

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS  
“LUIS ENRIQUE TERRAZAS SILES”



Efecto antagonista probiótico contra *Gardnerella vaginalis*, aislada de muestras pertenecientes a mujeres con diagnóstico de Vaginosis Bacteriana, asistentes al Centro Departamental de Vigilancia Información y Referencia (CDVIR), La Paz-Bolivia

(Tesis presentada para obtener el grado de *Magister Scientiarum* en Ciencias Biológicas y Biomédicas, Mención Biotecnología)

Elaborado por: Lic. Freddy Chambi Chiri

LA PAZ - BOLIVIA

2018

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS  
“LUIS ENRIQUE TERRAZAS SILES”



Efecto antagonista probiótico contra *Gardnerella vaginalis*, aislada de muestras pertenecientes a mujeres con diagnóstico de Vaginosis Bacteriana, asistentes al Centro Departamental de Vigilancia Información y Referencia (CDVIR), La Paz-Bolivia

(Tesis presentada para obtener el grado de *Magister Scientiarum* en Ciencias Biológicas y Biomédicas, Mención Biotecnología)

Elaborado por: Lic. Freddy Chambi Chiri

Tutor(es): Carla Fabiana Crespo Melgar PhD  
María Teresa Álvarez Aliaga PhD

LA PAZ - BOLIVIA

2018

*Dedicatoria:*

*A mis padres Augusto y  
Zenobia por el amor incondicional*

*A mis hermanos,  
Quienes me apoyan y están  
pendientes de mis anhelos*

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

A mi tutora de Tesis, Carla Fabiana Crespo Melgar PhD, por su apoyo incondicional y haber creído en mi capacidad, por ayudarme en momentos difíciles, guiarme y aconsejarme. Gracias también, por el asesoramiento científico, y su dedicación en la realización de este trabajo, además, gracias, por depositar su confianza en mí, su apoyo fue de mucha importancia, sin la que no hubiera podido llevar a cabo la realización de mi Tesis de Maestría.

A mi tutora de Tesis, María Teresa Álvarez Aliaga PhD, su apoyo decidido en la realización de este trabajo, su conocimiento científico y haberme tenido paciencia. Gracias también, por brindarme la oportunidad de entrar a formar parte del Laboratorio de Biotecnología Industrial perteneciente al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB).

Al personal del Centro de Departamental de Vigilancia Información y Referencia (CDVIR), por brindar las muestras para el desarrollo del presente estudio.

A la cooperación sueca ASDI, por la financiación de la beca maestría.

A Marisol Llanos por su apoyo en la realización de la Tesis

A la familia Contreras; Justiniano, Yahnet, Gabriela y Alejandra por acogerme y pasar gratos momentos en mi estadía en La Paz.

A todos los que colaboraron de una u otra forma en el desarrollo de esta Tesis y en especial a todos mis compañeros del IIFB.

## RESUMEN

La Vaginosis Bacteriana (VB) es la afección más común en mujeres en edad fértil, caracterizada por el desequilibrio de la microbiota vaginal autóctona, debido al incremento en la población de *G. vaginalis* (uno de los principales agentes etiológicos), y la reducción de poblaciones del género *Lactobacillus*. El tratamiento de elección para VB es el metronidazol. Sin embargo, debido a la problemática actual de recurrencia de infecciones aunado a la resistencia a antimicrobianos, es de gran importancia, evaluar alternativas de tratamiento para reducir la incidencia de VB.

El presente estudio abordó la evaluación del efecto antagónico del probiótico *Lactobacillus casei sp.rhamnosus* LCR35 frente a cepas nativas de *G. vaginalis*, aisladas de mujeres en edad fértil asistentes al Centro Departamental de Vigilancia Información y Referencia La Paz-Bolivia (CDVIR). 54 cepas nativas de *G. vaginalis* fueron aisladas e identificadas, mediante pruebas bioquímicas, a partir de 150 muestras positivas a examen directo de VB.

