UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

ANÁLISIS DEL MICROBIOMA Y SU RELACIÓN CON CITOCINAS EN EL FLUIDO VAGINAL DE PACIENTES CON VAGINOSIS BACTERIANA

PRESENTA

Q.B.P. GUSTAVO IZRAHÍ AMADOR PATIÑO

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

Junio, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO

TESIS

ANÁLISIS DEL MICROBIOMA Y SU RELACIÓN CON CITOCINAS EN EL FLUIDO VAGINAL DE PACIENTES CON VAGINOSIS BACTERIANA

PRESENTA

Q.B.P. GUSTAVO IZRAHÍ AMADOR PATIÑO

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

Junio, 2017

COMITÉ DE TESIS

DRA. LYDIA GUADALUPE RIVERA MORALES
DIRECTORA

DRA. ITZA E. LUNA CRUZ
SECRETARIO

DRA. CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA
VOCAL 1

DRA. ROCÍO ORTIZ LÓPEZ

VOCAL 2

DR. MOISÉS ARMIDES FRANCO MOLINA
VOCAL 3

DR. PABLO ZAPATA BENAVIDES

SUPLENTE

Junio 2017

FINANCIAMIENTO

El presente proyecto fue cubierto primordialmente por parte del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, a través de la Red Temática Inmunopatogénesis e Inmunoterapia en Cáncer y Enfermedades Infecciosas "INMUNOCANEI" de CONACYT (No. 280135).

Así también recibió importante apoyo material y en recursos humanos gracias a la colaboración con la Unidad de Genómica del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS).

AREA DE TRABAJO

El presente trabajo de investigación fue realizado en tres áreas de acuerdo a las etapas de trabajo.

La etapa uno, que involucró la toma de muestras, fue realizada en las Clínicas Universitarias del Centro Universitario de Salud de la UANL, bajo la dirección general de la Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales y por parte del Centro Universitario de Salud bajo la asesoría de la Dra. Rebeca Thelma Martínez Villarreal y el Dr. José Guadalupe Sánchez.

La etapa dos, concerniente a los exámenes de microscopía y ensayos de citometría de flujo, fue realizado en la Unidad de Infectología Molecular del Laboratorio de Inmunología y Virología, del departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, bajo la dirección de la Dra. Lydia Rivera Morales y la Dra. Cristina Rodríguez Padilla y con el apoyo del el Dr. Moisés A. Franco Molina y la Dra. Erika Coronado.

Finalmente la tercera etapa, correspondiente a los ensayos moleculares, fue realizada en la Unidad de Genómica del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), bajo la tutela de la Dra. Rocío Ortiz López y con el apoyo del M.C. Luis Ernesto Osuna Rosales y el L.B.G. José Ramón Barcenas Walls.

DEDICATORIA

A ti mi Jesús, mi salvador, mi abogado, mi amigo y mi fortaleza.

A mis padres y mi hermana, por su amor y apoyo incondicional.

A mi esposa, mi compañera vitalicia.

Y a ti, pequeño retoño, a quien espero con ansias;
mi saeta y herencia que Dios me ha dado.

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, me atrevo a decir que soy dichoso. Dios me ha rodeado de favores con toda clase de conocidos, compañeros, asesores, familia y amigos. ¡Gracias Jesús! porque "*por la fe en ti tengo entrada a toda esta gracia* (dicha y privilegio), *en el cual estoy firme*" (Romanos 5:2).

Agradezco en gran manera a mi familia. Mis padres, mis mejores amigos y consejeros. ¡Gracias por tanto aguante!. Gracias Zaena por tus porras, cuando sea grande quiero ser como tú. Gracias mi Amor, por tu apoyo y por tantas ilusiones; las cuales espero alcanzar un día junto contigo.

Gracias a mis amigos y segunda casa: la familia Valle Garza. ¡Gracias Inmar y Maribel! Dios no solo me dio la dicha de que sean mis pastores, sino que los tuve como segundos padres y tutores en toda esta etapa. Me permitieron colarme como uno de sus hijos, lo cual nunca olvidaré. Esto también es para ustedes y mis hermanitos; Keila, Asael, Carissa y Aldahir, les amo mucho.

Agradezco también a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, por abrirme sus puertas en aceptación al posgrado; y a todo su equipo de trabajo. Gracias también, Erika Coronado por tu apoyo y tiempo, ¡Dios te bendiga!.

Así también agradezco a la Dra. Rocío Ortiz López, por dar la iniciativa a este proyecto y su invitación. ¡Gracias Ernesto y José Ramón! Me llevo una grata experiencia trabajando con ustedes. Gracias al Dr. José Tirán Saucedo, Director del Instituto Mexicano de Infectología, Ginecología y Obstetricia (IMIGO), por su asesoría clínica externa.

Mi agradecimiento también a la Dra. Raquel Alicia Benavides Torres, Presidente del Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Enfermería; quien nos apoyó a atravesar el primer reto de este proyecto. Y muchas gracias a la Dra. Rebecca Thelma Martinez Villarreal y al Dr. José "Lupito" Sánchez por abrirnos las puertas y poner a nuestra disposición las clínicas del Centro Universitario de Salud, UANL y su equipo de trabajo.

Agradezco enormemente a la Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales, Jefa de la Unidad de Infectología Molecular; de quien Dios me ha dado la dicha de ser una carga por más de 9 años. Mis mayores éxitos los he logrado junto con usted; desde recibir mí primer premio académico, hasta presentarme a la madre de mis hijos. No tengo duda de que Dios me la ha puesto en el camino con grandes propósitos.

Gracias Dr. Gerardo Palacios Saucedo, su amistad y asesoría ha sido una bendición desde la licenciatura. ¡Dios lo bendiga siempre!

Amigo José Manuel Vázquez, muchas gracias por todo. Estoy un paso más cerca de ser un "S*uper Sayayin"*, como tú.

ÍNDICE

FINANCIAMIENTO…… iii

ÁREA DE TRABAJO……..... iv

DEDICATORIA…….. v

AGRADECIMIENTOS……..... vi

LISTA DE TABLAS…….…….. x

LISTA DE FIGURAS, DIAGRAMAS Y GRÁFICOS……... xi

NOMENCLATURAS……..…… xii

RESUMEN…….……. 1

ABSTRACT…….…… 2

1. INTRODUCCIÓN…….……..…… 3

2. MARCO TEÓRICO……..…….. 5

2.1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA……..…… 5

2.2. JUSTIFICACIÓN……... 6

2.3. ANTECEDENTES…….. 7

2.3.1. EL MICROBIOMA VAGINAL…….…… 7

2.3.2. LA VAGINOSIS BACTERIANA…….. 9

2.3.3. EPIDEMIOLOGÍA DE LA VAGINOSIS BACTERIANA……... 11

2.3.4. DIAGNÓSTICO DE LA VAGINOSIS BACTERIANA…… 13

2.3.4.1. CRITERIOS DE AMSEL…… 13

2.3.4.2. PUNTUACIÓN DE NUGENT…… 15

2.3.5. VAGINOSIS BACTERIANA Y RESPUESTA INMUNE……..... 16

2.3.6. TÉCNICAS DE ESTUDIO.…… 17

3. HIPÓTESIS…..……. 20

4. OBJETIVOS..... 20

4.1. OBJETIVO GENERAL……. 20

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS…… 20

5. MATERIAL Y MÉTODOS…….…… 21

5.1. DISEÑO DEL ESTUDIO…….. 21

5.2. LUGAR DEL ESTUDIO..…… 21

5.3. MUESTRA…… 21

5.3.1. GRUPOS DE ESTUDIO…… 21

5.3.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN…… 22

5.3.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE GRUPO 1 Y 2…… 22

5.3.2.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE GRUPO 3…… 22

5.3.2.3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN……... 23

5.3.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA……. 23

5.4. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE LA MUESTRA……. 23

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL…….. 24

6.1. RECLUTAMIENTO DE PARTICIPANTES…….. 25

6.2. RECOLECCIÓN DE DATOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS Y CONFORMACIÓN DE GRUPOS DE ESTUDIO…….. 25

6.3. DIAGNÓSTICO DE VAGINOSIS BACTERIANA…..…… 25

6.4. TOMA DE MUESTRA…… 26

7. ANÁLISIS DEL MICROBIOMA VAGINAL POR SECUENCIACIÓN DEL GEN 16S ARNr ……... 28

7.1. ESTRATEGIA GENERAL PARA LA PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS Y SECUENCIACIÓN MASIVA……. 26

7.2. EXTRACCIÓN DEL ADN……..……. 29

7.3. PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS GENÓMICAS……. 29

7.3.1. AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES V3-V4 DEL GEN 16S ARNr..…... 29

7.3.2. PURIFICACIÓN DE AMPLICONES…… 30

7.3.3. PCR DE ÍNDICES…….. 31

7.3.4. NORMALIZACIÓN DE LIBRERÍAS……... 32

7.3.5. CUANTIFICACIÓN DE LAS LIBRERÍAS…….. 32

7.3.6. PREPARACIÓN DE POOL DE LIBRERÍAS……... 32

7.4. SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN……. 33

7.4.1. CARGA DE CARTUCHO Y "FLOW CELL" PARA SECUENCIACIÓN…..... 33

7.4.2. CORRIDA DE SECUENCIACIÓN……... 33

7.5. ANÁLISIS DE DATOS DE SECUENCIACIÓN……... 33

8. EVALUACIÓN DE CITOCINAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO…… 34

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO…… 35

10. RESULTADOS…… 36

10.1. INFORMACIÓN CLÍNICO-DEMOGRÁFICAS…… 36

10.2. DIAGNÓSTICOS CON VAGINOSIS BACTERIANA RESULTANTES…..... 42

10.3. ANÁLISIS DE CITOCINAS…… 42

10.4. ANÁLISIS DEL MICROBIOMA VAGINAL…… 44

11. DISCUSIÓN…… 48

12. CONCLUSIONES……... 52

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS……..……..... 52

14. ANEXOS…… 59

14.1. ACTA DE COMITÉ DE ÉTICA DE PROYECTO APROBADO…….. 59

14.2. FORMATO DE RECOLECCIÓN DE DATOS……... 60

14.3. HOJA DE DATOS DE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA……. 64

14.4. HOJA DE OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA…… 65

LISTA DE TABLAS

Tabla **Página**

1. Frecuencia de Vaginosis Bacteriana en estudios realizados en México……. **12**

2. Criterios para Puntuación de Nugent……..……. **15**

3. Condiciones de colecta, transporte y almacenamiento de muestra……..……..... **27**

4. Condiciones de PCR para región V3-V4……..……..... **29**

5. Condiciones de PCR para la adición de Índices……..……..... **32**

6. Conteo de participantes incluidas por Clínica visitada……. **36**

7. Resumen de datos clínico-epidemiológicos, Medias y Frecuencias…..... **37**

8. Datos epidemiológicos y clínicos de 61 pacientes incluidas en el estudio……..... **38**

LISTA DE FIGURAS, DIAGRAMAS Y GRÁFICOS

FIGURA **Página**

1. Células Guía…….…...……. **14**

2. Diagrama de la estrategia experimental general..……. **24**

3. Diagrama de estrategia experimental para ensayo de secuenciación masiva.……..……....**.** **28**

4. Diagrama simplificado de flujo de trabajo para la creación de librerías genómicas……..……...**.** **29**

5. Resumen de casos diagnosticados……...……..……...**.** **42**

6. Niveles de Citocinas en lavado vaginal de Grupo 1, Grupo 2 y Grupo 3**.** **43**

7. Géneros identificados y su frecuencia de aparición…….. **44**

8. Abundancia relativa de bacterias en los microbiomas de toda la población……..**.** **45**

9. Representación de Microbiomas tipo CST1.....…….....**.** **46**

10. Representación de Microbiomas tipo CST 2, dominados por *Lactobacillus y Gardnerella*…….....**.** **46**

11. Representación de Microbiomas tipo CST 3, dominados parcialmente por *Lactobacillus* y otros géneros con abundancias relativas cercanas....**.** **47**

12. Representación de Microbiomas tipo CST 4, dominancia por multiples géneros…….....**.** **47**

NOMENCLATURA

Abreviatura	Significado
MV	Microbioma Vaginal
VB	Vaginosis Bacteriana
CF	Citometría de Flujo
ADN	Ácido Desoxirribunucléico
ARN	Ácido Ribonucléico
ng	Nanogramos
µl	Microlitros
et al.	Y otros
spp	Especie
CIDICS	Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
CONBIOETICA	Comisión Nacional de Bioética
CSU	Centro de Salud Universitario
CST	Tipo de Comunidad Estacional (*Community State Type)*
FCB	Faculta de Ciencias Biológicas
FISH	Hibridación In Situ Fluorescente
hrs	Horas
IL	Interleucinas
INMUNOCANEI	Inmunopatogénesis e Inmunoterapia en Cáncer y Enfermedades Infecciosas
ITS	Infección de Transmisión Sexual
KOH	Hidróxido de potasio
ND	No Determinado
No.	Número
SLPI	Inhibidor de proteasas de leucocitos secretorios
U.H.	Unidad Habitacional
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
Dra.	Doctora
Dr.	Doctor
pH	Potencial Hidrógeno
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction)*
OTU	Unidad de Operación Taxonómica (*Operational Taxonomic Units)*

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Existe cada vez mayor evidencia acerca de la interacción y el impacto de las comunidades microbianas, mejor conocidas como "Microbiomas", sobre su entorno. Particularmente, el Microbioma Vaginal (MV), supone ser distintivo y único para cada mujer, teniendo la capacidad de fluctuar a lo largo de su vida y cumpliendo un papel determinante en su salud reproductiva. Una gran variedad de especies, mayormente lactobacilos, cohabitan sobre el epitelio vaginal, inmersos en un microambiente dinámico y expuesto a constantes cambios hormonales. El balance de las especies del microbioma, apunta a ser un parámetro de estado salud, mientras que los disturbios en la composición de sus comunidades bacterianas revelan un posible origen de múltiples enfermedades. Aunque la Vaginosis Bacteriana (VB) se caracteriza por una alteración del microbioma normal (reemplazo de los lactobacilos habitualmente dominantes) son aún desconocidos los factores que contribuyen a su aparición, confección y recurrencia. Además, poco es sabido sobre la respuesta inflamatoria presente en la VB, que con apariencia atenuada se distingue ampliamente de otros casos de disbiosis (ej. Candidiasis, Vaginitis Aeróbica, Trichomoniasis, etc.), que promueven una inflamación local de mayor intensidad. Finalmente, son escasos los estudios sobre el MV en México, realizados desde una perspectiva genómica, a partir de la secuenciación de la huella genética del *16S ARN ribosomal* (16SARNr) mediante Secuenciación de Nueva Generación (SNG). Por tanto, un anexo más a las bases de datos de secuencias bacterianas vaginales, identificadas a partir de mujeres hispanas, es muy valioso. **OBJETIVOS**: 1) Caracterizar el MV de mujeres con VB y mujeres sanas asintomáticas, mediante la secuenciación del gen *16S ARN ribosomal*, comparar los perfiles de comunidades bacterianas de ambas cohortes y correlacionar estadísticamente dichos perfiles con la información clínica. 2) Evaluar los niveles de citocinas (Panel de estudio: IL-2, IL-4, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, TNF e INF-Y) presentes en el fluido vaginal de mujeres con VB y mujeres sanas asintomáticas; establecer las diferencias significativas existentes entre ambos grupos de estudio para cada citocina. **MÉTODOS**: Se realizó un estudio transversal, prospectivo, en pacientes participantes de clínicas del Centro Universitario de Salud (CSU), de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Se tomaron muestras de fluído a partir de fondo de saco vaginal, durante una consulta. Se definieron grupos de estudio en base al diagnóstico médico, valores de pH y la evaluación microscópica en laboratorio. Así también, se realizaron ensayos de Citometría de Flujo (CF) para evaluar los niveles de citocinas y de y SNG para caracterizar microbiomas. Información clínica-demográfica, como la correspondiente a hábitos de higiene y actividad sexual fue colectada para todos los participantes. **RESULTADOS:** Un total de 61 participantes fueron incluidos y distribuidos en 3 grupos de estudio: GRUPO 1 "VB Positivo" (25%); GRUPO 2 "VB Probable" (21%); y GRUPO 3 "Sanas-Asintomáticas" (Controles) (54%). La CF logró detectar 7 de las 10 citocinas evaluadas. Existe diferencia significativa entre el GRUPO 1 y GRUPO 3 con respecto a los niveles de la Citocina IL-8. Los resultados de la SNG detectaron la presencia de 53 géneros bacterianos, mostrando a *Lactobacillus, Gadrnerella y Prevotella* como los más frecuentemente hallados. El análisis reveló al menos 4 grupos de comunidades microbianas, de acuerdo a los patrones de dominancia y abundancia relativa de las bacterias para cada comunidad.

ABSTRACT

BACKGROUND: There is increasing evidence on the interaction and impact of microbial communities, better known as "Microbiomes", upon their environment. In particular, Vaginal Microbiome (VM) is distinctive and unique for each woman, having the ability to fluctuate throughout her life and fulfilling a determinant role in her reproductive health. A wide variety of species, mostly *lactobacilli*, cohabit with other species over the vaginal epithelium, immersed in a dynamic microenvironment and exposed to constant hormonal changes. Though, balance of bacterial species might be predictive for a healthy status, a disturbance in the community composition could imply the origin of multiple diseases. Bacterial Vaginosis (BV) is characterized by a disruption of the normal microbiome (mainly due to a replacement of the usually dominant *lactobacilli*), nonetheless the elements that contribute to its appearance, formation and recurrence still remain unknown. In addition, little is known about the inflammatory response during BV, which mild appearance widely differs from other types of dysbiosis (eg. Candidiasis, Aerobic Vaginitis, Trichomoniasis, etc) that promote a more intense local inflammation. Finally, few studies in Mexico on the vaginal microbiota are carried out, from a genomic perspective, by sequencing the genetic 16S rRNA fingerprint by Next Generation Sequencing (NGS). Therefore, an additional annex to vaginal bacteria sequence databases from Hispanic women would be meaningful. **OBJECTIVES**: 1) To characterize the VM of women with BV and healthy-asymptomatic women, by the 16S ribosomal RNA gene sequencing, compare the bacterial community profiles of both cohorts and to statistically correlate these profiles with the clinical-descriptive data. 2) Measure cytokine levels (IL-2, IL-4, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, TNF and INF-γ) present in the vaginal fluid of women with BV and healthy-asymptomatic women; and establish differences between the two study groups for each cytokine. **METHODS**: A prospective, cross-sectional study was performed to patients attending at five clinical centers of the University Health Center of the UANL. Vaginal fluid specimens from the posterior fornix were sampled during gynecological consultation. In addition to medical diagnosis, Nugent scores and vaginal pH values were determined to define cohorts. Additionally, a Flow Cytometry (FC) assay and a NGS run were performed to evaluate cytokine levels and microbiome profiles. Clinical-demographic data was collected for all participants through a clinical survey. **RESULTS**: A total of 61 participants were included and catalogued in three groups of patients: Group 1 “BV+” (25%); Group 2 “BV-like” (21%); Group 3 “Healthy-Asymptomatic” (Controls) (54%). FC analysis detected 7 of 10 cytokines evaluated. There was a significant difference between GROUP 1 and GROUP 3 respective to cytokine IL-8 levels. DNA extraction was completed for 46 samples. NGS results detected the presence of 53 bacterial genera, finding *Lactobacillus*, *Gadrnerella* and *Prevotella* as the most frequent habitants. The analysis revealed four major groups of microbial communities based on bacterial dominance patterns and their relative abundances.

