos etarios (p = 0,01). La distribución de los patógenos (levaduras, VB

y trichomonas) según BACOVA y cultivo en cada grupo etario y en el control se observa en la tabla III.

Un 45,0 % de las pacientes con VPH del grupo de 18 a 24 años, presentaron algún grado de desbalance del contenido vaginal. Sin embargo, ninguno de los grupos etarios de pacientes con VPH, presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los EVB de desbalance y los EVB con microbiota normal al comparar con el grupo control (p = 0,55; p = 0,65; p = 0,21, respectivamente) (Tabla IV).

Al analizar la influencia de los ACO se observó un predominio de microbiota lactobacilar (65,2 % en el grupo de 18 a 24 años y 67,6 % en el grupo de 25 a 50 años), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los EVB con microbiota lactobacilar y los EVB de desbalance, al comparar con el grupo control (p = 0,81 y 0,94, respectivamente) (Tabla V).

Las pacientes que utilizaron PRE mostraron prevalencias de EVB de desbalance del contenido vaginal en el grupo de 18 a 24 años de 61,9 % y en el de 25 a 50 años de 38,4 %, no mostrando diferencias significativas entre los EVB de

Tabla II. Distribución de levaduras, vaginosis bacteriana y trichomonas según los estados vaginales básicos (EVB) en cada grupo etario y en el control.

EVBS	LEVADURAS								VAGINOSIS BACTERIANA								TRICHOMONAS							
	18-24 años (n=65)		25-50 años (n=186)		>50 años (n=118)		Control (n=79)		18-24 años (n=65)		25-50 años (n=186)		>50 años (n=118)		Control (n=79)		18-24 años (n=65)		25-50 años (n=186)		>50 años (n=118)		Control (n=79)	
	N	%	n	%	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
I	5	7,7	7	3,8	7	5,9	8	10,1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1,6	0	0	1	0,9	0	0
II	3	4,6	5	2,7	2	1,7	3	3,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	0	0	2	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1,3	
IV	1	1,5	4	2,1	0	0	3	3,8	13	20,0	28	15,1	15	12,7	15	19,0	1	1,6	0	0	0	0	0	0
V	3	4,6	8	4,3	0	0	3	3,8	14	21,5	20	10,7	8	6,8	7	8,8	2	3,1	1	0,5	0	0	0	0
Total	12	18,4	26	14,0	9	7,6	17	21,5	27	41,5	48	25,8	23	19,5	22	27,8	4	6,3	1	0,5	1	0,9	1	1,3

Tabla III. Prevalencia de levaduras, vaginosis bacteriana y trichomonas según BACOVA y cultivo en cada grupo etario y en el control.

PATÓGENO	18-24 años (n=65)				25-50 años (n=186)				>50 años (n=118)				Control (n=79)			
	BACOVA		Cultivo		BACOVA		Cultivo		BACOVA		Cultivo		BACOVA		Cultivo	
	n	%	N	%	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Levaduras	12	18,4	17	26,1	26	14,0	35	18,8	9	7,6	9	7,6	17	21,5	19	24,0
VB	27	41,5	27	41,5	48	25,8	48	25,8	23	19,5	23	19,5	22	27,8	22	27,8
Trichomonas	4	6,1	4	6,1	1	0,5	2	1,1	1	0,8	1	0,8	1	1,3	2	2,5

► ^aVB: vaginosis bacteriana

desbalance y los EVB con microbiota lactobacilar en ambos grupos ($p = 0,06$ y $0,81$, respectivamente), al comparar con el grupo control (Tabla VI). Las pacientes que utilizaron este método se asociaron a EVB con reacción inflamatoria en $41,7\%$ y $40,4\%$ en los grupos de 18-24 años y 25-50 años respectivamente.

Las pacientes del grupo de 25 a 50 años que utilizaron DIU mostraron prevalencias de EVB de desbalance del contenido vaginal de $40,7\%$. Sin embargo, estas pacientes no mostraron diferencias significativas entre los EVB de desbalance y los EVB con microbiota normal al comparar con el grupo control ($p = 0,74$) (Tabla VII).

Las pacientes menopáusicas que no utilizaron ningún método anticonceptivo, ni presentaban VPH, ni recibían THR ($n = 99$), presentaron estados de desbalance del contenido vaginal en $20,2\%$, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los EVB de desbalance y los EVB con microbiota normal al comparar con el control ($p = 0,05$) (Tabla VIII). La prevalencia de microbiota lactobacilar en este grupo fue de $43,4\%$, la que resultó estadísticamente significativa respecto del control ($p = 0,01$) (Tabla IX).