La reducción de poblaciones de *G. vaginalis*, se evaluó en 4 escenarios de tratamiento para VB, que incluyen: efecto de metronidazol (Ensayo 1); efecto del probiótico LCR35 para la reducción de *G. vaginalis* sobreviviente a la exposición a metronidazol (Ensayo 2); efecto de LCR35 contra *G. vaginalis* como tratamiento alternativo a metronidazol (Ensayo 3) y tratamiento combinado simultaneo probiótico LCR35 y metronidazol contra *G. vaginalis* (Ensayo 4).

El Ensayo 1 demostró que la exposición a metronidazol durante 48 horas, no reduce completamente la dosis infectante de *G. vaginalis* (de  $3 \times 10^8$  ufc/mL a  $2,09 \times 10^6$  ufc/mL). LCR35 reduce completamente poblaciones *G. vaginalis*, sobrevivientes a metronidazol, después de 12 horas de co-cultivo (Ensayo 2). Se evidenció el efecto antagónico de LCR35, reduciendo totalmente *G. vaginalis*, a las 18 horas de co-cultivo (Ensayo 3). Asimismo, la reducción completa de *G. vaginalis* debido al efecto antagónico de LCR35 en presencia de metronidazol se registró a las 18 horas de co-cultivo (Ensayo 4). Por último, los 54 aislados nativos de *G. vaginalis* fueron sometidos al Ensayo 4, evidenciando que el total de poblaciones de *G. vaginalis*, fue reducido hasta las 18 horas de co-cultivo.

El presente trabajo demuestra que el tratamiento probiótico LCR35 en presencia de metronidazol, es eficaz para reducir completamente dosis infectantes de *G. vaginalis*. La dosis de LCR35 ( $6 \times 10^8$  ufc/mL) y su tiempo de acción *in vitro* (18 horas) constituyen una alternativa de

tratamiento para VB, y establecen la línea base para el desarrollo de un restaurador de microbiota vaginal.

**Palabras clave:** *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus casei* LCR35, efecto antagónico

## ABSTRACT

Bacterial Vaginosis (BV) is the most common vaginal infection affecting young women. BV is caused by a dysbiosis of the indigenous due to the increase of *G. vaginalis* populations and decrease of *Lactobacillus* populations. Metronidazole is used for the treatment of VB. However, due to the current problem of recurrent infections linked to antimicrobial resistance, alternative treatments for reducing BV are of great interest.

This study evaluate the antagonistic effect of *Lactobacillus casei sp. rhamnosus* LCR35 against native strains of *G. vaginalis* isolated from young women attending the Centro Departamental de Vigilancia Información y Referencia La Paz-Bolivia (CDVIR). 54 native *G. vaginalis* strains were isolated and identified by biochemical traits, from 150 positive samples to VB.

The reduction of *G. vaginalis* populations was evaluated under 4 scenarios of BV treatment: by the effect of metronidazole (assay 1); antagonistic effect of LCR35 on *G. vaginalis* previously exposed to metronidazole (assay 2); effect of LCR35 against *G. vaginalis* (assay 3); and combined treatment of LCR35 and metronidazole against *G. vaginalis* (assay 4).

Assay 1 showed that exposure to metronidazole for 48 hours does not reduce completely the infecting dose of *G. vaginalis* ( $3 \times 10^8$  cfu/mL to  $2,09 \times 10^6$  cfu/mL). LCR35 reduces completely *G. vaginalis* (previously exposed to metronidazole) after cultivation of 12 hours (assay 2). The results showed the antagonistic effect of LCR35 reducing completely *G. vaginalis*, after 18 hours of cultivation (assay 3). Additionally, the complete reduction of *G. vaginalis* populations by the effect of LCR35 and metronidazole was registered at 18 hours of cultivation (assay 4). Finally, the last experiment showed that all isolated native *G. vaginalis* populations subjected to assay 4, were reduced at 18 hours of cultivation.

This thesis validates that a treatment with the LCR35 and metronidazole assures the complete of infective doses of *G. vaginalis*. Dose of LCR35 ( $6 \times 10^8$  cfu/mL) and action time *in vitro* (18 hours) are parameters towards an alternative treatment of BV and the baseline to develop a restoring microbiota formulation.