1. INTRODUCCIÓN

El Microbioma Humano consiste de trillones de microorganismos que colonizan el cuerpo humano. A pesar de constituir una parte tan importante de nuestro organismo, el Microbioma Humano y la relación con su entorno es aún una de las grandes incógnitas de nuestra biología. El estudio del mismo, hoy en día, está produciendo una gran cantidad de bases de datos de secuencias parciales del gen 16S rDNA de bacterias colonizadores procariotas de varios sitios del cuerpo humano (Fettweis *et al*., 2012), con el objetivo de comprender los papeles que estos simbiontes juegan, y sus impactos en la salud humana. En esta búsqueda se deslindan terminologías, tales como, "microbiota" (los taxones microbianos asociados con los humanos) y "microbioma" (el catálogo de estos microbios y sus genes). Cada vez hay más evidencia de que las personas comparten un "microbioma central", en lugar de una "microbiota central" (Ursell *et al*., 2012).

Similar a la mayor parte de las cavidades y superficies del cuerpo humano, la salud y funcionamiento de la vagina está vinculada a sus habitantes microbianos. El Microbioma Vaginal (MV) en particular, parece ser tanto una fuente de salud, como el origen de diferentes enfermedades. Podría inferirse que la posibilidad de manipular el microbioma abriría las puertas de todo un nuevo mundo de aproximaciones terapéuticas. En vista de esto, numerosos esfuerzos se han dedicado primeramente a conocer la identidad y composición de las comunidades microbianas. Sin embargo, hasta ahora poco ha sido estudiado, en profundidad, acerca de la influencia de la fisiología de nuestro cuerpo sobre el desarrollo de las comunidades microbianas residentes o viceversa.

El epitelio vaginal se distingue por una característica colonización de lactobacilos en colaboración de otras bacterias típicas del tejido bajo un sistema complejo de interacción con el hospedero, en equilibrio. Por ello es importante conocer cuáles son los factores endógenos y exógenos pueden romper el balance de este microecosistema (Faro S., 1996).

Los factores ambientales, como el consumo de tabaco (Cherpes, 2008; Ryckman, 2009), las duchas vaginales (Cherpes, 2008; Ness, 2002; Hawes, 1996), y algunas prácticas sexuales (Cherpes *et al*., 2008; Beigi, 2005; Marazzo, 2002), se han asociado con niveles más bajos de lactobacilos vaginales. No se sabe cómo las variaciones genéticas e inmunológicas

afectan la constitución del microbioma vaginal y su mantenimiento, pero se ha planteado la hipótesis de que los polimorfismos genéticos que alteran la señalización normal del sistema inmune innato pueden estar asociados con la flora menos saludable (Genc and Oderdonk, 2011).

La Vaginosis Bacteriana (VB), es el desequilibrio ecológico vaginal más común. La etiología de la VB aún no se ha determinado; sin embargo, es probable que los complejos factores polimicrobianos estén involucrados. Organismos que han sido asociados con la VB incluyen (pero no se limitan) a: *G. vaginalis* (Harwich *et al*., 2010), *A. Vaginas* (Brandshaw *et al*., 2006), *Bacterias Asociadas a la Vaginosis Bacteriana* (BAVB1, BAVB2, y BAVB3) en el orden *Clostridiales* (Fredricks *et al*., 2005), *Megasphaera* spp.(Ling *et al*., 2010), y *Sneathia* spp. (Fredricks *et al*., 2009). Dado que la VB no es causada por un solo componente y que muchos BAVB no han sido cultivados, las aplicaciones de los métodos moleculares son muy adecuados para el estudio de la enfermedad (Fettweis *et al*., 2012). Hoy en día, la llegada de la Secuenciación de Nueva Generación (NGS, Next Generation Sequencing) ó Secuenciación Masiva, ha permitido la caracterización de la vida microbiana que habita nichos ecológicos específicos a una escala sin precedentes (Lamont *et al*., 2011). Esto es posible mediante la amplificación y secuenciación paralela de fragmentos de genes que son altamente conservadas entre los microorganismos. El gen diana más común, hasta la fecha, es gen de la subunidad de ARN ribosomal 16S, presente en todas las bacterias conocidas y arqueas. Regiones altamente conservadas del gen de ARNr 16S, facilitan la amplificación por PCR, flanquean las regiones altamente variables (V1-V9) que permiten la identificación filogenética y taxonómica. Enfoques bioinformático-moleculares permiten una resolución de especies y hasta nivel de cepa de la bacteria que tienen implicaciones importantes para la salud vaginal.

Los conocimientos técnicos multidisciplinarios en áreas como la epidemiología, bioinformática, ginecología, inmunología, infectología y la biología molecular son necesarios para tener un máximo aprovechamiento de la información que ofrecen los datos extraídos del análisis metagenómico del microbioma vaginal. Por lo que la evaluación de Citocinas amplía el cuadro de investigación, reuniendo información relevante y moderna

acerca de los factores inmunitarios que inciden en la cavidad vaginal y afectan su equilibro ecológico microbiano ante el padecimiento de la Vaginosis Bacteriana.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.

La microbiota vaginal juega un importante papel protector en el mantenimiento de la salud de las mujeres. La interrupción de la relación mutualista que existe entre las comunidades bacterianas en la vagina y sus anfitriones puede conducir a la Vaginosis Bacteriana (VB), una condición que afecta a millones de mujeres al año (Fettweis *et al*., 2012) en la cual las bacterias productoras de ácido láctico son suplantadas por una gran variedad de bacterias anaerobias estrictas. Se ha reportado que afecta entre el 10-20% de las mujeres blancas, no hispanas; y el 30-50% de las mujeres afroamericanas (Sobel 2005).

Se ha demostrado que VB es un factor de riesgo para futuras madres, incluyendo problemáticas como parto prematuro y bajo peso al nacer, la adquisición de infecciones de transmisión sexual y el VIH, al igual que el desarrollo de la enfermedad inflamatoria pélvica. Además, su recurrencia y tratamiento constante puede ser una pieza clave en la formación de resistencia a antibióticos en géneros bacterianos de importancia clínica ante el riesgo de infección materno-fetal.

El flujo vaginal maloliente puede ser el único síntoma de VB, sin embargo, muchas mujeres afectadas son asintomáticas. Sumado a esto, el cultivo de bacterias a partir de fluido vaginal no ha demostrado ser completamente útil para el diagnóstico de la vaginosis bacteriana. Más bien, los criterios clínicos (Criterio de Amsel) o tinción de Gram (Puntuación de Nugent) del líquido vaginal se han utilizado para el diagnóstico. Sin embargo la ambigüedad de sus resultados ante casos asintomáticos no perfilan un diagnóstico fiel y preciso, sobre el cuál plantear un pronóstico de la enfermedad y definir una profilaxis puntualizada (Fettweis *et al*., 2012). Además, aún no se ha determinado si existe un estado de transición entre la salud y la VB.

Poco es sabido sobre la respuesta inflamatoria presente en la Vaginosis Bacteriana, que con apariencia atenuada, se distingue con amplia divergencia de otros casos de disbiosis, siendo el ejemplo más cercano la Vaginitis Aeróbica, que promueven una inflamación aguda, local

de mayor intensidad. Por lo que mediante este estudio, podemos valorar el comportamiento inmunológico de los pacientes y su relación con la Taxa Microbiana presente; permitiéndonos vislumbrar un horizonte más profundo de lo que ocurre en este nicho ecológico, las interacciones infeccioso-inmunológicas y su influencia sobre los signos y síntomas de valor diagnóstico, como también su relación con los factores ambientales a los que podría estar vinculado.

En base a lo anterior surgen las siguientes preguntas de investigación ¿Los niveles presentes Citocinas están asociados a la presencia de algún consorcio de bacterias en particular? ¿Existe relación entre estas variables y los factores clínico-epidemiológicos y hábitos sexuales de las pacientes Sanas y pacientes con Vaginosis Bacteriana?

2.2. JUSTIFICACIÓN

La Vaginosis Bacteriana es un incómodo padecimiento, muy común, asociado al riesgo de propensión a adquirir importantes problemas de salud. Su etiología polimicrobiana aún no ha sido determinada por métodos convencionales no moleculares.

El estudio del Microbioma Vaginal no solo contribuye al conocimiento de los factores que inciden en este padecimiento, sino que también aporta un primer indicio metagenómico al estudio de este nicho ecológico en México; como también se suma al escaso repertorio de este tipo de investigaciones en mujeres Hispanas. Los datos de las secuencias 16S ARNr obtenidas servirán para seguir construyendo la base de datos de la flora microbiana vaginal; la cual está pobremente representada en comparación con la de otros sitios como la del tracto gastro-intestinal.

El análisis de Citocinas amplía el cuadro de investigación, reuniendo información relevante y moderna acerca de los factores inmunitarios que inciden en la cavidad vaginal y afectan su equilibro ecológico microbiano. Además revela información sobre la respuesta inmune ocurrida ante un desequilibrio entre poblaciones comensales que no evocan un poder de respuesta al grado de una vaginitis.

Finalmente, el análisis de del Microbioma Vaginal y los padecimientos relacionados a este como la Vaginosis Bacteriana necesitan ser abordados desde una perspectiva integral que

incluya el análisis de factores del hospedero (inmunológicos), aspectos clínicos y métodos de diagnóstico actualizados, que permitan la obtención de resultados cada vez más precisos y nos ayuden a transformar nuestra comprensión del microbioma y su funcionamiento.

2.3. ANTECEDENTES

2.3.1. EL MICROBIOMA VAGINAL

El Proyecto del microbioma humano, que fue lanzado en 2008, es un esfuerzo de cinco años financiado con $ 157 millones a través de Plan de trabajo del Fondo Común de NIH para la Investigación Médica. El proyecto en su conjunto se ha dedicado a determinar si existe un microbioma central compartido entre las personas, para entender cómo se relacionan los cambios en la salud con el microbioma, el desarrollo de herramientas para apoyar la investigación, y para abordar las cuestiones éticas, legales y sociales.

El Proyecto del Microbioma Vaginal Humano ha sido impulsado por Virginia Commonwealth University (VCU) (Fettweis *et al*., 2012), siendo ellos los pioneros en la investigación de esta rama; y ha sido financiado como parte de este esfuerzo en conjunto del Proyecto del Microbioma Humano. Aspectos importantes de este estudio incluyen la validación de la Taxa presente en la Vagina, así como papel en relación con la salud vaginal (Fettweis *et al*., 2012).

Existe una estrecha relación entre la regulación de la proliferación microbiana en el tracto genital de la mujer y el ciclo menstrual. Los informes de infecciones del tracto genital se producen de una manera dependiente del ciclo (Morison *et al*., 2005), que se atribuye a los cambios en los niveles de secreción de las hormonas esteroides: estradiol y progesterona, y la capacidad de algunas especies microbianas para utilizar estas hormonas como factores de crecimiento (Korman and Loesche, 1982)

La concentración de *Lactobacillus spp* es más alta cuando los niveles de estradiol son altos, y la concentración de agentes patógenos oportunistas según se informa incrementa durante la menstruación. Los cambios posteriores en la composición del epitelio del tracto genital, la secreción de mucosa y la respuesta inmune localizada, siguen el patrón de los cambios hormonales (Brabin, 2001, Ceruti *et al*., 1994; McGregor *et al*., 1990; Sonnex, 1998)

David Fredricks *et.al.,* han utilizado recientemente técnicas moleculares para identificar varios organismos no cultivados que están asociados con la Vaginosis Bacteriana (Fredricks *et al*., 2005; Oakley *et al*., 2008). Se identificaron Bacterias Asociadas a la Vaginosis Bacteriana en el orden de los Clostridiales (por ejemplo BAVB1, BAVB2, BAVB3) utilizando ensayos de amplio espectro de 16S rDNA, y se validaron utilizando una combinación de hibridación in situ fluorescente (FISH) y específicos de la bacteria por PCR (32). BVAB3 es la única BVAB que ya ha sido cultivada y secuenciada (Fettweis *et al*., 2012)

Varios grupos han informado de que el pH vaginal promedio para las mujeres afroamericanas e hispanas es mayor que la de mujeres caucásicas (Stevens *et al*., 1994; Ravel *et al*., 2011; Fiscella and Klebanoff, 2004), y que, de hecho, la mayoría de las mujeres en estos grupos raciales y étnicos tienen un alto pH vaginal (es decir, pH> 4,5) los valores, que se encuentra fuera del rango asociado tradicionalmente con la salud. Un simple clustering de estos microbiomas sugiere la existencia de múltiples "Vagino-tipos", muchos de los que están dominados por un solo taxón bacteriano (Fettweis *et al*., 2012).

Adicionalmente, cinco agrupaciones consistentes, son las mencionadas por Ravel *et al.* como Comunidades Circusntanciales o Tipos Estacionales de Comunidad (CST, Community State Types), en el que la microbiota vaginal se pueden clasificar (Sobel, 2005). Estos cinco CTS's estuvieronn caracterizados de la siguiente manera: dominados por *Lactobacillus crispatus* (CST I), *Lactobacillus gasseri* (CST II), *Lactobacillus* i*ners* (CST III), o *Lactobacillus jensenii* (CST V), mientras que el quinto (CST IV) tiene una menor proporción de *Lactobacillus spp.* y una mayor proporción de organismos anaerobios incluyendo BVAB (Atashili *et al*., 2008), como *Prevotella, Megasphaera, Sneathia* y *Atopobium*. Este último CST se dividió recientemente en dos estados de Comunidad: CST IV-A y IV-B (Ravel *et al*., 2011). CST IV-A se caracteriza por varias especies de bacterias anaeróbicas que pertenecen a los géneros *Anaerococcus, Peptoniphilus, Prevotella y Streptococcus,* mientras que CST IV-B está con proporciones más altas de los géneros *Atopobium* y *Megasphaera* entre otros (Brotman *et al*., 2013).

2.3.2. LA VAGINOSIS BACTERIANA

También conocida como "Bacteriosis vaginal", "Secreción vaginal asociada a Gardnerella" y "Vaginosis anaeróbica"; la Vaginosis Bacteriana (VB) es una de las infecciones del tracto genital inferior más común, esta es responsable de aproximadamente la tercera parte de todos los casos de vulvovaginitis en mujeres en edad reproductiva (Canto de Cetina et al., 2001). Weström et al., (1984) recomendaron el nombre actual del síndrome, durante el primer Simposio Internacional sobre Vaginitis, en Estocolmo; después de revisar todos los datos clínicos y microbiológicos recolectados en las décadas anteriores. Los datos probaron que la enfermedad se caracteriza por una cantidad anormal de bacterias tanto anaerobias como aerobias, con predominio de anaerobias; por lo tanto, se propuso el adjetivo de bacteriana. Puesto que la enfermedad no produce un flujo de células sanguíneas blancas (una respuesta inflamatoria), el término vaginitis fue considerado incorrecto y se propuso vaginosis. Por consiguiente, la enfermedad se nombró correctamente como vaginosis bacteriana.

Microbiológicamente se caracteriza por un cambio de la flora vaginal, de una población predominante de lactobacilos; bacilos Gram positivos, H2O2 positivos (Chaijareenont et al., 2004) a su sustitución gradual o total con anaerobios tales como; G. vaginalis, Prevotella, A. vaginae, bacteroides, especies de Mobiluncus entre otras bacterias; incluyendo las especies de Mycoplasma y Ureaplasma (El Sayed et al., 2010). Las bacterias anaerobias producen aminopeptidasas que degradan proteínas y descarboxilasas que convierten los aminoácidos en diaminas. Estas últimas contribuyen a la aparición de los signos y síntomas asociados con el síndrome (González P. et al., 2004).

Este síndrome está caracterizado por un pH vaginal ≥4.5, una secreción vaginal homogénea, grisácea lechosa y un olor característico con olor a "pescado" (prueba de Whiff). El diagnóstico clínico se hace cuando se reúnen 3 de los 4 criterios siguientes:

- Secreción vaginal espesa, lechosa.
- Liberación de una amina que produce olor a "pescado" al añadir hidróxido de potasio al 10%, al flujo vaginal.
- pH de más ≥4.5.

- Presencia de células guía en la secreción vaginal (éstas son células epiteliales con gran cantidad de bacterias adheridas a su superficie, lo cual impide observar con claridad sus bordes). La realización del diagnóstico es difícil ya que estas se pueden enmascarar por la menstruación, relación sexual reciente o la presencia de grandes cantidades de moco cervical.

La VB es una de las causas de infecciones de genitales más comunes en las consultas general o ginecológica, así como en clínicas de perinatología y de transmisión sexual (Holzman et al., 2001; Gustaaf, 2001; Rado, 2001). En el 50% de los casos, es asintomática, de ahí la importancia de conocer su frecuencia e identificar y tratar este padecimiento en forma adecuada para evitar complicaciones futuras, ya que se asocia con una gran cantidad de problemas ginecológicos y obstétricos (Canto de Cetina et al., 2001), tales como el parto prematuro, la enfermedad inflamatoria pélvica y la endometritis posparto y postaborto, así como un aumento en la susceptibilidad a diversos patógenos causantes de infecciones de transmisión sexual (ITS) como *Neisseria gonorrhoeae, Trichomonas vaginalis, Chlamydia trachomatis*, el virus del papiloma humano y el virus de la inmunodeficiencia humana, además de otras infecciones como la candidiasis (Marrazzo., 2011).