Se identificaron 195/250 (78%) de aislamientos de lactobacilos predominando *L. crispatus* ($n = 68$), *L. gasseri* ($n = 56$) y *L. jensenii* ($n = 54$) en toda la población de pacientes no embarazadas. En la Foto 6 se visualiza la morfología

de *L. crispatus*, *L. jensenii* y *L. gasseri* en la coloración de Gram. Las pacientes menopáusicas presentaron mayor prevalencia de *L. gasseri* respecto de todos los grupos y del control ($p < 0,01$). Los grupos ACO y PRE mostraron mayor prevalencia de *L. crispatus* al igual que el control respecto de las menopáusicas ($p < 0,01$). El grupo VPH mostró menor prevalencia de *L. crispatus* respecto del control ($p = 0,01$) y similar a las pacientes menopáusicas y mayor prevalencia de *L. gasseri* respecto de ACO y PRE ($p = 0,04$; $0,02$ respectivamente) (Tabla X).

Por otra parte, en todas las pacientes embarazadas se identificaron 210 especies de lactobacilos, predominando *L. gasseri* ($n = 61$), *L. crispatus* ($n = 59$) y *L. jensenii* ($n = 56$). La totalidad de las pacientes embarazadas presentaron menor prevalencia de *L. crispatus* ($28,1\%$) en comparación al grupo control de pacientes no embarazadas ($55,0\%$), en forma estadísticamente significativa ($p < 0,01$). En concordancia con esta disminución, se observó una tendencia a presentar una mayor prevalencia de *L. jensenii* ($26,7\%$) en comparación al grupo control de pacientes no embarazadas ($15,0\%$), aunque no resultó estadísticamente significativo ($p = 0,08$). La prevalencia de *L. gasseri* fue similar entre las pacientes embarazadas y el grupo control ($29,0\%$ y $25,0\%$, respectivamente) ($p = 0,74$).

Las pacientes embarazadas con candidiasis y las coloni-

Tabla IV. Frecuencia de los estados vaginales básicos (EVB) de desbalance del contenido vaginal en pacientes con virus del papiloma humano (VPH) según cada grupo etario.

GRUPO DE ESTUDIO	18 – 24 años (n=20)		25 – 50 años (n=45)		> 50 años (n=15)		Control (n=79)	
	N	%	n	%	N	%	n	%
Desbalance del contenido vaginal (III - IV – V)	9	45,0	13	28,9	3	20,0	27	34,2
Microbiota normal (I - II)	11	55,0	32	71,1	12	80,0	52	65,8
Total	20	100	45	100	15	100	79	100

Tabla V. Frecuencia de los estados vaginales básicos (EVB) de desbalance del contenido vaginal en pacientes que utilizan anticonceptivos orales (ACO) según cada grupo etario.

GRUPO DE ESTUDIO	18 – 24 años (n=23)		25 – 50 años (n=38)		Control (n=79)	
	n	%	n	%	n	%
Desbalance del contenido vaginal (III - IIV – V)	8	34,8	12	32,4	27	34,2
Microbiota normal (I - II)	15	65,2	26	67,6	52	65,8
Total	23	100	38	100	79	100

zadas con EGB mostraron mayor prevalencia de *L. gasseri* (37,8 % y 40 %, respectivamente) en comparación al grupo control de pacientes embarazadas no colonizadas (20,3 %), en forma estadísticamente significativa ($p = 0,03$). Las pacientes embarazadas con candidiasis y colonizadas con EGB no presentaron *L. crispatus* y mostraron mayor prevalencia de *L. gasseri* (66,6 %) en comparación al grupo control no colonizadas (29,3 % y 20,3 % respectivamente), encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,01$ y $< 0,01$, respectivamente). La totalidad de las pacientes embarazadas colonizadas mostraron una mayor prevalencia de *L. gasseri* (44,1 %) en comparación al grupo control no colonizadas (20,3 %) ($p < 0,01$). La totalidad de las pacientes embarazadas colonizadas mostraron una tendencia a presentar menor prevalencia de *L. jensenii* (19,5 %) en comparación al grupo control no colonizadas (30,8 %) ($p = 0,05$). Asimismo, la totalidad de las pacientes embarazadas colonizadas también mostraron una menor prevalencia de *L. iners* (3,9 %) en comparación al grupo control no colonizadas (14,2 %) ($p = 0,01$) [Tabla XI].