**Keywords:** *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus casei* LCR35, antagonistic effect

## INDICE

1. Introducción .....	1
2. Antecedentes .....	2
2.1. La microbiota humana.....	3
2.2. La microbiota del aparato genitourinario .....	5
2.3. Microbiota vaginal normal .....	5
2.3.1. Variaciones del microbiota vaginal en la mujer.....	7
2.4. Microbiota vaginal anormal .....	8
2.4.1. Vulvovaginitis candidiásica .....	8
2.4.2. Tricomoniasis .....	8
2.4.3. Vaginosis bacteriana .....	9
2.5. <i>Gardnerella vaginalis</i> principal agente etiológico de VB .....	11
2.5.1. Taxonomía, estructura y composición .....	11
2.5.2. Mecanismos de patogenia .....	12
2.5.3. Aislamiento e identificación de <i>G. vaginalis</i> .....	13
2.6. Bacterias ácido lácticas .....	14
2.6.1. Clasificación de las bacterias ácido lácticas.....	15
2.6.2. Género <i>Lactobacillus</i> .....	15
2.6.2.1. Grupo I: <i>Lactobacillus</i> homofermentativos estrictos .....	15
2.6.2.2. Grupo II: <i>Lactobacillus</i> homofermentativos facultativas .....	16
2.6.2.3. Grupo III: <i>Lactobacillus</i> heterofacultativas estrictas .....	16
2.6.3. Género <i>Bifidobacterium</i> .....	16
2.6.4. Roles y aplicaciones de los probióticos .....	18
3. Justificación.....	19
4. Objetivos .....	21
4. 1. Objetivo general .....	21
4.2. Objetivos específicos .....	21
5. Metodología .....	22
5.1. Aislamiento y caracterización de cepas de <i>G. vaginalis</i> .....	24
5.1.1. Recolección y transporte de muestras positivas a Vaginosis Bacteriana (VB).....	25
5.1.2. Aislamiento de <i>G. vaginalis</i> .....	25

5.1.3. Caracterización de <i>G. vaginalis</i> .....	25
5.1.4. Criopreservación de cepas de <i>G. vaginalis</i> .....	26
5.2. Evaluación de Cepas Probióticas .....	27
5.2.1. Activación de cepas probióticas .....	27
5.2.2. Criopreservación de cepas probióticas .....	27
5.3. Evaluación de la actividad antagónica de cepas probióticas frente a <i>G. vaginalis</i> por co-cultivo en medio sólido .....	28
5.3.1. Evaluación de medios para el co-cultivo en placa de cepas probióticas y <i>G. vaginalis</i> ....	28
5.3.2. Evaluación semicuantitativa de la actividad antagónica de cepas probióticas frente a <i>G. vaginalis</i> por co-cultivo en medio sólido .....	28
5.4. Evaluación in vitro del crecimiento de <i>G. vaginalis</i> y <i>L. casei rhamnosus</i> LCR35 .....	29
5.4.1. Estandarización de la población de <i>G. vaginalis</i> y LCR35 en función al número de células viables .....	29
5.4.2. Susceptibilidad antimicrobiana de <i>G. vaginalis</i> y LCR35 .....	30
5.4.3. Evaluación de medio selectivo para <i>G. vaginalis</i> .....	30
5.5. Ensayos cuantitativos de actividad antagónica de LCR35 in vitro contra <i>G. vaginalis</i> .....	31
5.5.1. Evaluación del crecimiento de <i>G. vaginalis</i> expuesta a metronidazol (Ensayo 1) .....	31
5.5.2. Evaluación de la actividad antagónica de LCR35 contra <i>G. vaginalis</i> sobreviviente de la exposición a metronidazol (Ensayo 2) .....	32
5.5.3. Evaluación de la actividad antagónica de LCR35 contra <i>G. vaginalis</i> (Ensayo 3).....	32
5.5.4. Evaluación de la actividad antagónica de LCR35 contra <i>G. vaginalis</i> en presencia de metronidazol (Ensayo 4).....	33
5.5.5. Evaluación del efecto antagónico de LCR35 frente al banco de cepas <i>G. vaginalis</i> nativas, en presencia de metronidazol .....	33
6. Resultados y discusiones.....	33
6.1. <i>Gardnerella vaginalis</i> proveniente de muestras infecciosas.....	33
6.1.1. Aislados bacterianos identificados como <i>Gardnerella vaginalis</i> .....	35
6.2. Cepas Probióticas .....	36
6.3. Actividad antagónica de cepas probióticas frente a <i>G. vaginalis</i> por co-cultivo en medio sólido .....	38
6.3.1. Medio óptimo para el co-cultivo en placa de cepas probióticas y <i>G. vaginalis</i> .....	38