Algunos factores que predisponen a la mujer en edad fértil a estas enfermedades son; las duchas vaginales y múltiples compañeros sexuales; si bien algunos estudios muestran una prevalencia de VB en pacientes con el dispositivo intrauterino (Holzman et al., 2001), la relación de estos con la vaginosis bacteriana todavía no es clara, algo similar sucede con los anticonceptivos orales ya que algunos investigadores los mencionan como factores de riesgo (Holzman et al., 2001), mientras que otros consideran que estos presentan un efecto positivo en contra de esta (Livengood., 2009). Aunque hay pocos datos acerca de la frecuencia de la vaginosis bacteriana en países en desarrollo, este síndrome parece ser tan común, como en los países industrializados ya que se ha detectado una prevalencia hasta del 31 % en mujeres asintomáticas que acuden a la consulta por vaginitis (Livengood., 2009; Canto de Cetina et al., 2001).

2.3.3. EPIDEMIOLOGÍA DE LA VAGINOSIS BACTERIANA

La VB es una condición que se encuentra aproximadamente en un 30% de la población estadounidense. En la encuesta realizada por el Instituto Nacional de Salud y Nutrición de los Estados Unidos, el 29% de las mujeres entre los 14 y los 49 años dieron positivo para VB, dando como resultado una prevalencia más grande en mujeres afroamericanas, que en mujeres caucásicas. En dicho estudio la VB se presentó en el 27% de las mujeres, las cuales poseían una mayor experiencia sexual, en comparación con el 18%, de las cuales nunca habían tenido una relación sexual penetrante (Allsworth y Peipert, 2007). En un estudio longitudinal realizado, Schwebke y Desmond (2005) observaron que las mujeres que llegan a tener una nueva pareja sexual, tienen un 70% de probabilidad de adquirir VB, además de esto, observaron que en el 95% el uso del condón presentó una función protectora. En otro estudio realizado por Ness., et al. (2006) observaron que las mujeres las cuales tiene múltiples parejas sexuales, al igual que un historial previo de ITS, tienen un riego mayor de contraer VB. Otros factores los cuales se ha observado que predisponen a las mujeres a contraer VB son: las duchas vaginales, tener relaciones sexuales con otras mujeres, al igual que fumar, ya que este suprime el crecimiento de los lactobacilos productores de peróxido de hidrógeno.

El síntoma característico de la vaginosis bacteriana es un olor parecido al "pescado", el cual es causado por las bacterias anaerobias, las cuales producen aminas (incluyendo la trimetilamina, la putrescina, y la cadaverina), las cuales se volatilizan con el aumento del pH vaginal, por lo cual se presenta un aumento del mal olor cuando la alcalinidad vaginal aumenta, situación común después del sexo (debido a la presencia del semen) y durante la menstruación (debido a la presencia de sangre). El aumento del flujo vaginal es uno de los síntomas más frecuentes de este padecimiento, sin embargo, es muy inespecífico. Estos síntomas son posibles de encontrar en el 73% de los casos sintomáticos y en el 92% de los casos asintomáticos. El 45% de las pacientes con VB se quejan de poseer síntomas irritantes (picazón, ardor, dolor) que pueden haber sido confundidos con otras causas de vaginitis (Livengood et al., 1990).

La falta de fiabilidad de los síntomas como método de diagnóstico fue descubierto por Klebanoff., et al (2004) los cuales observaron que en el 58% de los casos de vaginosis

bacteriana las pacientes se quejaban de dolor y un olor extraño, lo cual también se observó en el 57% de las pacientes sin VB. Diversos estudios han demostrado que el 50% de las pacientes con vaginosis bacterianas son asintomáticas (Amsel, et al., 1983).

El estudio de la VB en mujeres mexicanas se remonta a los años 70; desde entonces pueden encontrarse diversas memorias de presentaciones en congresos nacionales y algunos artículos científicos que documentan la frecuencia de esta entidad clínica. En estos se reporta una frecuencia que va desde el 58.3% hasta el 10.8% (Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencia de VB en estudios realizados en México.

Autor	Año	Porciento (%)
Aquino Santiago C.	1973	49
Osana y Cruz*	1985	58.3
Noriega et al.*	1985	41.4
De la Cruz et al.*	1985	21.4
Fernández et al.*	1986	45.9
Martínez Barreda et al.*	1987	10.8
Cruz y Sánchez*	1987	24
Pavón et al.*	1987	12.4
Ortiz et al.*	1990	37.5
González Pedraza et al.	1997	33.1
Hernández Méndez et al.	2000	5.4
Montes de Oca et al.	2002	38.4
González Pedraza et al.	2003	11.3
González Pedraza et al.	2007	26.7
González Pedraza et al.	2007	20.4
González Pedraza et al.	2007	34.3
Flores-Paz et al.	2008	44
Hernández-García A.	2009	23.8
García-Mundo V.	2011	12.21

*Trabajos presentados en los congresos que organiza la Asociación Mexicana de Microbiología.
Modificado de: Rodríguez Olvera 2013.

2.3.4. DIAGNÓSTICO DE LA VAGINOSIS BACTERIANA

Gardner y Dukes (1955) describieron clínicamente a la vaginosis bacteriana en 1181, encontrando lo siguiente:

- Células vaginales escamosas con un aspecto granular y bordes indistintos.
- Olor desagradable (prueba de Whiff).
- pH elevado (de 5.0 a 5.5).
- Una descarga delgada y gris.

Estos hallazgos ahora son conocidos como los criterios de Amsel, el cual, junto con sus colegas, mencionan que le diagnóstico clínico se hace cuando se reúnen 3 de los 4 criterios siguientes:

- Descarga fina, blanca adherente y homogénea (consistencia similar a la "leche").
- Liberación de una amina que produce olor a "pescado" al añadir hidróxido de potasio al 10% al flujo vaginal (prueba de Whiff).
- pH de más de 4.5.
- Presencia de células guía (clave) en la secreción vaginal en una muestra de hisopado vaginal.

El uso de sólo 2 de los 4 criterios clínicos, una prueba de olor a amina positiva y la presencia de células indicadoras, permite hacer un diagnóstico exacto y rápido de la VB sin afectar la sensibilidad, según Thomason et al., (1991).

2.3.4.1. CRITERIOS DE AMSEL

Descarga homogénea. - Se observan descargas vaginales blancas o blanco grisáceas no inflamatorias en el introito, cuando la paciente se encuentra en posición supina, la cual cubre las paredes de la vagina. Si la descarga es abundante, puede extenderse del vestíbulo vulvar hasta el perineo. La consistencia homogénea puede ser fácilmente comprobada al retirar la descarga de las paredes de la vagina con una torunda.

pH vaginal. - Se mide con una tirilla de pH sujetado con fórceps e introducido en la descarga vaginal, con precaución para evitar las secreciones menstruales y cervicales las

cuales tienden a ser alcalinas. Es importante no emplear lubricantes en el espéculo cuando se realiza el examen, ya que los mismos pueden elevar el pH y provocar resultados erróneos. La descarga también puede ser aplicada en el papel de pH con una torunda. El pH en las pacientes que tienen VB es superior a 4.5 (por lo general es de 5.0 a 6.0). Un pH vaginal inferior a 4.5 excluye el diagnóstico de VB. El pH de las secreciones del endocérvix es superior al de las secreciones vaginales, por consiguiente, las secreciones deben ser muestreadas sólo en la vagina.

Olor o prueba de aminas (prueba de Whiff). - Las aminas (trimetilamina, putrescina y cadaverina) son producidas por la flora vaginal mixta y se detectan cuando las secreciones vaginales se mezclan con hidróxido de potasio al 10% en la platina de un microscopio o cuando una torunda con secreciones vaginales se sumerge en un tubo de ensayo que contiene hidróxido de potasio, produciendo el olor a "pescado" característico de las aminas, si bien este olor no se produce en ausencia de VB, se ha encontrado raramente en mujeres con trichomoniasis. Esta prueba empleada de manera individual, predice el diagnóstico de VB en forma exacta en el 94 % de las pacientes.

Células indicadoras (células clave). - Las células indicadoras o células clave, son células epiteliales escamosas con una gran cantidad de bacterias adheridas a su superficie por lo que el borde de las células se torna oscuro y rugoso (Figura 1). Las células vaginales epiteliales generalmente tienen bordes característicos. La presencia de células guías (clue cells) en el examen en fresco, se detecta diluyendo la secreción en 1mL de solución salina y observando al microscopio (Livengood, 2009). El punteado sobre el citoplasma de células epiteliales, no significa que éstas sean una célula clave

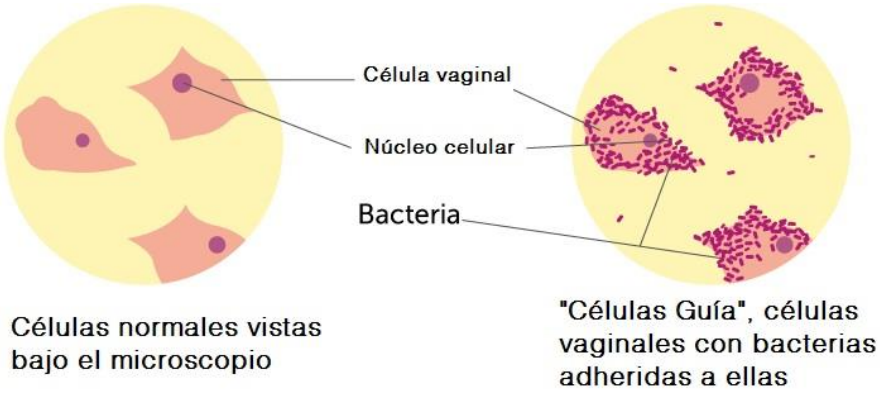

Figura 1. Células Guía.

Generalmente más del 20 % de las células epiteliales de las mujeres con VB tienen la apariencia distinta de poseer el borde dentando. Amsel et al. (1983) han mostrado que una preparación húmeda positiva clara de las células indicadoras significa la presencia de VB con una especificidad del 90 % o superior. Las pacientes con VB pueden tener células epiteliales que no son células indicadoras. El uso de la tinción de Gram para el frotis vaginal fue presentado por Spiegel et al. (1963) el cual brinda un esquema sencillo de evaluar si la flora bacteriana dominante (morfotipo prevaleciente) son bacilos largos Gram positivos o cocos/cocobacilos Gram variables, diferenciado efectivamente entre las pacientes sin VB (bacilos) y las que poseen un diagnostico positivo para VB (cocobacilos) (Livengood, 2009).

2.3.4.2. SISTEMA DE PUNTUACIÓN NUGENT

Un sistema de puntuación de la tinción de Gram fue formalizado por Nugent et al., (1991) en esta puntuación, a una densidad mayor de *Lactobacillus*, menor la puntuación; mientras que, a una mayor densidad de *Gardnerella* y *Bacteroides* la puntuación aumenta; y se añade 1 o 2 puntos debido a la presencia *Mobiluncus* (spp). Una puntuación de 0 a 3 es considerada normal, cuando los resultados van de 4 a 6 se considera una puntuación intermedia, mientras que una puntuación entre los 7 y 10 se considera VB+ (ver Tabla 2). La tinción de Gram es más sensible, mientras que el criterio de Amsel es más específico.

Tabla 2. Criterios para Puntuación de Nugent

Cantidades de morfotipos observados con mayor aumento de:			
Puntaje	**BGP** (Lactobacilos)	**BCGN o BCGV** (*Gardnerella*, *Prevotella*, Bacteroides.)	**BCUGV** (*Mobiluncus*)
0	4+ (≥30)	0	0
1	3+ (5-30)	1+ (<1)	+1 o 2+ (1-4)
2	2+ (1-4)	2+ (1-4)	3+ o 4+ (5-30)
3	1+ (≤1)	3+ (5-30)	
4	0	4+ (≥30)	

La cuenta se realiza reportando los diferentes morfotipos observados en un campo a 100X.
BGP: Bacilo Gram Positivo. **BCGN:** Bacilo Corto Gram Negativo. **BCGV:** Bacilo Curvo Gram Variable. **BCUGV** Bacilo Corto Helicoidal Gram Variable.
Puntaje 0: cuando no se observa ningún morfotipo en el campo enfocado; **1:** al menos 1 célula bacteriana presente por los morfotipos observados en el campo; **3:** de 5 a 30 células bacterianas presente por campo; **4:** cuando se observan 30 o más células de un morfotipo. El **total** es la suma del valor encontrado en cada columna (BGP + BCGN o BCGV + BCUGV).
Interpretación: Puntaje total:
Microbiota Normal 0-3: Negativo para VB.
Microbiota Intermedia 4-6: flora vaginal alterada.
Microbiota VB + 7-10: Vaginosis.
Modificado de: Nugent *et all*. 1991.

Livengood et al., (1990), nos mencionan que, el enfoque más práctico para confirmar el diagnóstico de la VB es documentar la presencia de 3 o más de los 4 criterios siguientes:

- El 20% de las células epiteliales vaginales examinadas son células clave.
- La población bacteriana observada en la preparación en fresco está dominada por cocos y cocobacilos.
- pH vaginal ≥ 4.7.
- Prueba de olor positivo.

2.3.5. VAGINOSIS Y LA RESPUESTA INMUNE

Así también estudios como los de Ryckman *et al*, 2008 han explorado la relación entre el estado de BV y las concentraciones de citoquinas vaginales. Niveles vaginales más elevados de IL-1α, IL-1β e IL-6 se han observado en las mujeres con VB, en comparación con aquellos con flora normal (Platz-Christensen *et al*, 1993; Mattsby-Baltzer *et al*, 1998; Cauci *et al*, 2003; Wasiela *et al*, 2005; St John *et al*, 2007). Sin embargo, estos resultados no son consistentes y hay pocos datos para informar íntegramente las diferencias poblacionales respecto al medio inflamatorio en el tracto genital inferior entre mujeres con vaginosis bacteriana en comparación con aquellas sin VB.

La IL-1β es considerada un mediador clave en la respuesta contra los microorganismos (Dinarello CA, 1996). Se puede decir que la IL-1β es la citocina maestra en lo que conlleva a la activación de diversas citocinas, especialmente la IL-8. La IL-1β aumenta de acuerdo a varios estimulantes dentro de los cuales se encuentra la respuesta contra patógenos. En pacientes con VB se ha observado un aumento considerable de IL-1β en las secreciones cervicovaginales.

Linfocitos-T se encuentran en el estroma del tracto reproductivo superior e inferior, así como entre las células epiteliales (linfocitos intraepiteliales) (Fredricks, 2011). Células T CD4 + secretan IFN-γ y dirigen la maduración de células-B. Células Th17 juegan un papel en la defensa del huésped contra patógenos extracelulares al mediar el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos a los tejidos infectados (McCook, 2011; Handelsman, 2004). El tracto reproductivo femenino restringe la entrada de las células T activadas en ausencia de inflamación o infección (Pace, 1997).

Se cree que el microbioma afecta la respuesta inmune mucosa cervicovaginal. Ciertos productos bacterianos, en particular de los anaerobios, se han demostrado resultar en la inducción de la producción de citoquinas proinflamatorias a través de estimulación de TLRs (Howe, 1999), la activación de células dendríticas y maduración (Cauci *et al*., 2005), y la migración de células del sistema inmune, la apoptosis, y la fagocitosis (Cauci and Culhane, 2011)

Los factores que actúan en la vagina son componentes solubles: lecitina de unión a manosa (MBL), componentes del complemento, defensinas, leucocitos secretores inhibidores de proteasa (SLPI) y óxido nítrico; componentes asociados a membrana: receptores de tipo Toll (TLR) y células fagocíticas. El reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) sintetizados por microorganismos, incluyendo bacterias, hongos, parásitos y virus, así como ligandos endógenos asociados con daño celular desencadena la liberación de citocinas pro-inflamatorias y la activación del sistema inmune adaptativo (linfocitos T y B). (Wira *et al*., 2005).

2.3.6. TÉCNICAS DE ESTUDIO

El desarrollo de métodos moleculares como la PCR Tiempo Real y la Ultra secuenciación de nueva generación permitirá investigar el microecosistema presente en vagina y nos permitirá comprender cómo los factores del huésped como es el pH y el perfil inmunológico local son capaces de influir en el microbioma vaginal y comprender principalmente uno de los retos a resolver dentro de este tipo de infecciones, las recidivas ya que como sabemos, causan un deterioro en la calidad de vida. Los análisis de qPCR (quantitative polymerase chain reaction) ó PCR cuantitativo, permiten la estimación cuantitativa de las variaciones que van teniendo los microorganismos en los distintos cambios hormonales en la vida de la mujer y los desequilibrios de pH (Vitali, 2007). La qPCR ha sido utilizada para estudiar la dinámica de las comunidades bacterianas en los fluidos vaginales considerados normales así como en los fluidos que están asociados a ciertas patologías (Vitali, 2007; Fredricks, 2007; Srinivasan, 2010).

David Fredricks *et al*., han utilizado recientemente técnicas moleculares para identificar varios organismos no cultivados que están asociados con la Vaginosis Bacteriana (Fredricks *et al*. 2005; Oakley *et al*., 2008). También se han identificado Bacterias

Asociadas a la Vaginosis Bacteriana en el orden de los Clostridiales (por ejemplo BVAB1, BVAB2, BVAB3) utilizando ensayos de amplio espectro de 16S rDNA. BVAB3 es la única BVAB que ya ha sido cultivada y secuenciada (Fettweis *et al*., 2012)

La "Metagenómica" (originalmente referida a la caracterización tipo "shotgun" o de genomas completos del ADN total de una muestra) ahora es cada vez más aplicada a los estudios de marcadores tales como el gen 16S rRNA (Luke *et al*., 2012). La metagenómica como tal, pretende capturar la amplitud de identidad microbiótica, así como el potencial funcional y metabólico microbiano presente. Los estudios de metagenómica microbiana pasan por alto la necesidad de aislar y cultivar las especies individuales, permiten la asociación de las poblaciones bacterianas con entornos o condiciones de salud específicas, y facilita el descubrimiento de nuevos taxones de bacterias y arqueas. Hoy en día, la llegada de la Secuenciación de Nueva Generación (NGS, Next Generation Sequencing) ó Secuenciación Masiva, ha permitido la caracterización de la vida microbiana que habita nichos ecológicos específicos a una escala sin precedentes (Lamont *et al*., 2011). Esto es posible mediante la amplificación y secuenciación paralela de fragmentos de genes que son altamente conservadas entre los microorganismos.

El gen diana más común, hasta la fecha, es gen de la subunidad de ARN ribosomal 16S, presente en todas las bacterias conocidas y arqueas. Regiones altamente conservadas del gen de ARNr 16S, facilitan la amplificación por PCR, flanquean las regiones altamente variables (V1-V9) que permiten la identificación filogenética y taxonómica.