La producción de H_2O_2 por parte de las diferentes especies de lactobacilos estudiadas se muestra en la tabla XII. Un 96 % de los aislamientos de *L. crispatus* produjeron fuertemente H_2O_2 (> 3 mg/l), a diferencia de los aislamientos de *L. gasseri* que ninguno fue productor fuerte, un 49 % lo hizo débilmente y un 51 % resultó negativo ($p < 0,0001$). Asimismo, un 61% de los aislamientos de *L. jensenii* produjeron fuertemente H_2O_2 , un 27 % lo hizo débilmente y el 12

% restante fue negativo, lo que también resultó diferente en forma significativa respecto de los aislamientos de *L. gasseri* ($p < 0,0001$).

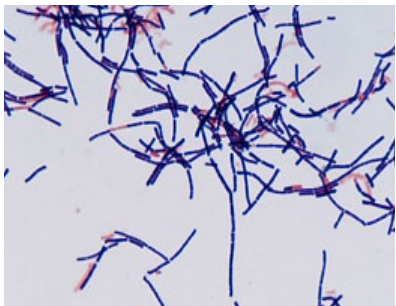
En la especie *L. gasseri*, la mayoría de los azúcares presentan diversos tipos bioquímicos, con lo cual no pudo ser diferenciada esta especie de *L. crispatus* y *L. jensenii* y en particular dependiendo del resultado de la lactosa. Además, varios aislamientos fueron identificados como *L. gasseri* por fermentar la rafinosa y sin embargo resultaron *L. crispatus* por medio de MALDI- TOF y secuenciación del ADNr 16S. Asimismo, varios de los aislamientos estudiados no se pudieron diferenciar entre *L. gasseri* y *L. jensenii* a través de la fermentación de azúcares, siendo entonces ambas especies posibles, aunque por MALDI- TOF y secuenciación del ADNr 16S resultaron ser *L. jensenii*.

La metodología MALDI-TOF MS (espectrometría de masa) MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Germany) mostró una concordancia del 100 % con la secuenciación del gen ADNr 16S para todas las especies de lactobacilos estudiadas (Tabla XIII).

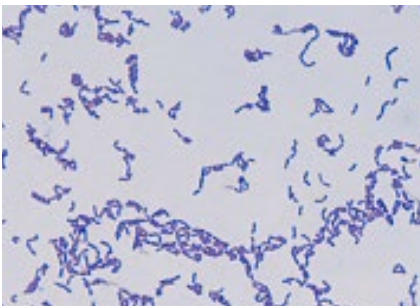
Discusión

Se observaron variaciones en la microbiota vaginal según el grupo etario, siendo los patógenos más prevalentes la VB y la candidiasis. Cabe destacar la mayor prevalencia de VB respecto de candidiasis en todos los grupos etarios, tal como lo describe la literatura [22]. En lo que respecta a la candidiasis, predominó en el EVB I en todas las edades, su-

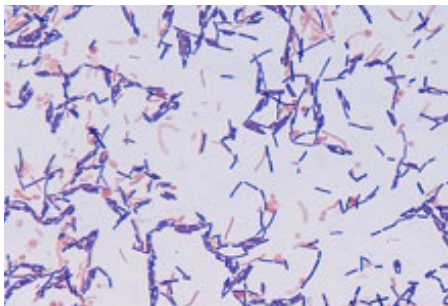
Foto 6. Morfología de *Lactobacillus* spp.: observación en la coloración de Gram (1000X)



► *L. crispatus*



► *L. jensenii*



► *L. gasseri*

Tabla VI. Frecuencia de los estados vaginales básicos (EVB) de desbalance del contenido vaginal en pacientes que utilizan anticonceptivos orales (ACO) según cada grupo etario.

GRUPO DE ESTUDIO	18 – 24 años (n=21)		25 – 50 años (n=73)		Control (n=79)	
	n	%	n	%	n	%
Desbalance del contenido vaginal (III - IIV – V)	13	61,9	28	38,4	27	34,2
Microbiota normal (I - II)	8	38,1	45	61,6	52	65,8
Total	21	100	73	100	79	100

giriendo su rol como colonizante. Sin embargo, resaltamos que las pacientes en que se asoció a EVB con RIV (II y V) correspondieron a la edad fértil, al igual que lo refiere Tibaldi *et al* [23].