6.3.2. Inhibición de <i>G. vaginalis</i> en placa y selección de cepas probióticas .....	39
6.4. Relación entre la viabilidad de LCR35, <i>G. vaginalis</i> y su medida turbidimétrica.....	43
6.5. Perfil de sensibilidad/resistencia a antimicrobianos.....	45
6.6. Reducción de poblaciones nativas de <i>Gardnerella vaginalis</i> bajo diferentes escenarios .....	49
6.7.1. Efecto del metronidazol frente a <i>G. vaginalis</i> (Ensayo 1) .....	50
6.7.2. Efecto antagónico de LCR35 contra <i>G. vaginalis</i> sobrevivientes a metronidazol (Ensayo 2).....	52
6.7.3. Efecto antagónico de LCR35 contra <i>G. vaginalis</i> (Ensayo 3) .....	53
6.7.4. Efecto antagónico de LCR35 contra <i>G. vaginalis</i> en presencia de metronidazol (Ensayo 4).....	57
6.7.5. Efecto antagónico de LCR35 frente al banco de cepas nativas de <i>G. vaginalis</i> en presencia de metronidazol .....	59
7. Conclusiones .....	61
8. Bibliografía .....	63
Anexos.....	76

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Diversidad Taxonómica de Microorganismos que Pertenecen a la Autóctona</i> .....	4
Tabla 2 <i>Géneros de Microorganismos que se Encuentran en la Vagina de Mujeres Sanas</i> .....	6
Tabla 3 <i>Historia de la Nomenclatura de la Vaginosis Bacteriana</i> .....	10
Tabla 4 <i>Características Bioquímicas para la identificación de G. vaginalis</i> .....	14
Tabla 5 <i>Taxonomía del Género Bifidobacterium</i> .....	17
Tabla 6 <i>Muestras Colectadas del Laboratorio Clínico del CDVIR entre los Meses Marzo hasta Agosto del 2016</i> .....	35
Tabla 7 <i>Características Bioquímicas de los Morfotipos de G. vaginalis Aislados</i> .....	36
Tabla 8 <i>Características Macroscópicas y Microscópicas de Cepas Probióticas</i> .....	37
Tabla 9 <i>Viabilidad Celular, Tamaño de las Colonias, de Cepas Probióticas y G. vaginalis en los Medios de Cultivo TSA+S, TSA+S+G y MRS</i> .....	39
Tabla 10 <i>Perfil de Sensibilidad/Resistencia de LCR35 y G. vaginalis</i> .....	46
Tabla 11 <i>Viabilidad de LCR35 y G. vaginalis en TSA+S+G Suplementado con Diferentes Concentraciones de Neomicina</i> .....	49

## INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Fluctuaciones de la microbiota vaginal en función de los cambios fisiológicos que aparecen en las distintas etapas de la mujer.</i> .....	7
<i>Figura 2. Concentración de Lactobacillus sp. y G. vaginalis en mujeres sanas (VB-) y con VB (+).</i> .....	40
<i>Figura 3. Efecto antagonista en placa de las cepas probióticas B. animalis subsp. lactis DSM-10140 (G), (M), (P) frente a G. vaginalis (cepa 11307).</i> .....	41
<i>Figura 4. Efecto antagonista en placa de las cepas probióticas LCR35 y L. acidophilus DSM-20079</i> .....	41
<i>Figura 5. Efecto antagónico generado por las cepas probióticas frente a G. vaginalis en co-cultivo en placa.</i> .....	42
<i>Figura 6. Correlación entre la densidad óptica en función a las ufc/mL de la cepa 11307 de G. vaginalis y LCR35.</i> .....	44
<i>Figura 7. (A) Sensibilidad de LCR35 a neomicina (30µg), (B) Resistencia de G. vaginalis a neomicina (30µg).</i> .....	48
<i>Figura 8. Reducción de la población G. vaginalis en función al tiempo de exposición a metronidazol (50µg/mL).</i> .....	51
<i>Figura 9. Efecto de LCR35 en la viabilidad de G. vaginalis sobrevivientes a metronidazol, en función al tiempo de co-cultivo.</i> .....	53
<i>Figura 10. Efecto de LCR35 en la viabilidad de G. vaginalis, en función al tiempo de co-cultivo. G. vaginalis se incubo con y sin LCR35 durante 48 horas en microaerofilia.</i> .....	56
<i>Figura 11. Efecto de LCR35 y metronidazol (50µg/mL) sobre la viabilidad de G. vaginalis, en función al tiempo de co-cultivo.</i> .....	59
<i>Figura 12. Efecto de LCR35 y metronidazol (50µg/mL) sobre la viabilidad de G. vaginalis, en función al tiempo de co-cultivo.</i> .....	61

## ABREVIATURAS

‰: Porcentaje

°C: Grados Centígrados

≤: Menor o igual que

≥: Mayor o igual que

mL: Mililitros

μL: Microlitros

mm: Milímetros

nm: Nanómetros

mg: Miligramos

BBS: Solución amortiguadora (buffer) de fosfatos equilibrada

CDVIR: Centro Departamental de Vigilancia Información y Referencia

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CO<sub>2</sub>: Dióxido de Carbono

IIFB: Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas

DO: Densidad óptica

PBS: Solución Tampón Fosfato-Salino

rpm: Revoluciones por minuto

SPS: Polianetol Sulfato de Sodio

TSA+S: Agar Soya Triptona suplementado con sangre humana al 5 %

TSA+S+G: Agar Soya Triptona suplementada con sangre humana al 5 % y 20 g/L de glucosa

TSA+S+G+N: Agar Soya Triptona suplementada con sangre humana al 5 %, 20 g/L de glucosa y 0.025 mg/mL de neomicina

TSC+G: Caldo Soya Triptona suplementada con 20 g/L de glucosa

ufc: unidades formadoras de colonia

VB: Vaginosis Bacteriana

UI: Unidades Internacionales

# **Efecto antagonista probiótico contra *Gardnerella vaginalis*, aislada de muestras pertenecientes a mujeres con diagnóstico de Vaginosis Bacteriana, asistentes al Centro Departamental de Vigilancia Información y Referencia (CDVIR) La Paz-Bolivia**

## **1. Introducción**

La presente tesis es una investigación que tiene por objetivo evaluar el efecto antagonista de diferentes probióticos, pertenecientes al banco de cepas del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB) y seleccionar la cepa que presente mayor efecto frente *Gardnerella vaginalis*, aisladas de muestras pertenecientes a mujeres con diagnóstico de Vaginosis Bacteriana (VB) provenientes del laboratorio clínico del Centro Departamental de Vigilancia Información y Referencia (CDVIR), La Paz-Bolivia.

Existen varias razones para estudiar el efecto antagónico de los probióticos frente a diferentes microorganismos oportunistas y/o patógenos. El incremento de resistencia a los antimicrobianos (Tomusiak, Strus, & Heczko, 2011), las reacciones adversas que provocan los fármacos (Vicente & Pérez-Trallero, 2009), entre otros, generan la necesidad de buscar nuevas alternativas para tratar, mitigar o controlar las diferentes patologías de origen infeccioso, por ejemplo la (VB), que afecta a una población vulnerable de amplio rango (mujeres en edad fértil de 18 a 45 años de edad, aproximadamente), además de contraer otros factores de riesgo muy complicados cuando no se diagnostica y se trata adecuadamente por el personal de salud.