Esta técnica permite que un gran número de moléculas a partir de muestras individuales o múltiples para ser secuenciados en una única prueba. Esto amplía enormemente los horizontes de la microbiología, ya que representa un alejamiento de la dependencia de los métodos basados en la cultura y la clonación de bajo rendimiento y secuenciación para la identificación de microorganismos. Cuando es sumada a otras técnicas de estudio para el análisis de la microbiota vaginal, permite una comprensión más amplia de la salud vaginal a través de la detección de organismos silvestres y otros microorganismos difíciles de cultivar que han pasado sin ser detectados mediante técnicas basadas en el cultivo.

Enfoques bioinformático-moleculares permiten una resolución de especies y hasta nivel de cepa de la bacteria que tienen implicaciones importantes para la salud vaginal. Los recientes avances en las tecnologías de secuenciación han permitido la secuenciación

profunda de las comunidades microbianas a un menor costo, lo que ha planteado nuevos desafíos computacionales para el análisis de datos del 16S rDNA del microbioma (Petrosino *et al*., 2009).

3. HIPÓTESIS

Existe relación entre los perfiles de comunidad bacteriana del microbioma con los niveles de citocinas (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF, ING-γ, IL-12p70 e IL-17) presentes en el fluido vaginal de mujeres con vaginosis bacteriana.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe alguna relación significativa entre el microbioma y los niveles de citocinas (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF, ING-γ, IL-12p70 e IL-17) presentes en el fluido vaginal de pacientes con diagnóstico positivo y negativo para la Vaginosis Bacteriana

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar el Microbioma Vaginal, mediante la secuenciación masiva del gen *16S ARNr*, utilizando una plataforma de Secuenciación de Nueva Generación y software Bioinformático.
2. Evaluar los niveles de citocinas (Panel de estudio: IL-2, IL-4, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, TNF e INF-Y) presentes en el fluido vaginal de mujeres con VB y mujeres sanas-asintomáticas; establecer las diferencias significativas existentes entre ambos grupos de estudio para cada citocina.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio observacional, analítico, transversal, prospectivo.

5.2. LUGAR DEL ESTUDIO:

LUGAR	ACTIVIDAD
1. **Clínicas Universitarias** del Centro Universitario de Salud, UANL Responsable: Dra. Rebeca Thelma Martínez Villarreal	Reclutamiento y Toma de muestra. Diagnóstico clínico Recolección de datos clínico y Encuesta
2. **Laboratorio de Inmunología y Virología** de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL Responsable: Dra. Cristina Rodríguez Padilla	Examen Microscópico Procesamiento y almacenaje Muestras Citometría de flujo
3. **Unidad de Genómica** del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), UANL. Responsable: Dra. Rocío Ortiz López	Extracción de ADN Preparación de Librerías genómicas Secuenciación Masiva del 16S ARNr

5.3. MUESTRA:

5.3.1. GRUPO DE ESTUDIO:

La muestra la conformaron pacientes con atención Ginecológica, enroladas al programa, consideradas elegibles por el médico autorizado y habiendo firmado un Consentimiento Informado respaldado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Enfermería de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Anexo 1).

Se formaron tres grupos de estudio:

I. **GRUPO 1 "VB Positiva"**: Cumpliendo los siguientes parámetros:
   - Diagnóstico médico positivo para VB bajo criterios de Amsel (apariencia de flujo vaginal).

- pH vaginal > 4.5
- Test de Aminas positivo
- Células Guía presentes en frotis.
- Puntuación de Nugent > 3

II. **GRUPO 2 "VB Probable"**: Cumpliendo al menos 3 de los 5 parámetros de diagnóstico para VB recién mencionados.

III. **GRUPO 3 "Sanas-Asintomáticas"** (Grupo Control): Cumpliendo al menos 3 de los siguientes parámetros

- Diagnóstico médico Negativo para VB bajo criterios de Amsel (apariencia de flujo vaginal).
- pH vaginal < 4.5
- Test de Aminas Negativo
- Células Guía ausentes en frotis.
- Puntuación de Nugent < o igual a 3.

5.3.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN

5.3.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE GRUPO 1 y 2

- Sexualmente Activas. No haber mantenido Relaciones Sexuales dentro de 3 días antes de la toma de muestra.
- Tipo de Relación Sexual: Heterosexual.
- Ciclo Menstrual: Regular.

5.3.2.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE GRUPO 3

- Pacientes asintomáticas (que no hayan sido diagnosticadas con VB, o alguna otra anomalía y/o padecimiento en un lapso mínimo de 3 meses). / Ciclo Menstrual: Regular
- Sexualmente Activas: No haber mantenido Relaciones Sexuales dentro de 3 días antes de la toma de muestra.
- Tipo de Relación sexual: Heterosexual

5.3.2.3. CRITERIOS DE EXCLUSION

Los Criterios de Exclusión para las participantes de los tres grupos fueron los siguientes:

- Pacientes en estado de Embarazo
- Que no tengan historial clínico saludable en los últimos dos meses (pacientes con sangrado vaginal, diagnosticados con diabetes; hipertensión y que requieran medicamento para el tratamiento de los mismos, inmunocomprometidos, VIH-positivos, con enfermedades autoinmunes ó que hayan usado esteroides sistémicos en un lapso menor de 6 Meses a la toma de muestra; que hayan tomado medicamento inmunosupresivo ó que estén bajo tratamiento hormonal; que haya tomado medicamento antibiótico).
- Pacientes que hayan pasado por una cirugía a nivel pélvico uterino como histerectomía
- Pacientes con diagnóstico de VPH ó con algún tipo de crecimiento neoplásico a nivel ovárico, uterino y/o vaginal.
- Pacientes diagnosticadas con algún proceso infeccioso patológico y/o Enfermedad de Transmisión Sexual (ej. Trichomoniasis, Clamidiasis, Sífilis, Gonorrea, etc.)

5.3.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA:

Se incluyeron muestras con fluido vaginal suficiente para los el procesamiento de los demás ensayos, que no presentaran indicio de sangrado al momento de toma de muestra y que no presentaran infección o enfermedad detectable por el médico al momento de la consulta y toma de muestra.

5.3.4. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE MUESTRAS

Se excluyeron aquellas muestras con insuficiente fluído vaginal para los ensayos posteriores, que presentaran algún indicio de sangrado.

Se excluyeron también muestras cuya extracción de ADN presentara una concentración menor a los 5ng/µl. Como también aquellas cuyos valores de citocinas fueran indetectables.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL

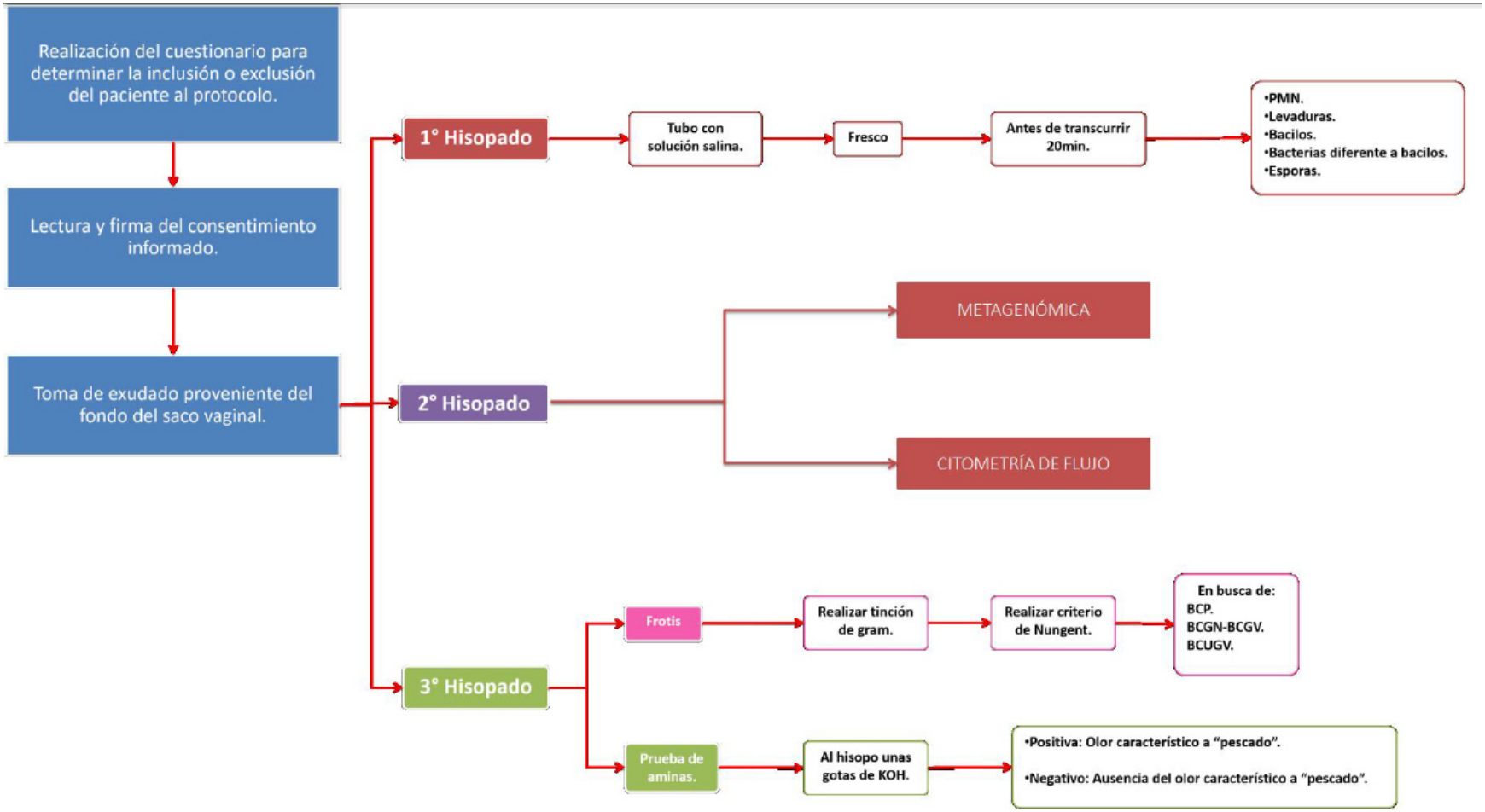

Figura 2. Diagrama de la Estrategia Experimental General. Representación gráfica global del flujo de trabajo del proyecto.

6.1. RECLUTAMIENTO DE PARTICIPANTES

Como parte inicial de la estrategia experimental del proyecto (ver Figura 2), se procedió al reclutamiento y examinación de participantes para la toma de muestra, por parte del personal médico autorizado del Centro Universitario de Salud de la UANL (CSU); con la participación de 5 de sus clínicas.

Este es un centro de salud, público. En base a esto, se realizaron campañas de salud, donde se proporcionó la información correspondiente al protocolo de Investigación, sus procedimientos, beneficios y riesgos.

Se programó una campaña de salud gratuita, estableciendo una estancia de colecta por día de la semana, para cada Clínica; asignando un día específico para cada una de las clínicas. (ej. Lunes en Clínica 1, Martes en Clínica 2, etc.) y se mantuvo esta dinámica, las semanas necesarias hasta lograr el mínimo de muestras planteadas en este estudio. Todas las muestras fueron tomadas por los médicos autorizados por el CSU.

6.2. RECOLECCIÓN DE DATOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS Y CONFORMACIÓN DE GRUPOS DE ESTUDIO.

Aquellas pacientes que aceptaron participar, firmaron una carta declarando su consentimiento informado y voluntario; previamente aprobado (ANEXO 1). Cada una de las participantes completó un cuestionario con información relevante clínica y epidemiológica (ANEXO 2). Los datos clínicos brindados por el responsable médico; el manejo de información de los mismos se realizó bajo consentimiento de los participantes para su análisis en integración con los demás resultados de este estudio.

6.3. DIAGNÓSTICO DE VAGINOSIS BACTERIANA

Durante cada examen de rutina y previo a la toma de muestra, se realizó una evaluación diagnóstica clínica y registro de la misma (ANEXO 2), para valorar los siguientes parámetros:

- pH vaginal: mediante una tirilla indicadora de pH puesta en contacto con la secreción vaginal se determinó si el pH de las participantes era mayor o menor a pH 4.5.

- Detección de olor fétido por una prueba de aminas (utilizando reactivo KOH): Se realizó mediante un barrido en portaobjetos, deslizando el cabezal de un hisopado en el portaobjetos y descargando la secreción vaginal absorbida del hisopo; determinando la reacción con KOH y detectando una alta cantidad de compuesto aminados por el el olor fétido de la reacción producido en la reacción.
- Microscopía en fresco: Con el mismo hisopo, mediante un frotis en fresco se descartó la infección por *Trichomonas spp.*
- Microscopía para la detección de células guía: con un hisopado adicional de diagnóstico, mediante un frotis con tinción de Gram se observaron células epiteliales invadidas por bacilos en su mayoría gram positivos.
- Conteo de leucocitos en frotis: Se contabilizaron los leucocitos por campo, caracterizando aquellas muestras con un número mayor a 7 como Vaginitis, y aquellas con un número menor como Vaginosis.

Los resultados obtenidos fueron anotados y registrados en una hoja de datos de observación (ANEXO 3 y ANEXO 4). Subsiguientemente las muestras fueron procesadas para su almacenamiento y uso posterior.

6.4. TOMA DE MUESTRA

Los hisopados fueron realizados utilizando hisopos de Dacron (Poliester), tomando muestra de secreción vaginal a partir de nivel de fondo de saco vaginal (fornix posterior), manteniendo el hisopo hasta empapar su punta, con muestra suficiente para los ensayos prospectados en la estrategia experimental.

El lavado vaginal realizado al finalizar de la rutina, se llevó acabo utilizando jeringas sin agujas cargadas con Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS) estéril. Un volumen de 5 mL de dicha solución, fue rociada por toda la vagina, estando en contacto con las secreciones y el epitelio durante 1 minuto. Finalmente fue removida con la misma jeringa y almacenada en un tubo Corning de 15mL

Cada muestra se componía en su totalidad de:

- 1 Hisopado para Microscopía.
- 2 Hisopados para Genómica.

- 1 Lavado Vaginal para Citometría

Todas las muestras fueron conservadas en refrigeración y transportadas hasta los laboratorios para su almacenamiento en congelación, hasta su el momento de su evaluación, cumpliendo con las adecuadas condiciones de transporte y almacenamiento (Tabla 3).

Tabla 3. Condiciones de colecta, transporte y almacenamiento de muestra.

No. de MUESTRA	COLECTOR	CANTIDAD	TRANSPORTE	ALMACENAJE	ANÁLISIS
1	HISOPO Dacron	1	Tubo con PBS	Fresco, Refrigeración 4°C	MICROSCOPÍA
2	HISOPO colector en solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)	2	En tubo estéril con 3mL de Buffer de Fosfatos (PBS, pH 7.4).	Extracto de ADN en Congelación -80°C	SECUENCIACIÓN MASIVA
3	Lavado Vaginal	1	TRANSPORTE: En tubo Corning de 15mL estéril con 5mL de Buffer de Fosfatos (PBS, pH 7.4), estéril.	ALMACENAJE: -80°C, 4 meses máximo	CITOMETRÍA DE FLUJO

Los hisopados destinados para análisis genómicos fueron centrifugados a 1500 rpm x 5 min. Se separó el pellet y se almacenó a -80°C hasta el momento de su uso.

Las muestras destinadas a la evaluación citocinas fueron tomadas realizando un lavado en 3ml de Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS). Su almacenaje se mantuvo en congelación a -80°C, hasta el momento de su uso.

7. ANÁLISIS DEL MICROBIOMA VAGINAL POR SECUENCIACIÓN DEL GEN 16S ARNr.

7.1. ESTRATEGIA GENERAL PARA LA PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS Y SECUENCIACIÓN MASIVA.

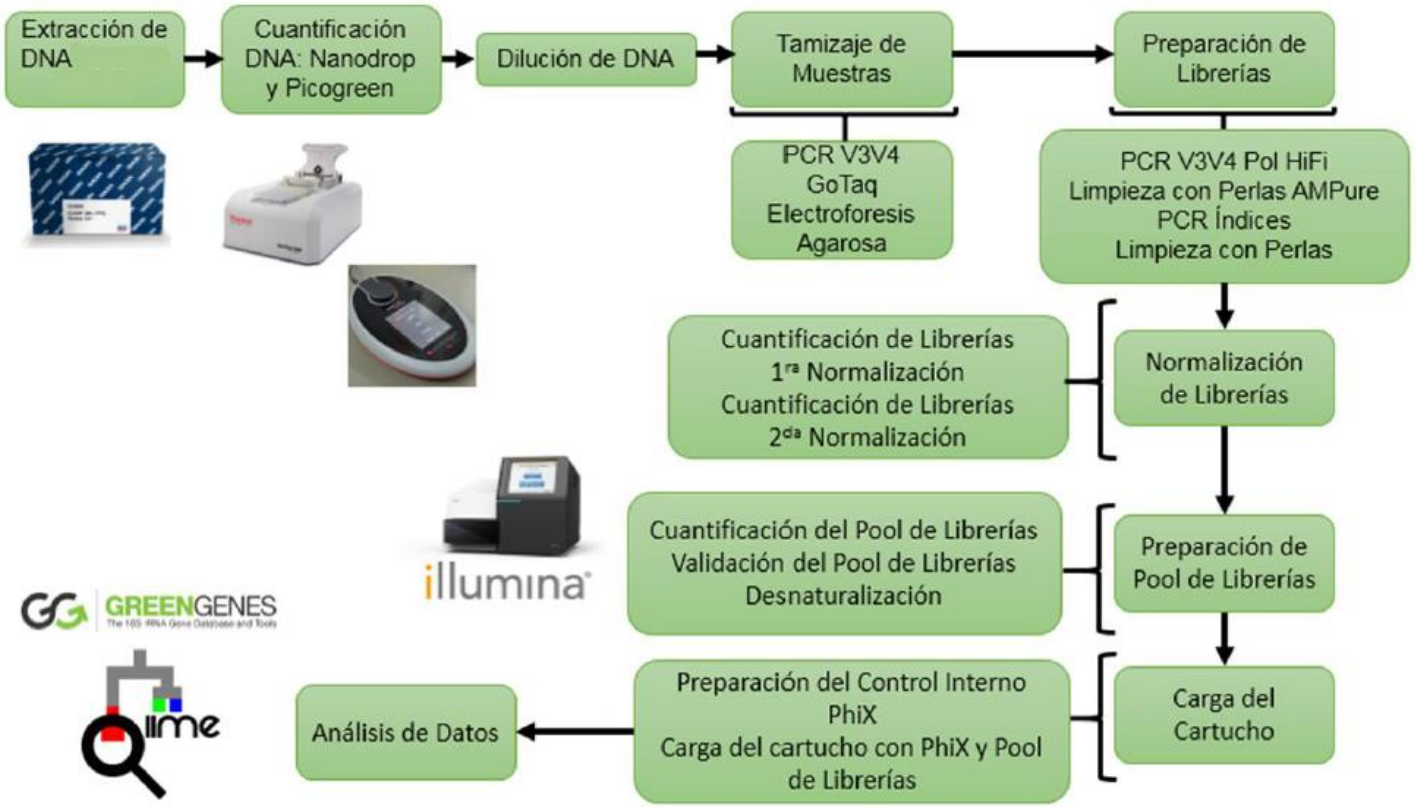

Figura 3. Diagrama de estrategia experimental para ensayo de secuenciación masiva

7.2. EXTRACCIÓN DE ADN

A partir del precipitado obtenido tras la centrifugación de muestras, se extrajo el DNA genómico bacteriano utilizando el kit QIAamp® DNA mini kit (QIAGEN, Valencia, CA) siguiendo los pasos extracción y purificación dictados por el fabricante. El extracto eluído fue distribuido en alícuotas de menor volumen para su almacenaje a -80°C hasta el momento de su uso. Un límite mínimo de 5ng/µl de concentración de ADN, fueron necesarios para ensayos subsecuentes de la estrategia experimental (Figura 3).