Un 45,0 % de las pacientes con VPH correspondientes al grupo etario de 18 a 24 años presentaron algún grado de DV, que si bien no se diferenció significativamente del grupo control esto podría deberse al tamaño muestral. Estos resultados coinciden con lo que refiere la literatura, al describir prevalencias de entre 25 - 60 % aproximadamente de VB en pacientes con VPH [24,25], demostrando una asociación positiva entre ambos patógenos, tal como lo refiere Gillet *et al.* [25].

En las pacientes con ACO en edad fértil, se observó el predominio de la microbiota lactobacilar, al igual que lo describe en la literatura [9,26]. Esto podría ser explicado a partir de la hipótesis más aceptada, la que afirma que el equilibrio de la microbiota del contenido vaginal de la mujer en edad fértil está prioritariamente establecido por mecanismos hormonales, principalmente por el “efecto estrógeno”, que tiende a disminuir la frecuencia de VB, tal como lo refieren Vodstrcil *et al.* [10] y Tibaldi *et al* [23].

En las pacientes que utilizaron PRE, tanto de los grupos de 18 - 24 años como de 25 - 50 años presentaron una tendencia a EVB con RIV al utilizar este método. Estos resultados coinciden con la literatura que hace referencia a la presencia de dermatitis vaginales, vulvovaginitis alérgicas e irritativas y estados inflamatorios asociados al uso de PRE,

ya sea por la influencia del látex o por los espermicidas (nonoxinol-9) [27,28].

Un 40,7 % de las pacientes del grupo de 25 a 50 años que utilizaron DIU presentaron algún grado de DV, que si bien no se diferenció significativamente del control esto podría deberse al tamaño muestral. Resultados similares fueron descritos por Gupta *et al* [9], quienes refirieron que los métodos de barrera alteran el ecosistema vaginal por representar un cuerpo extraño con permanencia física por largos tiempo. Madden *et al* [29] demostraron que la incidencia de VB fue superior en las usuarias de DIU con relación a otros métodos. Las pacientes menopáusicas que no utilizaron método anticonceptivo, ni presentaban VPH, ni recibían THR presentaron estados de DV de 20,2 %, similar al grupo control. Estos resultados correlacionan con un elevado porcentaje de microbiota lactobacilar (43,4 %), en coincidencia con lo referido por Pabich *et al.* [30].

Las especies de lactobacilos predominantes en toda la población estudiada fueron *L. crispatus*, *L. gasseri* y *L. jensenii*, tal como lo describe la literatura que refiere que, a pesar de existir algunas diferencias según las poblaciones estudiadas, estas tres especies representan las más frecuentes en la mayoría de las mujeres provenientes de los diferentes países del mundo [4,6,20]. Sin embargo, cabe aclarar que los resultados obtenidos dependen de técnicas sesgadas como el cultivo, dado que su limitada capacidad puede ser el resultado de la combinación óptima de nutrientes, temperaturas de crecimiento, niveles de oxígeno o, po-

Tabla VII. Frecuencia de los estados vaginales básicos (EVB) de desbalance del contenido vaginal en pacientes con dispositivo intrauterino (DIU) según cada grupo etario.

GRUPO DE ESTUDIO	25 – 50 años (n=27)		Control (n=79)	
	n	%	n	%
Desbalance del contenido vaginal (III - IIV – V)	11	40,7	27	34,2
Microbiota normal (I - II)	16	59,3	52	65,8
Total	27	100	79	100

Tabla VIII. Frecuencia de los estados vaginales básicos (EVB) de desbalance del contenido vaginal en pacientes menopáusicas.

GRUPO DE ESTUDIO	> 50 años (n=99)		Control (n=79)	
	n	%	n	%
Desbalance del contenido vaginal (III - IIV – V)	20	20,2	27	34,2
Microbiota normal (I - II)	79	79,8	52	65,8
Total	99	100	79	100

tencialmente la necesidad de co-cultivar con socios microbianos clave [4].

El grupo VPH presentó menor prevalencia de *L. crispatus* respecto del control y mayor de *L. gasseri*, respecto de ACO y PRE, en coincidencia con lo descripto por Gao *et al.* [24] y por Dareng *et al.* [31]. Estos resultados se corresponden con los descriptos por Clarke *et al.* [32], quienes relataron que la elevación del pH se asociaba con un mayor riesgo de infección por VPH, dado que se observó que *L. crispatus* es capaz de acidificar el medio vaginal a pH menor de 4,0, mientras que otros como *L. gasseri* alcanzan un pH mas elevado que oscila entre 4,4- 5,0 [1,6].