El trabajo experimental, fue dividido en cinco fases, en la primera, se llevó a cabo una colecta de muestras pertenecientes a mujeres en edad fértil con diagnóstico positivo a VB del CDVIR, de las cuales se aislaron e identificaron, por pruebas bioquímicas, cepas nativas de *G. vaginalis*. En la segunda fase, se evaluaron las cepas probióticas con efecto antagónico. En la tercera fase, se evaluó, la actividad antagónica de las cepas probióticas contra *G. vaginalis* por co-cultivo en medio sólido, donde fue seleccionada la cepa probiótica con mayor efecto antagonista. La cuarta fase, consistió en estandarizar poblaciones bacterianas de *G. vaginalis* y LCR35 (probiótico con mayor efecto antagónico), en función al número de células viables, además, se determinó el perfil de sensibilidad a antimicrobianos, con la finalidad de seleccionar un antibiótico para suplementar en medio TSA+S+G, para inhibir el desarrollo de LCR35 y permitir el crecimiento de *G. vaginalis*. Y en la fase final, se evaluó la reducción de la población de *G. vaginalis* en cuatro escenarios: Por efecto del metronidazol (tratamiento habitual en caso

de VB, Ensayo 1), efecto del probiótico seleccionado en la reducción de la población de *G. vaginalis* sobreviviente a metronidazol (Ensayo 2), efecto del probiótico seleccionado contra *G. vaginalis* (tratamiento alternativo al metronidazol en caso de VB, Ensayo 3) y efecto del probiótico seleccionado contra *G. vaginalis* en presencia de metronidazol (tratamiento combinado simultaneo probiótico y metronidazol, Ensayo 4). Por último, se evaluó el efecto antagónico combinado del probiótico y metronidazol sobre el banco de 54 cepas nativas de *G. vaginalis*.

En concreto, la investigación soporta evidencia científica para la utilización de los probióticos como tratamiento alternativo de la VB causada por *G. vaginalis*. Sobre esta línea base, se prospecta la formulación de un restaurador de microbiota vaginal efectivo en nuestro medio, promocionando la inclusión de los probióticos como parte del tratamiento de elección.

## **2. Antecedentes**

En diciembre de 1983, se estudió el efecto del metronidazol sobre la vaginosis anaerobia o vaginitis no específica (actualmente VB) utilizándose un estudio doble ciego y controlado con placebo, donde se concluyó que, la vaginosis específica es una infección mixta donde están presentes *G. vaginalis* y otros microorganismos anaerobios. Por otro lado, el diagnóstico fiable de VB se basa en la visualización de células clave en la tinción de Gram, donde el tratamiento con metronidazol durante siete días elimina y cura la vaginosis anaerobia (Blackwell, Phillips, Fox, & Barlow, 1983). Además, en diciembre de 1995, se aislaron cepas de lactobacilos de mujeres sanas y cepas de *G. vaginalis* de mujeres con sospecha de VB, enfrentando las cepas mediante el método de superposición y difusión de pozos, también, trataron de definir y cuantificar la naturaleza de la sustancia inhibitoria. Todas las cepas aisladas de lactobacilos inhibieron el crecimiento de *G. vaginalis*, asimismo, se observó que el pH bajo y el ácido láctico son factores muy importantes para la inhibición de *G. vaginalis* (McLean & McGroarty, 1996).

El metronidazol es el tratamiento de elección en mujeres no gestantes, sin embargo, adicionalmente se investigaron las ventajas de administrar a largo plazo el probiótico *L. rhamnosus* después del tratamiento oral con metronidazol para prevenir la recurrencia de VB (Marcone, Rocca, Lichtner, & Ettore, 2010). De ahí, un total de 49 mujeres con diagnóstico de VB fueron divididas al azar en dos grupos (A y B), se les administró 500 mg de metronidazol a ambos grupos durante siete días, pero solo el grupo B se le administró, además, 40 mg de *L.*

*rhamnosus* una vez a la semana durante seis meses. Los resultados mostraron que los pacientes del grupo “B” durante 12 meses contaban con un ecosistema vaginal equilibrado a diferencia el grupo “A” que aumentó el número de mujeres con ecosistema vaginal en desequilibrio con recurrencia de VB, se concluyó que la administración del probiótico *L. rhamnosus*, estabiliza el ecosistema vaginal y reduce la recurrencia de VB.