7.3. PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS GENÓMICAS.

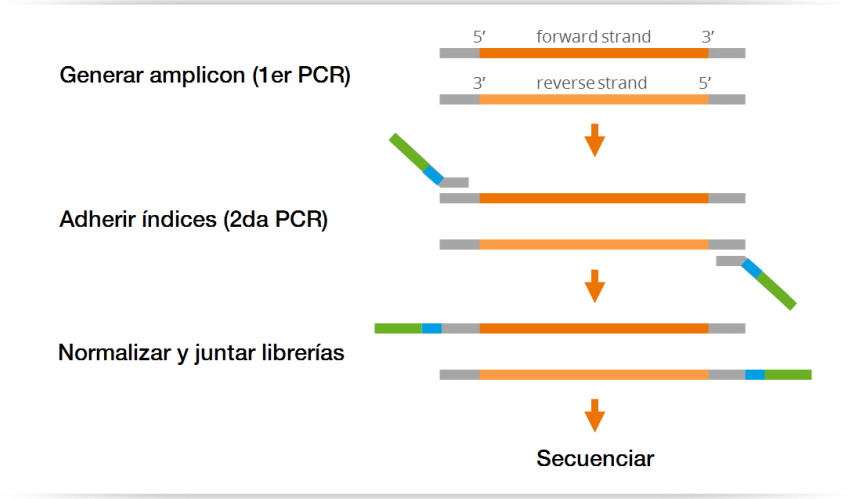

Figura 4. Diagrama simplificado de flujo de trabajo para la creación de librerías genómicas.

La preparación de librerías implica 3 etapas básicas: la generación de amplicon por PCR, la añadidura de índices y la Normalización y preparación de un coctél de librerías (Figura 4).

7.3.1. AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES V3-V4 DEL GEN 16S ARNr.

Se dispuso de un par de primers para flanquear y se utilizarán para la producción de amplicones de ~550 pb, a partir de ADN bacteriano, por PCR punto final, siguiendo las condiciones de PCR dictadas en la Tabla 4.

Primers (Klindworth et al.)

16S Amplicon PCR Forward Primer

5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

16S Amplicon PCR Reverse Primer

5‘ GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

Tabla 4. Condiciones de PCR para región V3-V4.

Etapa	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización	95°C	3 min	
Desnaturalización	95°C	30 seg	25 ciclos
Alineamiento	55°C	30 seg	
Extensión Final	72°C	30 seg	
Extensión Final	72°C	5 minutos	
Incubación	4°C	10 min	

7.3.2. PURIFICACIÓN DE AMPLICONES.

LIMPIEZA DE FRAGMENTOS DE AMPLIFICACIÓN CON PERLAS MAGNÉTICAS (AMPURE XP).

Los productos de la amplificación fueron purificados empleando perlas AMPure XP (Beckman Coulter). Se centrifugaron los tubos de PCR que contenían los productos de amplificación a 1,000 g durante 1 minuto, esto para que la condensación producida pudiera ser recolectada. El contenido de los tubos de PCR se transfirió a tubos de microcentrifuga de 1.5 mL.

Las perlas AMPure XP fueron temperadas durante 30 minutos. Una vez atemperadas, estas fueron mezcladas vigorosamente en vortex durante 30 segundos, esto para que las perlas fueran distribuidas por todo el líquido. Posteriormente empleando una micropipeta se añadieron 20 µL de perlas AMPure en cada uno de los tubos de microcentrifuga y se mezcló por pipeteo 10 veces. Las perlas y los productos de amplicones se dejaron incubar a temperatura ambiente sin agitación durante 5 minutos. Se colocaron los tubos de microcentrifuga en una gradilla con placa magnética durante 2 minutos para permitir que el sobrenadante se aclarara. Sin remover los tubos de la gradilla magnética se empleó una micropipeta para la remoción del sobrenadante, el cual fue descartado. Se cambió de puntas entre cada una de las muestras para evitar la contaminación cruzada. Con los tubos aún colocados en la gradilla magnética se llevó a cabo una limpieza con etanol al 80% fresco, para esto se empleó una micropipeta para añadir el etanol a cada uno de los tubos que contenían las muestras, tratando de mojar las perlas que se encontraban en la pared del tubo

de microcentrifuga; una vez lavadas las perlas, se incubaron los tubos nuevamente en la gradilla durante 30 segundos, posteriormente el sobrenadante fue removido y descartado, después se llevó a cabo un segundo lavado con etanol al 80%, siguiendo los pasos anteriores, a diferencia del lavado anterior, una vez que el sobrenadante fue removido se llevó empleó una micropipeta de 0.5-10 µL para la remoción del remanente de etanol presente en el tubo, después se dio un spin a los tubos para retirar el etanol presente en las paredes y nuevamente se removió el etanol con el uso de una micropipeta, posteriormente se destaparon los tubos y se dejaron en la gradilla magnética para que el exceso de etanol fuera removido por evaporación durante 10 minutos; una vez 16 trascurridos los 10 minutos se verificó que las perlas estuvieran secas y se prosiguió a retirar los tubos de la gradilla magnética. Se añadieron 52.5 uL de Buffer Tris (10 mM a pH de 8.5) en cada uno de los tubos de microcentrifuga empleando una micropipeta, una vez añadido el Buffer se mezcló por pipeteo 10 veces para desprender las perlas adheridas a la pared del tubo. Se incubaron los tubos a temperatura ambiente durante 2 minutos, una vez concluida la incubación se colocaron nuevamente los tubos en la gradilla magnética durante 2 minutos para permitir que el sobrenadante se aclarara, posteriormente se trasfirieron 50 uL del sobrenadante a nuevos tubos de PCR, cambiando de punta de micropipeta entre cada una de las muestras.

7.3.3. PCR DE ÍNDICES.

Durante esta etapa fueron añadidos índices duales y los adaptadores de secuenciación del Kit de Nextera XT de Illumina.

Empleando una micropipeta se transfirieron 5 µL de cada uno de los tubos del paso anterior a tubos de PCR nuevos. El juego de índices se temperó y se mezcló por vortex y posteriormente se le dio un breve spin.

Se llevó a cabo la siguiente reacción: 5 µL de producto de amplificación, 5 µL de índices de Nextera XT con prefijo N7xx, 5 µL de índice de Nextera XT con prefijo S5xx, 25 µL de 2x KAPA HiFi HotStar Ready Mix y por último 10 uL de agua grado PCR, para hacer un volumen total de 50 µL, esto se realizó para cada una de las muestras siguiendo el arreglo de índices correspondiente.

Se mezcló por pipeteo cada una de las muestras 10 veces, posteriormente los tubos fueron centrifugados a 1,000 x g durante 1 minuto, después se llevó a cabo la PCR en el termociclador con el programa correspondiente. (Tabla 5).

Tabla 5. Condiciones de PCR para la adición de Índices.

Etapa	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización	95°C	3 min	
Desnaturalización	95°C	30 seg	8 ciclos
Alineamiento	55°C	30 seg	
Extensión Final	72°C	30 seg	
Extensión Final	72°C	5 minutos	
Incubación	4°C	10 min	

Posteriormente una segunda purificación fue hecha a este producto de PCR.

7.3.4. NORMALIZACIÓN DE LIBRERÍAS.

La cuantificación de las librerías permitió determinar la concentración de librerías presentes en el volumen para su posterior normalización hasta una concentración de 4 nM.

Para él cálculo de la concentración en nanomolaridad (nM) de cada una de las librerías se empleó la siguiente ecuación:

$$nM = \frac{(Concentración\ de\ la\ Librerías\ en\ ng/\mu l)}{\left(660\frac{g}{mol} x\ tamaño\ promedio\ de\ la\ librería\right)}\ x\ 10^6$$

7.3.5. CUANTIFICACIÓN DE LA BIBLIOTECA.

Para cuantificar las librerías se utilizó un fluorómetro *Qubit*® 2.0 y el *Quant-iT*™ *PicoGreen*™ *dsDNA* y se siguieron las instrucciones dadas por el fabricante.

7.3.6. PREPARACIÓN DEL POOL DE LIBRERÍAS.

Se tomó una alícuota de 5 µL de cada una de las librerías normalizadas para formar un único pool de librerías a una concentración de 4 nM.

Una PCR tiempo real se realizó con la finalidad de conocer la dilución apropiada del pool de librerías previo a su secuenciación. La dilución tomada fue 1:2000

7.4. SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN.

Utilizando secuencias pareadas de 300-pb, se utilizó el kit *MiSeq Reagent v3 Kit* (*Illumina, Inc., USA*) en la plataforma *MiSeq (Illumina*) capaz de generar más de 100,000 lecturas por muestra. Dicho reactivo contenía los reactivos de preparación y corrida de la celda de secuenciación, siguiento la metodología sugerida por el fabricante.

7.4.1. CARGA DEL CARTUCHO Y "FLOW CELL" PARA SECUENCIACIÓN.

Se realizó un lavado de la Flow Cell empleando Etanol al 80%, para eliminar los restos de sales presentes en el Buffer de suspensión, posteriormente se realizó un segundo lavado empleando agua bidestilada, una vez lavada la Flow Cell fue colocada en el equipo MiSeq (Illumina, Inc). Se vació el contenedor de desechos y se rellenó el contenedor de solución de lavado con Tween 20 al 0.5%.

Se preparó un bloque de incubación a 96°C, posteriormente se removió el cartucho de reactivos de secuenciación para MiSeq de -15°C a temperatura ambiente, en un contenedor se preparó una mezcla con 3 partes de hielo y 1 parte de agua y se dejó el cartucho en este baño para su uso posterior.

Se combinaron 30 µL de control PhiX desnaturalizado y diluido y se mezclaron con 570 µL del pool de librerías desnaturalizado y diluido. Se colocó la mezcla en hielo, una vez preparado el cartucho de secuenciación, se calentó la mezcla en el bloque de calentamiento precalentado a 96°C durante 2 minutos; después de la incubación, se mezcló por inversión y se colocó en el baño de agua con hielo, se mantuvo en el baño frío durante 5 minutos, posteriormente se cargó la mezcla en el cartucho de secuenciación.

7.4.2. CORRIDA DE SECUENCIACIÓN

Se llevó a cabo la corrida de secuenciación de 300 ciclos en Pair End (PE) en el equipo MiSeq.

7.5. ANÁLISIS DE DATOS DE SECUENCIACIÓN

El análisis de datos se dividió en dos etapas. La primera el análisis taxonómico directo a partir del sistema operativo del equipo MiSeq. La segunda etapa involucra un análisis exhaustivo bioinformático mediante software QIIME. Para dicho análisis, los datos de

secuenciación generados serán organizados en Unidades de Operación Taxonómica, mejor conocidos como "OTUs" (del inglés *Operational Taxonomic Units*).

8. EVALUACIÓN CITOCINAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

A partir las muestras almacenadas a -80°C, tras una centrifugación a 1,500 rpm x 5min, se descartó el precipitado y se conservó el sobrenadante. Se tomaron alícuotas de un mililitro de sobrenadante, transfiriéndolas a un microtubo (1,5 ml de capacidad). Se utilizó el kit comercial: *CBA Human Inflammatory Cytokines Kit y CBA Human TH1/TH2/TH17 (Becton, Dickinson)* siguiendo las instrucciones metolodológicas descritas por el fabricante, para la lectura de los niveles de citocinas (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF, ING-γ, IL-12p70 e IL-17); utilizando como plataforma de lectura el citómetro de flujo personal *Accuri C6 (Becton, Dickinson)* y el software de análisis cuantitativo *FCAP Array software.*
Para lograr lo anterior, se procedió siguiendo la metodología siguiente:

- Se reconstituyó el reactivo estándar para el estándar del kit, con 2 ml del diluyente para las muestras en un tubo cónico de polipropileno de 15 ml. Este tubo se etiquetó con el nombre de "top standard" y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente.
- El reactivo estándar para los kits de Citocinas se compone de una concentración conocida de cada una de las citocinas que se analizan. Se etiquetaron otros 8 tubos de 12 x 75 mm. con la siguiente nomenclatura: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256.
- Posterior a la rotulación, se añadieron 300 µl de diluyente para muestras a cada uno de los tubos anteriores y se desarrollaron las diluciones seriadas transfiriendo 300 µl desde el tubo "top standard" al tubo 1:2 y de este al 1:4 y así sucesivamente hasta terminar con el tubo 1:256. Además, se prepararó un último tubo de 12 x 75 mm. al que sólo se añadiró el diluente para muestras. Este tubo será utilizado como control negativo (0 pg./ml).
- Se prepararó la mezcla de las microesferas etiquetando un tubo de 1.5 ml por cada muestra y uno para cada punto de la curva estándar. Se añadieron 50 µl de "mezcla de microesferas capturadoras" a todos los tubos del ensayo. Así también se añadieron 50 µl de cada punto de la curva estándar en el tubo correspondients, 50 µl de cada muestra y 50 µl de los reactivos de detección de citocinas PE (B) en todos los tubos.

- Se incubaron todos los tubos durante 3h a temperatura ambiente y se recubrieron con aluminio. Se añadió 1 ml de solución de lavado a cada tubo y se centrifugó a 200 g durante 5 min. Por último se retiró el sobrenadante y se añadieron nuevamente 300 µl de solución de lavado a cada tubo para entonces ser analizados por citometría de flujo.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizaron medidas de estadística descriptiva tales como frecuencias absolutas y porcentajes, medias o medianas y desviaciones estándar o límites. Para el análisis diferencial se utilizaron pruebas no paramétricas como X^2 de Pearson y Kruskal-Wallis. Se consideró como significativo un valor de $p < 0.05$. Se utilizó el paquete estadístico SPSS V.15.0., el paquete GRAPHPRISM 7.

10. RESULTADOS

10.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-DEMOGRÁFICAS

Se reclutaron 86 participantes en un periodo de muestreo de diciembre del 2015 hasta agosto del 2016, en los diversos Centros de Salud Universitarios previamente mencionados. La muestra se tomó como parte de la atención ginecológica básica para la realización de Papanicolau. Las pacientes que acudieron como voluntarias, para participar en el estudio firmaron un consentimiento informado aprobado por el comité de ética del Facultad de Enfermería, Universidad Autónoma de Nuevo León, con No de registro en la Comisión Nacional de Bioética (CONBIOÉTICA) No. 19CEI02420141127 (Anexo 1), y completaron una encuesta epidemiológica (Anexo 2). Las mujeres voluntarias pertenecieron a una población abierta.

Solo el 70 % de estas participantes fueron incluidas finalmente para los estudios posteriores, dando una *n* total de muestras de 61 muestras. Las 25 participantes restantes fueron excluidas del estudio debido a que cumplieron con al menos uno de los criterios de exclusión (proceso infeccioso y sangrado, principalmente). La cantidad de participantes incluidas de cada una de las clínicas, se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Conteo de participantes incluidas por Clínica visitada.

Centros de Salud Universitarios de la UANL y de Salubridad, participantes:	
Nombre	**Cantidad de muestras**
C.S.U. San Rafael	10
C.S.U. Pueblo Nuevo	17
C.S.U. Unidad Hab. Indep.	10
C.S.U. Veintiuno de Enero	8
C.S.U. Fomerrey Siete	7
C.S. Tamaulipas	9

Las variables clínico demográficas como de vida sexual, fueron contestadas en la encuesta (Anexo 2) durante la consulta.

El 34% de las pacientes pertenecieron al centro de salud Pueblo Nuevo, el 18% a la Unidad Habitacional Independencia, el 16% al Centro de Salud Tamaulipas, el resto de las pacientes pertenecieron a los centros de salud, 21 de Enero, San Rafael y Vicente Guerrero (tabla 3). En el centro de salud Pueblo Nuevo se encuentra el 25.81% del grupo 1, el 83.33% del grupo 2 y el 57.14% del grupo 3, sin presentar diferencia estadística significativa en cuanto a su prevalencia en los tres grupos de estudio (P>0.05).

Las participantes incluidas se encontraron en un rango de 20 a 50 años, todas ellas con vida sexual activa y ciclo menstrual activo. El 100% de las participantes mantenían relaciones Heteroxuales, de inicio a los 18 años; con una media de 2 parejas totales a lo largo de su vida (ver Tabla 7).

Tabla 7. Resumen de datos clínico-epidemiológicos, Medias y Frecuencias.

n = 61 muestras	Media de Edad:	34.5 años
	Rango de Edad:	20 – 52 años
	Inicio Vida Sexual:	18 años
	Preferencia Sexual :	Heterosexual (100 %)
	Estado Civil:	Casada (70 %)
	Ocupación:	Ama de Casa (80%)
	# Parejas Actuales :	1 (0 – 3)
	# Parejas Totales :	2 (1 – 7)

La información de los participantes y su información clínica-demográfica a detalle se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Datos epidemiológicos y clínicos de 61 pacientes incluidas en el estudio.