Los grupos ACO y PRE mostraron mayor prevalencia de *L. crispatus* al igual que el control respecto de las pacientes menopáusicas, en coincidencia con estudios que evaluaron la influencia del ciclo menstrual sobre la microbiota, sugiriendo que los niveles de estradiol promueven el desarrollo de *L. crispatus* [26]. Asimismo, la asociación entre el uso de preservativo y *L. crispatus* también fue descripta por Ma *et al.* [33].

Las pacientes menopáusicas presentaron mayor prevalencia de *L. gasseri* respecto de todos los grupos al igual que lo descripto por Brotman *et al.* [34]. Sin embargo, la presencia de esta especie no brindaría un rol protector, teniendo en cuenta que ningún aislamiento de esta especie produjo fuertemente H₂O₂. Resultados similares fueron descriptos por diversos autores, tales como Song *et al.* [5], quienes

refirieron que sólo un 40% de las cepas de *L. gasseri* fueron fuertemente productoras de H₂O₂. Además, el escaso rol protector de *L. gasseri* se asocia también con su menor capacidad de disminuir el pH vaginal [6] y, por lo tanto, con una mayor predisposición a estados de vaginosis bacteriana [1,35]. A diferencia de *L. gasseri*, el 96 % y el 61 % de los aislamientos de *L. crispatus* y *L. jensenii* respectivamente, produjeron fuertemente H₂O₂, lo que indicaría el rol protector de estas especies. Resultados similares también fueron descriptos por Song *et al.* [5] y Pendharkar *et al.* [36], quienes refirieron que la mayoría (> 85 %) de las cepas de *L. crispatus* y *L. jensenii* producen fuertemente H₂O₂.

En las pacientes embarazadas las especies más prevalentes fueron *L. crispatus* y *L. gasseri* seguido de *L. jensenii*, al igual que lo describieron Petricevic *et al.* [2] y El Aila *et al.* [37]. En la literatura no existen reportes que describan las especies de lactobacilos prevalentes en el embarazo según estén o no colonizadas por EGB y/o con candidiasis. En este trabajo se detectó que las pacientes embarazadas colonizadas con EGB y/o con candidiasis presentaron mayor prevalencia de *L. gasseri* respecto de las no colonizadas y que en el caso particular de las pacientes colonizadas por EGB y con candidiasis, no presentaron *L. crispatus* a diferencia de las no colonizadas en quienes esta especie resultó ser una de las predominantes. Asimismo, la totalidad de las pacientes embarazadas colonizadas mostraron una tendencia a presentar menor prevalencia de *L. jensenii*.

Tabla IX. Frecuencia de microbiota lactobacilar en pacientes menopáusicas.

GRUPO DE ESTUDIO	> 50 años (n=99)		Control (n=79)	
	n	%	n	%
Microbiota no lactobacilar	56	57,6	27	34,2
Microbiota lactobacilar	43	43,4	52	65,8
Total	99	100	79	100

Tabla X. Distribución de las especies de *Lactobacillus* en los distintos grupos de riesgo de las pacientes no embarazadas.

GRUPO DE ESTUDIO						
Especies	Preservativo (n=44)	ACO ^a (n=32)	VPH ^b (n=36)	DIU ^c (n=10)	Menopáusica (n=33)	Control (n=40)
<i>L. crispatus</i> (n=68)	19	12	9	2	4	22
<i>L. gasseri</i> (n=56)	5	4	12	3	22	10
<i>L. jensenii</i> (n=54)	12	14	11	5	6	6
<i>L. iners</i> (n=9)	5	1	2	0	0	1
<i>L. salivarius</i> (n=3)	1	1	0	0	1	0
<i>L. vaginalis</i> (n=3)	0	0	2	0	0	1
<i>L. paracasei</i> (n=1)	1	0	0	0	0	0
<i>L. rhamnosus</i> (n=1)	1	0	0	0	0	0
Total (n=195)	44	32	36	10	33	40

► a ACO: Anticonceptivo oral; b VPH: Virus del Papiloma humano; c DIU: Dispositivo intrauterino

Estos hallazgos podrían deberse a que, en las pacientes colonizadas tanto por EGB como con candidiasis, dichos microorganismos provendrían del tracto intestinal y probablemente las especies de lactobacilos que los acompañan tengan el mismo origen. De esta forma se explicaría la asociación de ellos con *L. gasseri*, una especie con escaso rol

protector, en lugar de *L. crispatus* y *L. jensenii* que son las especies predominantes y protectoras del contenido vaginal. En este sentido, el escaso rol protector de *L. gasseri* se relacionaría con una mayor predisposición a la adquisición de distintas infecciones vaginales tales como vaginosis bacteriana e infecciones de transmisión sexual, que se rela-

Tabla XI. Distribución de las especies de *Lactobacillus* de pacientes embarazadas según la colonización.