Otra investigación reporta la evaluación de 135 cepas de lactobacilos vaginales por el fragmento 16S del ARN ribosomal comparando su potencial probiótico, evidenciando la actividad antagonista probiótica contra *E. coli*, *C. albicans*, *C. glabrata* y *G. vaginalis* (Hütt, y otros, 2016). Por último, un estudio demostró la capacidad de *L. fermentum* LF5 para inhibir *in vitro* a diferentes especies de *Candida* y *G. vaginalis*. Los resultados muestran que existe una reducción significativa de la población de cinco especies de *Candida*, además, se reportó la inhibición del 80% de *G. vaginalis*, concluyendo que dicha cepa probiótica trata eficazmente las infecciones mixtas (Deidda, y otros, 2016).

## **2.1. La microbiota humana**

Theodor Escherich en la década de 1880 estudió la relación entre la digestión y las heces fecales. Más tarde, Albert Döderlein en 1892 reveló la protección que brindan los lactobacilos en la mucosa vaginal (Suárez, 2015). La presencia de microorganismos en los epitelios no ocurre de forma espontánea, el feto dentro del útero es estéril, y durante el nacimiento entra en contacto con la microbiota vaginal de la madre y del entorno que lo rodea (Martínez, Castro, & Aguilera, 2012), en el infante existe una predominancia de bacterias ácido lácticas y coliformes (Berg, 1996).

Existen regiones determinadas del organismo donde se alojan microorganismos autóctonos desempeñando una función en los diferentes nichos (Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos, 2016). El conjunto de microorganismos que recubren la epidermis y las mucosas de todo el cuerpo cumplen una función vital para mantener la homeostasis, hasta tal punto que sería imposible el desarrollo de la vida en ausencia de los microorganismos pertenecientes a la microbiota humana, coexisten pacíficamente en un buen ejemplo de mutualismo que beneficia a ambos, pero en caso de una disfunción del sistema inmunitario, la relación puede convertirse en parasitaria (Suárez, 2015). Los sistemas inmunes, innatos y adaptativos, evolucionaron para reconocer bacterias que cumplen una función benéfica en la

regulación del desarrollo intestinal y eliminar a patógenos específicos (Macpherson & Nicola, 2004).

En los tiempos actuales, dentro del contexto de las enfermedades infecciosas, los postulados de Koch no siempre logran cumplirse, por el hecho de que están involucrados varios microorganismos (enfermedades polimicrobianas), como por ejemplo las enfermedades periodontales, infecciones oportunistas, Síndrome de inmunodeficiencia Adquirida y enfermedades respiratorias (Proctor, 2016). Muchas de las enfermedades polimicrobianas son provocadas por microorganismos oportunistas que forman parte de la microbiota autóctona. Los microorganismos oportunistas, normalmente no son patógenos, pero pueden provocar una infección cuando las defensas del hospedero están disminuidas o como resultado de factores iatrogénicos o nosocomiales (Clínica Universidad de Navarra, 2016). La variedad de las comunidades microbianas que pertenecen a la microbiota autóctona se ilustra en la Tabla 1, sus genes, genomas y su metabolismo colectivo tienen una coevolución con la especie homínida; estos interactúan entre sí y con el huésped humano (Proctor, 2016).