#	Clave	Centro	Dx	Edad	pH	Grupo pH	Aminas	Nugent	Ciclo Menstrual	Inicio Act.Sexual	Par.Sex	Parejas Total
1	T040A-HAJ-UH1215	UHI	Posible VB	24	5	>4.5	Positivo	1	IRREGULAR	18	1	1
2	T051A-GCH-CST0116	CST	Posible VB	40	4	<4.5	Positivo	7	REGULAR	18	1	1
3	T054A-EGS-CST0116	CST	Posible VB	38	4	<4.5	Positivo	5	REGULAR	16	1	1
4	T058A-ACJS-CST0116	CST	Posible VB	25	4	<4.5	Positivo	4	REGULAR	18	1	5
5	T070A-TZMA-VE	VE	Posible VB	28	6	>4.5	Negativo	5	REGULAR	15	1	7
6	T073A-VPMP-F7	FM7	Posible VB	36	5	>4.5	Negativo	4	IRREGULAR	16	0	3
7	T082A-HRR	PN	Posible VB	24	4.5	>4.5	Negativo	5	IRREGULAR	20	1	1
8	T085A-GCES	PN	Posible VB	26	5	>4.5	Negativo	4	REGULAR	21	1	1
9	T086A-BMMF	PN	Posible VB	24	5	>4.5	Negativo	4	REGULAR	14	1	3
10	T002A-ROME-SR1215	SR	+	26	6	>4.5	Positivo	7	REGULAR	17	1	1
11	T003A-RND-SR1215	SR	+	28	5	>4.5	Negativo	6	REGULAR	20	1	1
12	T005A-RUG-SR1215	SR	+	44	5	>4.5	Positivo	4	REGULAR	23	1	1
13	T009A-PUJM-PN1215	PN	+	41	5	>4.5	Positivo	1	REGULAR	18	1	1
14	T012A-BOBD-PN1215	PN	+	26	6	>4.5	Positivo	3	REGULAR	13	1	3
15	T013A-VIC-PN1215	PN	+	33	6	>4.5	Positivo	0	REGULAR	18	1	2
16	T021A-HSF-VE1215	VE	+	29	5	>4.5	Positivo	5	IRREGULAR	18	1	2
17	T022A-LLM-VE1215	VE	+	41	5	>4.5	Negativo	7	IRREGULAR	18	1	1

18	T026A-RRC-PN1215	PN	+	45	5	>4.5	Positivo	3	REGULAR	15	1	1
19	T028A-RSMO-PN1215	PN	+	25	6	>4.5	Positivo	5	REGULAR	17	1	2
20	T029A-EPSP-PN1215	PN	+	28	6	>4.5	Negativo	4	REGULAR	16	1	5
21	T041A-RHMC-UH1215	UHI	+	46	6	>4.5	Positivo	4	REGULAR	20	1	1
22	T053A-OMLC-CST0116	CST	+	37	4	<4.5	Positivo	6	REGULAR	16	1	2
23	T067A-HEB-SR0416	SR	+	37	5	>4.5	Positivo	0	REGULAR*	18	3	3
24	T068A-BGNG-SR0416	SR	+	31	5.5	>4.5	Positivo	4	REGULAR	24	1	1
25	T072A-APM-F7	FM7	+	27	6	>4.5	Negativo	4	REGULAR	20	1	1
26	T074A-MSEY	FM7	+	32	6	>4.5	Positivo	4	REGULAR	19	1	1
27	T077A-HRAM	FM7	+	26	6	>4.5	Positivo	1	IRREGULAR	15	1	3
28	T083A-PMMC	PN	+	47	5	>4.5	Positivo	5	REGULAR	24	1	1
29	T001A-CCM-SR1215	SR	-	41	4	<4.5	Negativo	0	REGULAR	20	1	2
30	T004A-BMME-SR1215	SR	-	33	4	<4.5	Negativo	0	REGULAR	16	2	5
31	T006A-MSM-PN1215	PN	-	37	4	<4.5	Negativo	0	REGULAR	19	1	1
32	T008A-ORA-PN1215	PN	-	41	4	<4.5	Negativo	1	REGULAR	18	1	1
33	T011A-LMMD-PN1215	PN	-	40	4	<4.5	Negativo	1	REGULAR	19	1	2
34	T014A-CPCL-PN1215	PN	-	20	4	<4.5	Negativo	0	REGULAR	15	1	6
35	T016A-HICP-VE1215	VE	-	36	4	<4.5	Negativo	1	IRREGULAR	22	1	1

36	T018A-LMLE-VE1215	VE	-	30	4	<4.5	Positivo	1	IRREGULAR	19	1	2
37	T019A-HAM-VE1215	VE	-	33	4	<4.5	Negativo	1	IRREGULAR	23	1	1
38	T020A-GCR-VE1215	VE	-	44	4	<4.5	Negativo	1	REGULAR	26	1	1
39	T023A-VMG-VE1215	VE	-	39	4	<4.5	Negativo	1	IRREGULAR	28	1	1
40	T025A-SCNM-PN1215	PN	-	49	6	>4.5	Negativo	1	IRREGULAR	20	1	1
41	T027A-SMDE-PN1215	PN	-	27	4	<4.5	Negativo	3	REGULAR	17	1	4
42	T030A-RMLE-PN1215	PN	-	20	6	>4.5	Negativo	2	REGULAR	17	1	1
43	T031A-AAAM-UH1215	UHI	-	50	5	>4.5	Negativo	2	REGULAR	19	1	2
44	T032A-RCGM-UH1215	UHI	-	40	4	<4.5	Negativo	0	REGULAR	20	1	3
45	T033A-RCM-UH1215	UHI	-	41	4	<4.5	Negativo	1	REGULAR	20	1	2
46	T034A-RFV-UH1215	UHI	-	45	4	<4.5	Negativo	4	REGULAR	25	1	1
47	T035A-FRE-UH1215	UHI	-	29	4	<4.5	Negativo	2	REGULAR	20	1	1
48	T036A-STME-UH1215	UHI	-	50	4	<4.5	Negativo	3	REGULAR	16	0	1
49	T039A-RMNA-UH1215	UHI	-	44	4	<4.5	Negativo	0	REGULAR	19	1	1
50	T042A-COC-UH0116	UHI	-	42	4	<4.5	Negativo	2	REGULAR	18	1	1
51	T049A-CJF-CST0116	CST	-	29	4	<4.5	Negativo	2	REGULAR	19	1	2
52	T050A-FCKY-CST0116	CST	-	26	4	<4.5	Negativo	2	REGULAR	13	1	2
53	T052A-QPME-CST0116	CST	-	25	4	<4.5	Negativo	3	REGULAR	18	1	1

54	T055A-EAJG-CST0116	CST	-	34	4	<4.5	Positivo	1	REGULAR	16	1	1
55	T056A-MAMR-CST0116	CST	-	26	4	<4.5	Negativo	1	REGULAR	15	1	1
56	T065A-BMM-SR0416	SR	-	28	5	>4.5	Negativo	1	REGULAR	18	1	1
57	T066A-GRY-SR0416	SR	-	38	5	>4.5	Negativo	1	REGULAR	19	1	1
58	T069A-OCAE-SR0416	SR	-	38	5.5	>4.5	Negativo	0	IRREGULAR	18	1	2
59	T075A-CCMY	FM7	-	34	5	>4.5	Negativo	0	IRREGULAR	21	1	1
60	T076A-CSRdJ	FM7	-	34	4	<4.5	Negativo	1	REGULAR	19	1	1
61	T078A-MSLL	FM7	-	23	4	<4.5	Negativo	1	REGULAR	15	1	2

10.2. DIAGNÓSTICOS CON VAGINOSIS BACTERIANA RESULTANTES.

Conformando el GRUPO 1, un 25% de la población participante fue fuertemente positiva para la VB, cumpliendo, como mínimo, con 4 de las 5 variables evaluadas durante la consulta (Aminas, pH y Criterios de Amsel) y en laboratorio (Nugent y Células Guía). Mientras que un 21% de la población fue positiva para al menos 3 de los 5 criterios, siendo catalogados en el GRUPO 2. (Figura 5).

El tercer GRUPO (54%) no mostró positividad valores positivos, o en su defecto, solo fue positivo para al menos una variable evaluada.

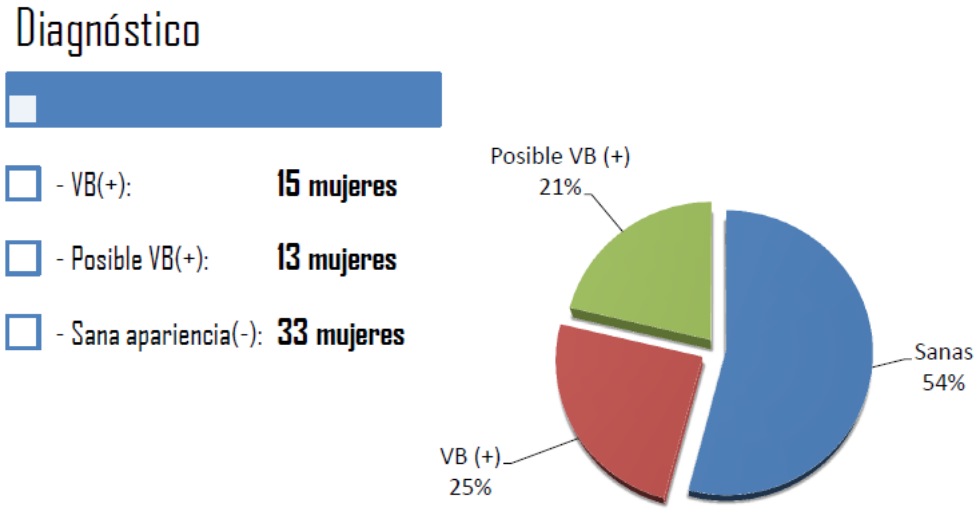

Figura 5. Resumen de casos diagnosticados.

10.3. ANÁLISIS DE CITOCINAS

El análisis de Citocinas fue factible para el total de la población incluída (*n=61*).

Sin embargo tan solo 7 de las 10 citocinas que se evaluaron dentro del panel, presentaron concentraciones suficientes para su lectura por citometría de flujo. Con valores cercanos al cero o simplemente indetectables, fueron excluidas las citocinas IL-2, IL-4 e INF-g.

La evaluación estadística para la mayoría de las citocinas no mostró diferencias significativas entre los grupos de estudio (Figura 6B y 6C). Con excepción evidente, fue posible observar diferencias significativas en los grupos 1(*p=0.01*) y 2 (*p=0.05)* con respecto al grupo control, para los niveles de la citocina IL-8 (Figura 6A).

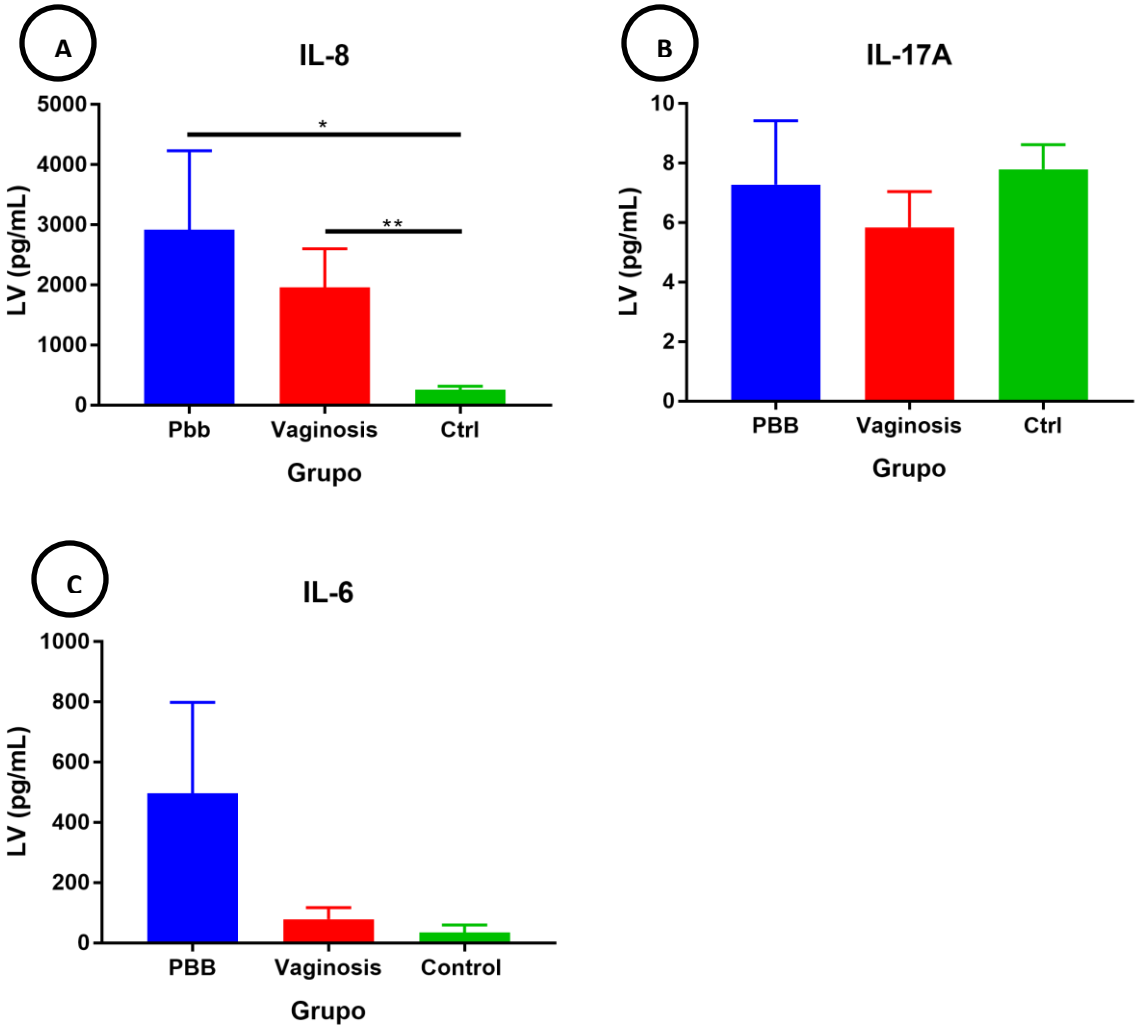

Figura 6. Niveles de Citocinas en lavado vaginal de Grupo 1, Grupo 2 y Grupo 3.

A. Diferencia significativa de grupos 1 y 2, con grupo 3, para IL-8

B y C. No hubo Diferencias significativas entre grupos para el resto de citocinas.

10.4. ANÁLISIS DEL MICROBIOMA VAGINAL

Para esta etapa, un total de 15 muestras fueron excluidas, dado que presentaban concentraciones menores a 5ng/µl de extracto de ADN genómico o por insuficiente y/o nula amplificación de ADN bacteriano.

La corrida de secuenciación arrojó un total de 13,298,965 lecturas, lo que permitió un rendimiento de aproximadamente 250 mil lecturas por muestra. Cerca de 53 géneros bacterianos fueron detectados en 397 eventos, a partir de los *OTUs*, generados por el análisis directo por parte del equipo MiSeq. Estos géneros representaron el 80% de las abundancias relativas analizadas ya que aproximadamente 3 millones de lecturas calificaron como no clasificadas, por lo que fue necesario recurrir a un análisis más exhaustivo con software bioinformático QIIME. *Lactobacillus*, *Gadrnerella, Prevotella, Arsenophonus, Streptococcus* y *Atopobium* fueron los géneros bacterianos más frecuentemente detectados en el total de los pacientes (ver Gráfico 7).

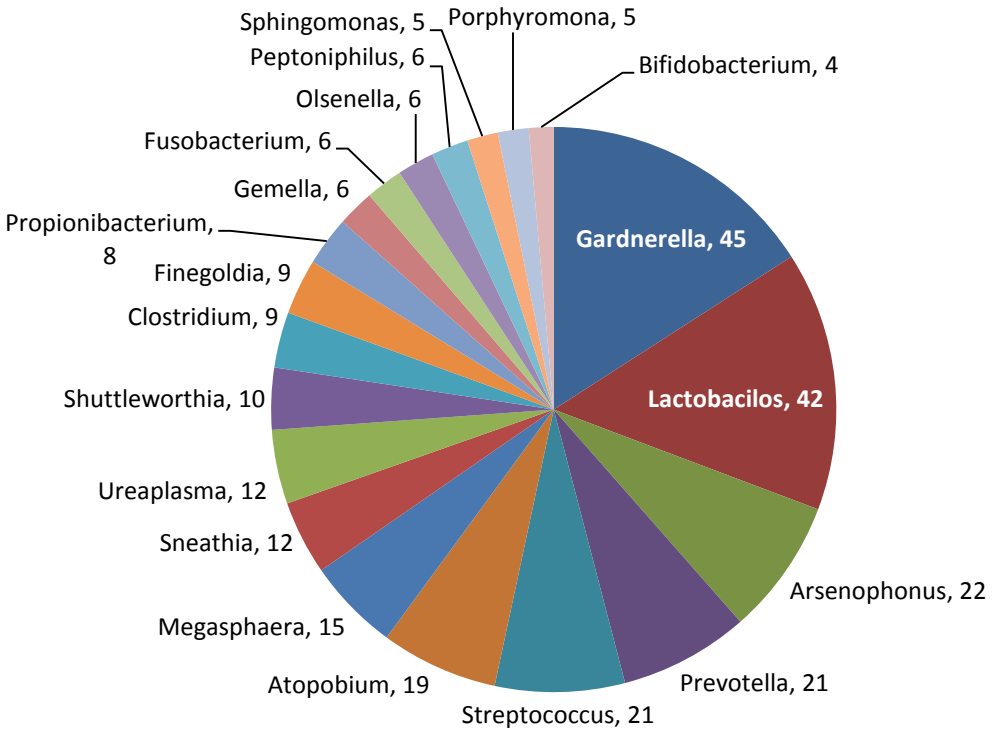

Gráfico 7. Géneros identificados y su frecuencia de aparición en los microbiomas de todos los pacientes.

Tomando en cuenta la totalidad de lecturas obtenidas para cada bacteria detectada, fue posible elucidar las abundancias relativas de todos los géneros identificados; siendo los géneros *Lactobacillus* y *Gardnerella* los más abundantes en toda la población, seguidos por el género *Atopobium* (ver Gráfico 8).