Especies	Candida spp (n=37)	EGB ^a (n=25)	Candida spp + EGB (n=15)	CONTROL (no colonizada) (n=133)
<i>L. gasseri</i> (n=61)	14	10	10	27
<i>L. crispatus</i> (n=59)	14	6	0	39
<i>L. jensenii</i> (n=56)	7	6	2	41
<i>L. iners</i> (n=22)	0	2	1	19
<i>L. johnsonii</i> (n=2)	0	0	1	1
<i>L. vaginalis</i> (n=5)	1	1	1	2
<i>L. paracasei</i> (n=1)	0	0	0	1
<i>L. acidophilus</i> (n=1)	0	0	0	1
<i>L. mucosae</i> (n=2)	0	0	0	2
<i>L. murinus</i> (n=1)	1	0	0	0
Total (n=210)	37	25	15	133

► EGB: Estreptococo grupo B

Tabla XII. Producción de H₂O₂ por las diferentes especies de *Lactobacillus*.

Especies	Nº de especies que producen la siguiente cantidad de H ₂ O ₂ (mg/l)			
	negativa	1-3	3-10	10-30
<i>L. crispatus</i> (n=127)	0	5	42	80
<i>L. gasseri</i> (n=117)	60	57	0	0
<i>L. jensenii</i> (n=110)	13	30	67	0
<i>L. iners</i> (n=31)	0	16	15	0
<i>L. johnsonii</i> (n=2)	0	0	2	0
<i>L. vaginalis</i> (n=5)	1	1	2	3
<i>L. salivarius</i> (n=3)	0	0	3	0
<i>L. paracasei</i> (n=1)	0	1	0	0
<i>L. rhamnosus</i> (n=1)	0	0	1	0
<i>L. acidophilus</i> (n=1)	0	0	1	0
<i>L. mucosae</i> (n=2)	0	1	1	0
<i>L. murinus</i> (n=1)	0	1	0	0
Total (n=401)	74	112	134	83

cionarían con complicaciones perinatológicas.

La fermentación de los hidratos de carbono constituye una metodología muy laboriosa y que no mostró utilidad en la diferenciación bioquímica de las principales especies del contenido vaginal (*L. crispatus*, *L. jensenii* y *L. gasseri*).

El método MALDI-TOF MS (espectrometría de masa) demostró excelente concordancia con la secuenciación de ADNr 16S [método de referencia], para todas las especies de lactobacilos estudiadas tal como lo describieron Anderson *et al.* [38]. Por lo tanto, este estudio permitió demostrar que esta metodología resultó ser una herramienta confiable y rápida que puede ser implementada en la práctica clínica para caracterizar las especies de lactobacilos vaginales.

En conclusión, se observó DV en los distintos grupos etarios y en sus subgrupos de riesgo, asociada a la presencia de levaduras y/o VB, siendo la VB el patógeno más prevalente en todos los grupos etarios. Se resalta el efecto protector ejercido por *L. crispatus* en ACO y PRE y en este último con RIV. Contrariamente las pacientes con infección por VPH y con DIU mostraron una tendencia a desarrollar DV, en coincidencia con la disminución de *L. crispatus* y el aumento de *L. gasseri*. En la menopausia predominó *L. gasseri*, especie relacionada con la predisposición a la DV. En las pacientes embarazadas no colonizadas predominó *L. crispatus* y *L. jensenii* (especies protectoras), mientras que en las colonizadas por EGB y/o con candidiasis predominó *L. gasseri* (especie con escaso rol protector), asociada a estos microor-

ganismos de origen intestinal. La espectrometría de masa resultó ser una metodología confiable y rápida que puede ser implementada en la práctica clínica para caracterizar las especies de lactobacilos vaginales.