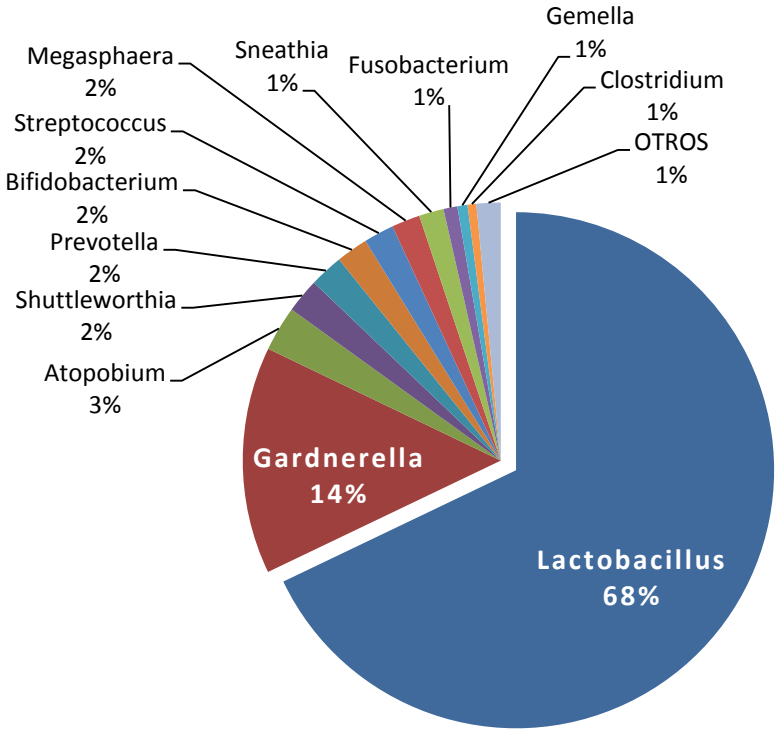

Gráfico 8. Abundancia relativa de bacterias en los microbiomas de toda la población.

Así también, aunque en menor proporción resaltan los géneros *Megasphaera, Sneathia, Streptococcus, Prevotella, Shuttleworthia y Bifidobacterium* (Gráfico 8).

Para el análisis por grupos, fue posible clasificar 4 Perfiles de Microbioma bacterianos, de acuerdo a la similitud de sus patrones de diversidad y dominancia. Dichas comunidades se catalogaron como CST 1, CST2, CST3 y CST4.

El primer perfil de Microbioma caracterizado, presentó una dominancia por el género *Lactobacillus* (ver Gráfico 9)*;* representando al 52% de la población estudiada y englobando al 75% de las pacientes del grupo control.

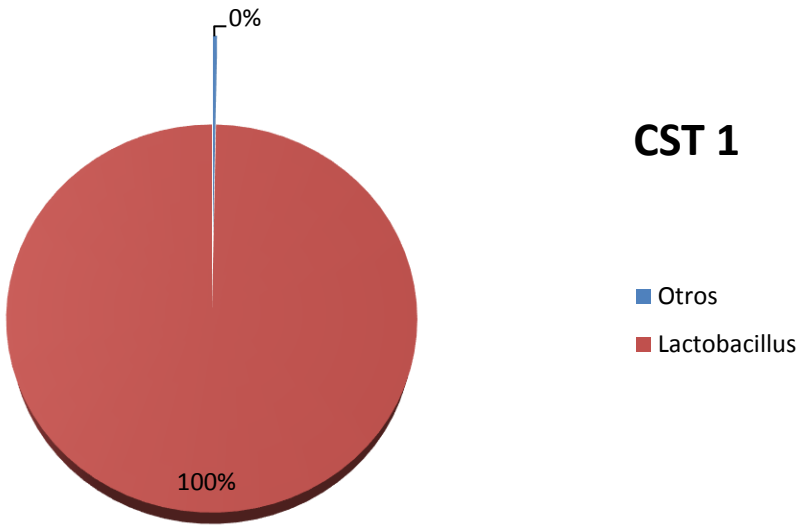

Gráfico 9. Representación de Microbiomas tipo CST 1 dominados por *Lactobacillus.*

Por su parte, CST 2 presentó una dominancia compartida por 2 o 3 géneros bacterianos como *Gardnerella y Lactobacillus*, cuya dominancia abarcaba al menos el 80% de las comunidades de este grupo (ver Gráfico 10).

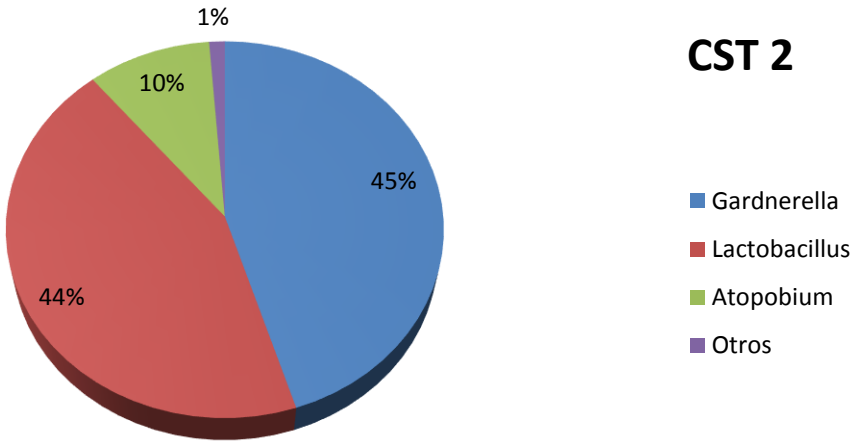

Gráfico 10. Representación de Microbiomas tipo CST 2, dominados por *Lactobacillus* y *Gardnerella*

CST3 presentó una dominancia parcial por *Lactobacillus* (hasta el 70% del microbioma) sumada a un abanico de géneros diversos con abundancias relativas aproximadas (ver Gráfico 11).

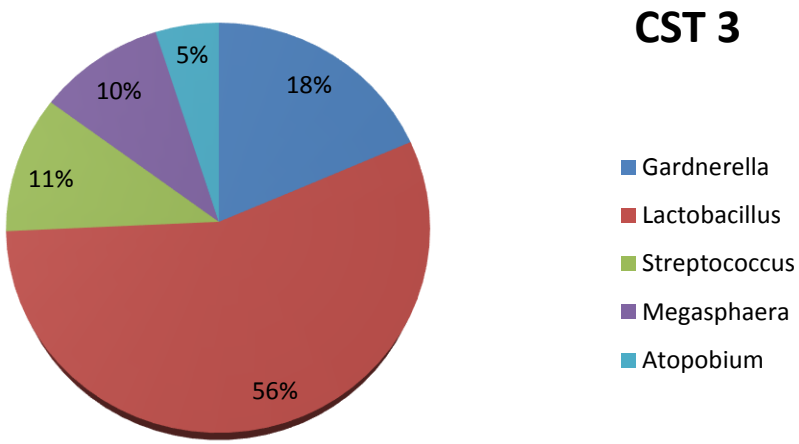

Gráfico 11. Representación de Microbiomas tipo CST 3, dominados parcialmente por *Lactobacillus* y una variedad de géneros con abundancias relativas cercanas.

Finalmente, los microbiomas tipo CST 4 se distinguieron por no ser dominados por un género en particular, sino por una variedad de géneros con abundancias cercanas (Gráfico 12); pero con la particularidad de mostrar una clara ausencia o muy escasa detección de *Lactobacillus.*

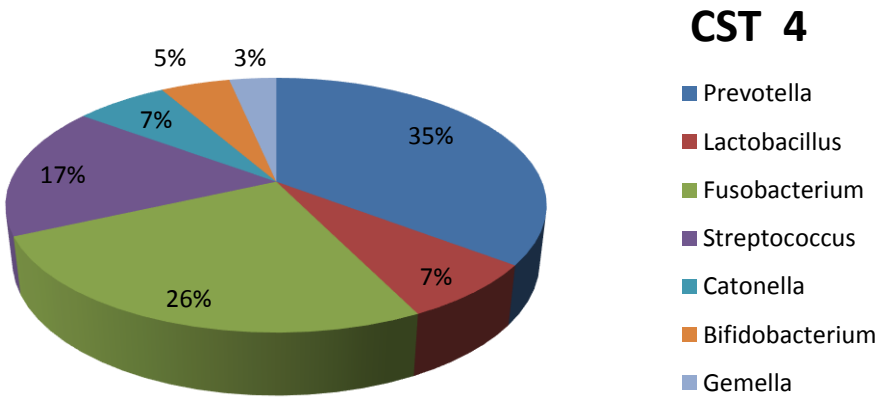

Gráfico 12. Representación de Microbiomas tipo CST 4, dominancia por multiples géneros.

Cabe recalcar que dentro de este CST 4, se encontraron géneros como *Streptococcus, Prevotella* y *Gardnerella*; con lecturas más abundantes que en los demás grupos y una tendencia a dominancia parcial de la comunidad.

11. DISCUSIÓN

Aunque la VB ha sido inusualmente asociada a un largo número de desórdenes de salud, la mayor parte de ellos han sido muy variables o de magnitude pequeña. Uno de los problemas para validar estas asociaciones ha sido el diagnóstico de la VB.

Inicialmente, solo era diagnosticada en base a los Criterios clínicos de Amsel, que incluían: un elevado pH(>4.7), descarga grisácea y olor fétido en una prueba con KOH (Test de Aminas), sumado a la búsqueda de células guía. Estos criterios han ido poco a poco reemplazándose por el sistema de puntuación Nugent (Nugent et al. 1991). Este método se enfoca en la observación microscópica, dejando a un lado la sintomatología. Mas sin embargo, algunas especies de lactobacilos y *Atopobium spp.* pueden ser difícil de diferenciar de *Gardnerella vaginalis* dada su similar morfología. (Srinivasan *et. al* 2013)

En este estudio se rescata la opcion de formar cohortes que estrictamente cumplan con una mayoría de los valores de diagnóstico para la VB. Un alto porcentaje de diagnósticos con VB positiva se vio respaldado por la detección de gran cantidad de lecturas de bacterias asociadas a la Vaginosis Bacteriana como lo son *Gardnerella, Atopobium y Prevotella*.

De manera que, a medida que se incluyen más variables de positividad, es posible lograr un diagnóstico más certero.

Para las pacientes en el grupo 2, VB probable, se presentaron los 4 tipos de comunidad de microbioma. Sin embargo, resulta interesante que el 50% de los microbiomas analizados para este grupo, encajan el tipo de comunidad CST 4, asociado a VB; pudiendo ser entonces catalogados en el grupo 1 (VB Positivo). Podría inferirse que el análisis del Microbioma Vaginal, podría ser servir como una herramienta diagnóstica complementaria, aunada a los variables de diagnóstico ya anteriormente estipuladas.

En lo que respecta a cuestiones clínico demográficas, se ha sugerido, anteriormente que la VB pudiese estar ligada los hábitos de vida sexual como el número de parejas, el tipo de relación sexual y las relaciones homosexuales. En el presente estudio no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre algún aspectos clínicos y los asociados a la vida sexual con respecto a la VB. Allsworth et al., mencionan que la vaginosis bacteriana

no es exclusivamente una enfermedad de transmisión sexual, ya que ellos encontraron que en el 15% de las mujeres que reportaron no tener un historial de relaciones sexuales presentaron un diagnóstico positivo para este padecimiento (Allsworth et al., 2007). De igual manera un estudio previo de Yen, et. al., (2003), encontraron que aproximadamente el 18% de las mujeres sin alguna experiencia sexual, presentaban un resultado positivo.

En relación con los signos y síntomas asociados, el flujo vaginal estuvo presente en el 75 % de los casos de VB, lo cual es inferior a lo reportado por Ortiz C. et al., (2000), quienes refieren el 94.6%; de igual manera Rojas T., et al., (2004), reportan la presencia del flujo vaginal con un 93.8 % de las pacientes.

En este estudio un 46% del grupo VB positivo presentó un pH de 5.0, el cual es mayor al 4.0-4.5 reportado ampliamente en la literatura (Livengood et al., 1990) como normal en una paciente sana. De igual manera es posible observar que cerca de un 84% del grupo sano (grupo 3), presentó un pH de 4.0, el cual se encuentra, como previamente se mencionó dentro del rango de un pH vaginal normal. Es importante considerar que la variación en el pH se puede producir por múltiples razones, por lo tanto, este signo por sí solo no es suficiente para efectuar el diagnóstico. Para la *prueba de Whiff* el 90% de la población del grupo VB+ (grupo 1) presentó una prueba positiva, esto se debe a que el olor aminado del flujo vaginal es uno de los indicadores más confiables para el diagnóstico de vaginosis bacteriana según los criterios de Amsel, et al., (1983).

Se distinguieron cuatro tipos de Comunidades de Microbioma catalogados como CST 1, 2 3 y 4. El perfil microbiano de estos grupos, coincide con al menos 2 de los catalogados por Ravel et al., 2010; grupo 1 dominados por especies de *Lactobacillus* y el grupo 4 dominado por multiples especies. Así también se encontró coincidencia en los hallazgos respectivos a los géneros *Atopobium, Prevotella, Megaesphera, Streptococcus y Snethia*, como fieles acompañantes de *Gardnerella* en su tendencia dominante sobre algunos tipos de comunidad.

CST 4 presentó una mayor frecuencia de asociación para el diagnóstico de VB. Sin embargo, diferente a lo esperado en cuanto a su relación con la respuesta inmune, CST4 no presentó diferencias significativas con otros grupos en cuanto a su relación con la producción de IL-8. Lo que podría sugerir que la producción de ciertas citocinas va más

allegada a otros factores como metabolitos, especies habitantes en particular y/o abundancias (cuantitativas) de dichas especies.

Es interesante recalcar una alta frecuencia de bacterias como *Gadnerella, Atopobium y Streptococcus* representan información de alto valor agregado al momento de su detección, ya que han sido previamente relacionados con problemas asociados a infección vaginal e infección perinatal.

Más aún, casos con Vaginosis Bacteria recurrente tienden a ser tratados continuamente con antibióticos. Estos pueden generar resistencia y repercutir gravemente en futuras etapas de vida reproductiva. Siendo el caso del *Streptococco*, en particular el del Grupo B, uno de los más notables por su afección al parto y al recién nacido (Nasioudis *et al.,* 2017).

Así también, la presencia de *Prevotella, Atopobium y Megasphaera* en nuestros resultados, ha sido previamente reportada para casos de VB; sospechando de una posible interacción sinergista con *Gardnerella* en el reemplazo de la dominancia de la microbiota lactobacilar. (Hardy *et al.,* 2016)

Se le ha llamado VB y no Vaginitis Bacteriana, dada la ausencia de inflamación localizada. Sin embargo múltiples estudios han demostrado un alza en las citocinas proinflamatorias (NAsiodus et al. 2017). Es sabido que *Atopobium vaginae* evoca una respuesta proinflamatoria mediante altos niveles de IL-1b, IL-6, IL-8 y TNF-a. *Prevotella,* por su parte, también ha sido asociada con un incremento en citocinas IL-1α, IL-1β, IL-8, and TNFα y en la producción de citocinas relacionadas a Th17 (IL-23 and IL-17) y Th1 (IL-12p70 e IFNγ) (Anahtar *et al*., 2015).

Nuestros resultados mostraron una marcada diferencia significativa entre grupos 1 y 3, para la citocina IL-8. Esto concuerda con los hallazgos por Hedges et al., 2006 y Marconi et al., 2014. Esta citocina es un potente atrayente quimiotactico, sin embargo no se encontró un alto conteo de neutrófilos. Una explicación parcial para esta aparente contradicción es que algunas bacterias de la VB podrían degradar la producción inducida de IL-1 o la liberación de IL-8 (Nasioudis *et al.,* 2017). Además bacterias de la VB liberan una mezcla de cadenas de ácidos grasos cortos, tales como ácido butírico y ácido succínico que modulan la

respuesta inmune afectando negativamente la quimiotaxis y actividad fagocítica de neutrófilos y monocitos.(Aldunate *et al.,* 2015)

Finalmente, estudios previos han demostrado que la cuantificación de las diferentes especies bacterianas encontradas en la flora vaginal correlaciona diferencialmente con niveles locales de IL-8 (Nikolaitchouk et al., 2008). Estudios de cuantificación tiempo real y de secuenciación, más profundos como la metagenómica tipo Shotgun, son necesarios para lograr una extensión de la identificación de la taxa hasta el nivel de especie, para casos de detección de bacterias comensales con factores de virulencia altos como lo es *Streptococcus*; y para establecer umbrales de abundancias que puedan estar relacionadas con los estados de salud, transición a la VB y estado de enfermedad.

12. CONCLUSIONES

- El análisis del Microbioma Vaginal cumple como un elemento confirmatorio, útil, complementario a los métodos de diagnóstico actuales; cuya función podría acercar al médico a un diagnóstico definitivo sobre la VB.
- Los géneros bacterianos presentes en los microbiomas de la población con VB estudiada, no distaron mucho de los encontrados en pacientes caucásicas, por lo que es posible que el rasgo étnico no esté relacionado al tipo de comunidad bacteriana.
- El análisis del Microbioma Vaginal mediante la secuenciación del 16S ARNr solo abarca hasta el nivel de género. Suficientes para obtener una clara lectura de las dominancias y abundancias relativas de la flora bacteriana presente en las muestras.
- La citocina IL-8 está relacionada con el grupo caracterizado por un diagnóstico de Vaginosis Bacteriana positivo, de la población estudiada.
- Contrario a lo esperado, no existieron diferencias significativas para citocinas proinflamatorias como IL-6 e IL-1b, que manifestaran una relación entre la vaginosis y una tendencia hacia la inflamación en la población estudiada.
- Los Tipos de Perfiles de Comunidad de los Microbiomas no expresaron relación alguna con los niveles de citocinas evaluados, para la población estudiada.
- La alta frecuencia de *Gardnerella* y *Atopobium* es aún notable y coincidente con estudios previos, mas no exhibe una relación significativa para la población estudiada.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anahtar, M. N. et al. Cervicovaginal Bacteria Are a Major Modulator of Host Inflammatory Responses in the Female Genital Tract. Immunity 42, 965–976 (2015).
- Aldunate M, Srbinovski D, Hearps AC, Latham CF, Ramsland PA, Gugasyan R, et al. Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. Front Physiol 2015;6:164
- Drell T, Lillsaar T, Tummeleht L, Simm J, Aaspõllu A. 2013. Characterization of the Vaginal Micro- and Mycobiome in Asymptomatic Reproductive- Age Estonian Women. PLoS ONE 8(1): e54379. doi:10.1371
- Fettweis, J. M., Serrano, M. G., Girerd, P. H., Jefferson, K. K., & Buck, G. A. 2012. A New Era of the Vaginal Microbiome: Advances Using Next‐Generation Sequencing. Chemistry & biodiversity, 9(5), 965-976.
- Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., & Knight, R. 2012. Defining the human microbiome. Nutrition reviews, 70(s1), S38-S44.
- 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;29:297–301.
- Cherpes, T. L., Hillier, S. L., Meyn, L. A., Busch, J. L., & Krohn, M. A. 2008. 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. Sexually transmitted diseases, 35(1), 78-83.
- Ryckman, K. K., Simhan, H. N., Krohn, M. A., & Williams, S. M. 2009. Predicting risk of bacterial vaginosis: the role of race, smoking and corticotropin-releasing hormone-related genes. Molecular human reproduction, 15(2), 131-137.
- Ness, R. B., Hillier, S. L., Richter, H. E., Soper, D. E., Stamm, C., McGregor, J., ... & Rice, P. 2002. Douching in relation to bacterial vaginosis, lactobacilli, and facultative bacteria in the vagina. Obstetrics & Gynecology, 100(4), 765-772.

- Marconi, C., Santos-Greatti, M.M., Parada, C.M., et al., 2014. Cervicovaginal levels of proinflammatory cytokines are increased during chlamydial infection in bacterial vaginosis but not in lactobacilli-dominated flora. J. Low. Genit. Tract. Dis. 18, 261–265
- Hawes, S. E., Hillier, S. L., Benedetti, J., Stevens, C. E., Koutsky, L. A., Wølner-Hanssen, P., & Holmes, K. K. 1996. Hydrogen peroxide—producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections. Journal of Infectious Diseases, 174(5), 1058-1063.
- Srinivasan S, Morgan MT, Liu C, Matsen FA, Hoffman NG, Fiedler TL, et al. More than meets the eye: association of vaginal bacteria with gram stain morphotypes using molecular phylogenetic analysis. PLoS ONE 2013;8:e78633
- Beigi, R. H., Wiesenfeld, H. C., Hillier, S. L., Straw, T., & Krohn, M. A. 2005. Factors associated with absence of H2O2-producing Lactobacillus among women with bacterial vaginosis. Journal of Infectious Diseases, 191(6), 924-929.
- Marrazzo, J. M., Koutsky, L. A., Eschenbach, D. A., Agnew, K., Stine, K., & Hillier, S. L. 2002. Characterization of vaginal flora and bacterial vaginosis in women who have sex with women. Journal of Infectious Diseases, 185(9), 1307-1313.
- Heinemann, C., & Reid, G. 2005. Vaginal microbial diversity among postmenopausal women with and without hormone replacement therapy. Canadian journal of microbiology, 51(9), 777-781.
- Pabich, W. L., Fihn, S. D., Stamm, W. E., Scholes, D., Boyko, E. J., & Gupta, K. 2003. Prevalence and determinants of vaginal flora alterations in postmenopausal women. Journal of Infectious Diseases, 188(7), 1054-1058.
- Wilson, J. D., Lee, R. A., Balen, A. H., & Rutherford, A. J. 2007. Bacterial vaginal flora in relation to changing oestrogen levels. International journal of STD & AIDS, 18(5), 308-311.
- Genc, M. R., & Onderdonk, A. 2011. Endogenous bacterial flora in pregnant women and the influence of maternal genetic variation. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 118(2), 154-163.

- Harwich, M. D., Alves, J. M., Buck, G. A., Strauss, J. F., Patterson, J. L., Oki, A. T & Jefferson, K. K. 2010. Drawing the line between commensal and pathogenic Gardnerella vaginalis through genome analysis and virulence studies. BMC genomics, 11(1), 375.
- Bradshaw, C. S., Morton, A. N., Hocking, J., Garland, S. M., Morris, M. B., Moss, L. M., ... & Fairley, C. K. 2006. High recurrence rates of bacterial vaginosis over the course of 12 months after oral metronidazole therapy and factors associated with recurrence. Journal of Infectious Diseases, 193(11), 1478-1486.
- Fredricks, D. N., Fiedler, T. L., & Marrazzo, J. M. 2005. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. New England Journal of Medicine, 353(18), 1899-1911.
- Ling, Z., Kong, J., Liu, F., Zhu, H., Chen, X., Wang, Y., ... & Xiang, C. 2010. Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. BMC genomics, 11(1), 488.
- Fredricks, D. N., Fiedler, T. L., Thomas, K. K., Mitchell, C. M., & Marrazzo, J. M. 2009. Changes in vaginal bacterial concentrations with intravaginal metronidazole therapy for bacterial vaginosis as assessed by quantitative PCR. Journal of clinical microbiology, 47(3), 721-726.
- Faro, S. 1995. Vaginitis: diagnosis and management. International journal of fertility and menopausal studies, 41(2), 115-123.
- Cutié Bressler, M. L., Almaguer Almaguer, J. A., & Álvarez Fiallo, M. 1999. Vaginosis bacteriana en edades tempranas. Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología, 25(3), 174-180.
- Peláez Mendoza, J. 1996. Consideraciones del uso de anticonceptivos en la adolescencia. Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología, 22(1), 0-0.
- Lamont, R. F., Sobel, J. D., Akins, R. A., Hassan, S. S., Chaiworapongsa, T., Kusanovic, J. P., & Romero, R. 2011. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 118(5), 533-549. Chicago

- Petrosino, J. F., Highlander, S., Luna, R. A., Gibbs, R. A., & Versalovic, J. 2009. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. Clinical chemistry, 55(5), 856-866.
- Sobel, J. D. 2005. What's new in bacterial vaginosis and trichomoniasis?. Infectious disease clinics of North America, 19(2), 387-406.
- Fettweis, J. M., Serrano, M. G., Sheth, N. U., Mayer, C. M., Glascock, A. L., Brooks, J. P., ... & Buck, G. A. 2012. Species-level classification of the vaginal microbiome. BMC genomics, 13(Suppl 8), S17.
- Morison, L., Ekpo, G., West, B., Demba, E., Mayaud, P., Coleman, R., ... & Walraven, G. 2005. Bacterial vaginosis in relation to menstrual cycle, menstrual protection method, and sexual intercourse in rural Gambian women. Sexually transmitted infections, 81(3), 242-247.
- Kornman, K. S., & Loesche, W. J. 1982. Effects of estradiol and progesterone on Bacteroides melaninogenicus and Bacteroides gingivalis. Infection and Immunity, 35(1), 256-263.
- Brabin, L. 2001. Hormonal markers of susceptibility to sexually transmitted infections: are we taking them seriously? BMJ 323:394-395.
- Ceruti, M., Canestrelli, M., Condemi, V., Piantelli, G., De Paolis, P., Amone, F. and Tovagliari, D. 1994 Methods of contraception and rates of genital infections. Clin Exp Obstet Gynecol, 21, 119-123.
- McGregor, J. A., French, J. I., Richter, R., Vuchetich, M., Bachus, V., Seo, K., ... & Todd, J. K. 1990. Cervicovaginal microflora and pregnancy outcome: results of a double-blind, placebo-controlled trial of erythromycin treatment. American journal of obstetrics and gynecology, 163(5), 1580-1591.
- Sonnex, C. 1998. Influence of ovarian hormones on urogenital infection. Sex Transm Infect, 74, 11-19.
- Fredricks, D. N., Fiedler, T. L., & Marrazzo, J. M. 2005. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. New England Journal of Medicine, 353(18), 1899-1911.
- Oakley, B. B., Fiedler, T. L., Marrazzo, J. M., & Fredricks, D. N. 2008. Diversity of human vaginal bacterial communities and associations with

clinically defined bacterial vaginosis. Applied and environmental microbiology, 74(15), 4898-4909.

- Stevens-Simon, C., Jamison, J., McGregor, J. A., & Douglas, J. M. 1994. Racial variation in vaginal pH among healthy sexually active adolescents. Sexually transmitted diseases, 21(3), 168-172.
- Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S., McCulle, S. L., ... & Forney, L. J. 2011. Vaginal microbiome of reproductive-age women. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(Supplement 1), 4680-4687.
- Fiscella, K., & Klebanoff, M. A. 2004. Are racial differences in vaginal pH explained by vaginal flora?. American journal of obstetrics and gynecology, 191(3), 747-750.
- Atashili, J., Poole, C., Ndumbe, P. M., Adimora, A. A., & Smith, J. S. 2008. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. AIDS (London, England), 22(12), 1493.
- Brotman, R. M., Ravel, J., Bavoil, P. M., Gravitt, P. E., & Ghanem, K. G. 2013. Microbiome, sex hormones, and immune responses in the reproductive tract: Challenges for vaccine development against sexually transmitted infections. Vaccine.
- Fredricks, D. N. 2011. Molecular methods to describe the spectrum and dynamics of the vaginal microbiota. Anaerobe, 17(4), 191-195.
- McCook, A. 2011. The vagina catalogues. Nature medicine, 17(7), 765-767.
- Handelsman, J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 68(4), 669-685.
- Pace, N. R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science, 276(5313), 734-740.
- Howe, L., Wiggins, R., Soothill, P. W., Millar, M. R., Horner, P. J., & Corfield, A. P. 1999. Mucinase and sialidase activity of the vaginal microflora: implications for the pathogenesis of preterm labour. International journal of STD & AIDS, 10(7), 442-447.

- Cauci, S., & Culhane, J. F. 2011. High sialidase *levels* increase preterm birth risk among women who are bacterial vaginosis–positive in early gestation. American journal of obstetrics and gynecology, 204(2), 142-e1.
- Cauci, S., McGregor, J., Thorsen, P., Grove, J., & Guaschino, S. 2005. Combination of vaginal pH with vaginal sialidase and prolidase activities for prediction of low birth weight and preterm birth. American journal of obstetrics and gynecology, 192(2), 489-496.
- Hardy L, Jespers V, Abdellati S, De Baetselier I, Mwambarangwe L,vMusengamana V, et al. A fruitful alliance: the synergy between Atopobiumvvaginae and Gardnerella vaginalis in bacterial vaginosis associated biofilm. Sex Transm Infect 2016;92:487e91.
- Nasioudis D, Linhares IM, Ledger WJ, Witkin SS. Bacterial vaginosis: a critical analysis of current knowledge. BJOG 2017;124: 61–69.

14. ANEXOS

14.1. ACTA DE COMITÉ DE ÉTICA DE PROYECTO APROBADO

UANL FAEN

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN □ FACULTAD DE ENFERMERÍA / Secretaría de Investigación

No. Registro: **FAEN-E-1179**

ACTA DE COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

"CONSORCIOS BACTERIANOS DEL MICROBIOMA VAGINAL: SU CARACTERISTIZACIÓN Y ANÁLISIS BAJO EL ENFOQUE METAGENÓMICO; Y EL ESTUDIO DE SU RELACIÓN CON LA RESPUESTA INFLAMATORIA VAGINAL"

INVESTIGADOR PRINCIPAL: **DRA. LYDIA GUADALUPE RIVERA MORALE**

COLABORADORES: **DRA. CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA, DRA. ROCIO ORTIZ LÓPEZ, DR. JOSÉ TIRÁN SAUCEDO, DRA. REBECA THELMA MARTÍNEZ VILLARREAL, LIC. GUSTAVO IZRAHÍ AMADOR PATIÑO, KAREN MUÑOZ GUTIÉRREZ**

El Comité de Ética en Investigación con registro en la Comisión Nacional de Bioética (CONBIOÉTICA) No. 19CEI02420141127, luego de revisar su trabajo de investigación decide **APROBARLO** en virtud de que incorporó las observaciones dictaminadas por esta comisión.

Atentamente

"Alere Flammam Veritatis"

Monterrey Nuevo León, 18 de Noviembre de 2015

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

Raquel Alicia Benavides Torres, PhD.
Presidente

SECRETARIA DE INVESTIGACION

Visión 2020 UANL
"Educación de clase mundial, un compromiso social"

1915 2015 CENTENARIO FAEN UANL

Ave. Gonzalitos No. 1500 nte. C.P., 64460
Monterrey, Nuevo León, México
Tel. 83481010 8333 41 90 exts. 104 y 107 / Fax: 83 48 11 07

14.2. FORMATO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Folio: _____

Título del proyecto de investigación:
"Metagenómica del microbioma vaginal y la respuesta inmune local en pacientes con vaginosis bacteriana."

Cuestionario para el paciente.

Por favor llene los siguientes datos personales:

Datos de la paciente:

Nombre:
Apellido Paterno _____ Apellido Materno_____ Nombres (s) _____

Edad: ____ años

¿Se encuentra afiliada a algún programa de salud IMSS o privado?_____ No. de Afiliación o Expediente: _____
Ocupación: _____ E**stado civil:** _____

Grupo sanguíneo (tipo de sangre): _____

Dirección:
Calle y
No._____Colonia_____ _____
Municipio_____
Estado_____
Número particular: _____ Celular: _____

ANTECEDENTES DE VIDA SEXUAL

1. ¿Ha tenido relaciones sexuales? SI__ NO__
   Si respondió afirmativamente la pregunta 1, responda las siguientes; si respondió negativamente pase a la siguiente hoja.
2. ¿De qué tipo? Heterosexual (con hombre) ☐ Homosexual (con mujer) ☐ Bisexual (con ambos) ☐
3. ¿A qué edad fue su primera relación sexual con penetración? _____ años.
4. ¿Cuántas parejas sexuales ha tenido durante TODA LA VIDA? _____. ¿Durante el ÚLTIMO AÑO? _____.

5. ACTUALMENTE ¿Tiene usted varias parejas sexuales? SÍ__ NO__. ¿Cuántas?_____.

6. En los últimos 6 meses ¿Ha comenzado recientemente con una NUEVA pareja sexual? SÍ___ NO___.

7. ¿Ha tenido relaciones sexuales en los últimos tres días? SÍ____ NO____.

8. ¿Está su pareja circuncidada? SÍ___ NO___.

9. ¿Utilizas condón durante la relación sexual? SÍ___ NO___.

10. ¿Utilizas algún gel o lubricante durante la relación sexual? SÍ___ NO___.

11. ¿Utiliza algún método de planificación? SÍ ___ NO___.

    - SI SU RESPUESTA ES AFIRMATIVA, POR FAVOR RESPONDA LO SIGUIENTE:
      ¿Ha utilizado anticonceptivos orales? SÍ___ NO___.
      Escriba el nombre de las píldoras anticonceptivas que ha utilizado durante el último año.
      _____
      _____

12. ¿Tiene hijos? SÍ___ NO___ ¿Cuántos?_____ ¿Parto natural o cesárea? (describir orden)
    _____

HÁBITOS:

13. ¿Fuma? SÍ___ NO___ ¿Cuántos cigarros al día?____.

14. ¿Consume bebidas alcohólicas? SÍ___ NO___. ¿Cuántas veces por semana? _____.

15. ¿En los últimos 4 meses ha tenido algún cambio dietario? SÍ___ NO___.

16. ¿Realizas algún deporte o ejercicio aeróbico? SÍ___ NO___. ¿Cuántas veces por semana? _____.

ANTECEDENTES GINECOBSTÉTRICOS:

	Si	No	¿Cuántas?
Padece o padeció infecciones urinarias			
Padece o padeció infecciones vaginales			

En caso de sospechar de infección vaginal:

17. ¿Tienes mal olor vaginal, a menudo como a pescado? SÍ___ NO___
18. ¿Tienes flujo vaginal poco espeso, de color blanco o gris? SÍ___ NO___

19. ¿El olor vaginal suele aumentar después del sexo? SÍ___ NO___
20. ¿Tienes sensación de picazón, ardor o dolor alrededor de la vagina? SÍ___ NO___
21. ¿Has sufrido anteriormente de infecciones vaginales? SÍ___ NO___
22. ¿Has tenido alguna otra ETS antes? SÍ___ NO___
23. ¿Sientes ardor o picor al orinar? SÍ___ NO___

Antecedentes de los padres			
	Diabetes tipo 2	Obesidad	Hipertensión arterial
En la madre			
En el padre			
En el Paciente			

HIGIENE VAGINAL:

	Si	No	¿Qué tan seguido?
Se baña diariamente			
Se lava los genitales diariamente			
¿Utilizas duchas vaginales en su limpieza?			
Se cambia la ropa interior diariamente			

CICLO MENSTRUAL:

Fecha de última menstruación: _____ Regular: ☐ Irregular: ☐

	Si	No	Frecuencia de cambio por día
Utiliza toallas sanitarias			
Utiliza tampones			
Utiliza ambos			
Posee DIU			

CUESTIONARIO DEL MÉDICO.

Características del flujo vaginal (en caso de presentar):

Flujo			
Abundante	**Escaso**	**Continuo**	**Discontinuo**

Consistencia			
Acuosa	**Viscosa**	**Mucoporulenta**	**Otra**

Color					
Transparente	**Blanco**	**Blanco lechoso**	**Rosado**	**Amarillo**	**Otro**

Presenta			
Dolor	**Picor**	**Ardor**	**Otro síntoma**

Olor	
Presente	**Ausente**

(**Fuente:** Chaudhary V, Prakesh V, Agarwal K, Singh A, Pandey A. 2012. Clinico-Microbiological Profile of Women with Vaginal Discharge in a Tertiary Care Hospital of Northern India. Int J Med Sci Public Health; 1:75-80.)

Observaciones_____
_____
_____
_____
_____
_____

Nombre del investigador

_____

14.3. HOJA DE DATOS DE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

Universidad Autónoma de Nuevo León.
Facultad de Ciencias Biológicas.
Laboratorio de Inmunología y Virología.

Iniciales de la paciente:_____
Numero de la muestra:_____

Examen en fresco:

1. **Células clave (células Guía):**

☐ Escasas ☐ Moderadas ☐ Abundantes ☐ No se observan

2. **Polimorfonucleares:**

☐ Escasas ☐ Moderadas ☐ Abundantes ☐ No se observan

3. **Levaduras:**

☐ Escasas ☐ Moderadas ☐ Abundantes ☐ No se observan

4. **Bacilos:**

☐ Escasas ☐ Moderadas ☐ Abundantes ☐ No se observan

5. **Bacterias diferente a bacilos:**

☐ Escasas ☐ Moderadas ☐ Abundantes ☐ No se observan

6. **Eritrocitos:**

☐ Escasas ☐ Moderadas ☐ Abundantes ☐ No se observan

7. **Trichomonas:**

☐ Escasas ☐ Moderadas ☐ Abundantes ☐ No se observan

Observaciones_____
_____
_____

14.4. HOJA DE DATOS DE OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA

Universidad Autónoma de Nuevo León.
Facultad de Ciencias Biológicas.
Laboratorio de Inmunología y Virología.

Paciente: _____
_____
No. de identificación: _____
Fecha: _____ Edad: _____
Centro de salud: _____
pH: _____
Aminas: _____