Referencias bibliográficas

1. Ravel J, Brotman RM, Gajer P, Ma B, Nandy M, Fadrosch DW, *et al.* Daily temporal dynamics of vaginal microbiota before, during and after episodes of bacterial vaginosis. *Microbiome* 2013;1:29.
2. Petricevic L, Domig KJ, Nierscher FJ, Krondorfer I, Janitschek C, Kneifel W, *et al.* Characterisation of the oral, vaginal and rectal *Lactobacillus* flora in healthy pregnant and postmenopausal women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012; 160:93–9.
3. Nam H, Whang K, Lee Y. Analysis of vaginal lactic acid producing bacteria in healthy. *J Microbiol* 2007; 45:515-20.
4. Lamont RF, Sobel JD, Akins RA, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, *et al.* The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG* 2011;118:533-49.
5. Song YL, Kato N, Matsumiya Y, Liu CX, Kato H, Watanabe K. Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from Japanese women and newborn infants. *J Clin Microbiol* 1999;37:3062-4.
6. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle

Tabla XIII. Identificación de las especies de *Lactobacillus* mediante metodología de espectrometría de masa MALDI-TOF MS y ADNr 16S.

ESPECIES	MALDI-TOF-MS	ADNr 16S	Concordancia [%]
<i>L. crispatus</i>	92	92	100
<i>L. gasseri</i>	95	95	100
<i>L. jensenii</i>	89	89	100
<i>L. iners</i>	32	31	100
<i>L. salivarius</i>	3	3	100
<i>L. vaginalis</i>	8	8	100
<i>L. johnsonii</i>	2	2	100
<i>L. paracasei</i>	2	2	100
<i>L. mucosae</i>	2	2	100
<i>L. murinus</i>	1	1	100
<i>L. rhamnosus</i>	1	1	100
<i>L. acidophilus</i>	1	1	100
TOTAL	328	328	100

- SL, *et al.* Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108 Suppl 1:4680-7.
7. Cauci S, Driussi S, De Santo D, Penacchioni P, Iannicelli T, Lanzafame P, *et al.* Prevalence of bacterial vaginosis and vaginal flora changes in peri- and postmenopausal women. *J Clin Microbiol* 2002;40:2147-52.
 8. Fosch S, Yones C, Trossero M, Grosso O. The influence of different contraceptive methods on vaginal microbiota: Clinical study. *Health* 2013;5:19-24
 9. Gupta K, Hillier SL, Hooton TM, Roberts PL, Stamm WE. Effects of contraceptive method on the vaginal microbial flora: a prospective evaluation. *J. Infect. Dis* 2000;181:595-601.
 10. Vodstrcil LA, Hocking JS, Law M, Walker S, Tabrizi SN, Fairley CK, *et al.* Hormonal contraception is associated with a reduced risk of bacterial vaginosis: a systematic review and meta-analysis. *PloS One* 2013;8:e73055.
 11. Perazzi B, Coppolillo E, Losada M, Cora Eliseth M, Malamud de Rudavega H, de Torres R, *et al.* Estudio de la microbiota vaginal en pacientes embarazadas portadoras de estreptococo grupo B. *Revista de la Sociedad de Obstetricia y Ginecología de Buenos Aires* 2008;205:12-19.
 12. Subtil D, Denoit V, Le Gouëff F, Husson MO, Trivier D, Puech F. The role of bacterial vaginosis in preterm labor and preterm birth: a case-control study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002;10:41-6.
 13. Poch F, Levin D, Levin S, Dan M. Modified thioglycolate médium: a simple and reliable means for detection of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1996;34:2630-1.
 14. Perazzi BE, Menghi CI, Coppolillo EF, Gatta C, Eliseth MC, de Torres RA, *et al.* Prevalence and comparison of diagnostic methods for *Trichomonas vaginalis* infection in pregnant women in Argentina. *Korean J Parasitol* 2010;1:61-5.
 15. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 1991;29:279-301.
 16. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis: Diagnosis criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 1983;74:14-22.
 17. De Torres RA, editor. 2012. Proyecto BACOVA, Programa PROSAR, Manual de Procedimientos BACOVA. Fundación Bioquímica Argentina. [On-line] <http://www.fba.org.ar/programas/prosar/bacova.html>. Consultado el 06 de junio de 2016.
 18. Jorgensen JH, Pfaller MA, Carrol KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, Warnock DW, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th edition. Washington DC, ASM Press, 2015.
 19. Karas M, Kruger R. Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism. *Chemical Reviews* 2003;03:427440.
 20. Pavlova SI, Kilic AO, Kilic SS, SO JS, Nader-Macias ME, Simoes JA, *et al.* Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries on 16S rRNA gene sequences. *J Appl Microbiol* 2002;92:451-9.
 21. Wilks M, Wiggins R, Whiley A, Hennessy E, Warwick S, Porter H, *et al.* Identification and H₂O₂ production of vaginal lactobacilli from pregnant women at high risk of preterm birth and relation with outcome. *J Clin Microbiol* 2004;42:713-17.
 22. Drell T, Lillsaar T, Tummeleht L, Simm J, Aaspõllu A, Väin E, *et al.* Characterization of the vaginal micro- and mycobioime in asymptomatic reproductive-age Estonian women. *PLoS One* 2013;8:e54379.
 23. Tibaldi C, Cappello N, Latino MA, Masuelli G, Marini S, Benedetto C. Vaginal and endocervical microorganisms in symptomatic and asymptomatic non-pregnant females: risk factors and rates of occurrence. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:670-9.
 24. Gao W, Weng J, Gao Y, Chen X. Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 2013;13:271.
 25. Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, Bosire C, De Sutter P, Temmerman M, *et al.* Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2011;11:10.

26. van de Wijgert JH, Verwijs MC, Turner AN, Morrison CS. Hormonal contraception decreases bacterial vaginosis, but oral contraception may increase candidiasis: implications for HIV transmission. *AIDS* 2013;27:2141-53.
27. Moraes PS, Taketomi EA. Allergic vulvovaginitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;85:253-65.
28. Schreiber CA, Meyn LA, Creinin MD, Barnhart KT, Hillier SL. Effects of long-term use of nonoxynol-9 on vaginal flora. *Obstet Gynecol*. 2006;107:136-43
29. Madden T, Grentzer JM, Secura GM, Allsworth JE, Peipert JF. Risk of bacterial vaginosis in users of the Intrauterine device: a longitudinal study. *Sex Transm Dis* 2012;39:217–22
30. Pabich WL, Fihn SD, Stamm WE, Scholes D, Boyko EJ, Gupta K. Prevalence and determinants of vaginal flora alterations in postmenopausal women. *J Infect Dis* 2003;188:1054-8.
31. Dareng EO, Ma B, Famooto AO, Akarolo-Anthony SN, Offiong RA, Olaniyan O, Dakum PS, *et al*. Prevalent high-risk HPV infection and vaginal microbiota in Nigerian women. *Epidemiol Infect* 2016;144:123-37
32. Clarke MA, Rodriguez AC, Gage JC, Herrero R, Hildesheim A, Wacholder S, *et al*. A large, population-based study of age-related associations between vaginal pH and human papillomavirus infection. *BMC Infect Dis* 2012;12:33.
33. Ma L, Lv Z, Su J, Wang J, Yan D, Wei J, Pei S. Consistent condom use increases the colonization of *Lactobacillus crispatus* in the vagina. *PLoS One* 2013;8:e70716.
34. Brotman RM, Shardell MD, Gajer P, Fadrosh D, Chang K, Silver MI, *et al* Association between the vaginal microbiota, menopause status, and signs of vulvovaginal atrophy. *Menopause* 2014;21:450-8.
35. Chernes TL, Hillier SL, Meyn LA, Busch JL, Krohn MA. A delicate balance: risk factors for acquisition of bacterial vaginosis include sexual activity, absence of hydrogen peroxide-producing lactobacilli, black race, and positive herpes simplex virus type 2 serology. *Sex Transm Dis* 2008;35:78-3.
36. Pendharkar S, Magopane T, Larsson PG, de Bruyn G, Gray GE, Hammarström L *et al*. Identification and characterisation of vaginal lactobacilli from South African women. *BMC Infectious diseases* 2013;13:43
37. El Aila NA, Tency I, Claeys G, Verstraeten H, Saerens B, Santiago GL, *et al*. Identification and genotyping of bacteria from paired vaginal and rectal samples from pregnant women indicates similarity between vaginal and rectal microflora. *BMC Infect Dis* 2009;14:67.
38. Anderson AC, Sanunu M, Schneider C, Clad A, Karygianni L, Hellwig E, *et al*, Rapid species-level identification of vaginal and oral lactobacilli using MALDI-TOF MS analysis and 16S rDNA sequencing. *BMC Microbiol* 2014;14:312.