**Tabla 1**

*Diversidad Taxonómica de Microorganismos que Pertenecen a la Autóctona*

<i>Domínio</i>	<i>Reino</i>	<i>Filo</i>	<i>Clase</i>	<i>Ejemplo</i>	
Archaea	Archaea	A.II. Euryarcheota	Methanobacteria	Metanógenos intestinales	
			B.XII. Proteobacteria	Gamma proteobacteria	<i>Escherichia</i> (intestino grueso)
Bacteria	Bacteria	B.XIII. Firmicutes	Epsilon proteobacteria	<i>Helicobacter</i> (estómago)	
			Clostridia	<i>Lachnospira</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Roseburia</i> (intestino grueso)	
			Bacilli	<i>Lactobacillus</i> (vagina, intestino delgado), <i>Staphylococcus</i> (piel), <i>Streptococcus</i> (boca)	
			B.XIV. Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Bifidobacterium</i> (intestino grueso), <i>Propionibacterium</i> (piel, intestino grueso), <i>Corynebacterium</i> (piel), <i>Gardnerella</i> (vagina)
			B. XX. Bacteroidetes	Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i> (intestino grueso)
Eukaryota	Protista	Protozoa	Rhizopoda	Amebas comensales (boca, intestino)	
			Mastigophora	<i>Giardia</i> (duodeno)	
	Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	<i>Candida</i> (vagina, boca, intestino grueso)	
		Basidiomycota	Exobasidiomycetes	<i>Malassezia</i> (piel)	
Animalia	Arthropoda	Arachnida	<i>Demodex</i> (ácaros de la piel)		

*Nota.* Recuperado de Suárez (2015)

## **2.2. La microbiota del aparato genitourinario**

Los órganos que constituyen el aparato genitourinario son los órganos urinarios y reproductores, los cuales se tratan por separado a pesar de su proximidad anatómica, debido a que cumplen funciones muy distintas como ser: excreciones de residuos metabólicos y reproducción (John L. Ingraham, 1998).

- Hombre. - el conducto urinario y genital concuerdan en la uretra, con dos implicaciones, primero que existe un lavado de la uretra por la orina habitualmente, lo que dificulta la colonización de microorganismos en el riñón y vejiga. Segundo, el orificio anal, principal foco de infección, está muy separado de del aparato urinario. Lo anteriormente expuesto indica que una infección urinaria en hombres es muy atípica salvo situaciones preponderantes como el uso de pañales (Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos, 2016).
- Mujer. - debido a la disposición anatómica, el conducto urinario y genital no concuerdan, esto indica que la orina no lavará la vagina periódicamente existiendo un asentamiento estable de una microbiota sobre la mucosa vaginal, bajo ese entendido está claro que también será susceptible a infecciones por microorganismos patógenos oportunistas. También el orificio anal está muy cercano a la vulva vaginal, unido por un surco que contribuirá a ser un foco de infección que es rico en nutrientes, humedad y templado, lo que predispone a la infección por bacterias entéricas. Otro punto que se tiene que tener en cuenta, es que la colonización de microorganismos hacia la vejiga es más factible por el tramo corto de la uretra, desencadenando cistitis pudiendo complicarse a cuadros de pielonefritis y otras afecciones renales (Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos, 2016).

## **2.3. Microbiota vaginal normal**

Actualmente recién se está consiguiendo percibir lo complejo, dinámico y lo abundante de las poblaciones microbianas de la vagina y su relación en la salud de la mujer (White, Creedon, Nelson, & Wilson, 2011).

Las comunidades microbianas vaginales desarrollan un papel fundamental en la promoción de la homeostasis, además, de brindar una protección contra microorganismos

patógenos, actualmente los mecanismos por los que ejercen su influencia no están esclarecidos por completo (Huang, Fettweis, Brooks, Jefferson, & Buck, 2014). En la Tabla 2, se muestra microorganismos que se encuentran en la vagina de mujeres sanas. Varios de estos microorganismos forman parte del tracto entérico, pero las frecuencias relativas son distintas en las encontradas en la porción final del tubo digestivo (Martín, Soberóna, Vázquez, & Suárez, 2008).

La mucosa vaginal no posee glándulas, sin embargo, está recubierta por una secreción mucosa propia del epitelio y del cuello uterino, muy rica en glucosa y aminoácidos que facilitan la proliferación de la microbiota autóctona (Álvarez-Calatayud, Suárez, Rodríguez, & Pérez-Moreno, 2015). Las condiciones mejoran con los estrógenos y progesterona, el estrógeno favorece la proliferación del epitelio vaginal y la formación de glucógeno intraepitelial. Por otro lado, la progesterona ayuda en la citólisis de las células epiteliales que liberan el glucógeno. Los lactobacilos son capaces de metabolizar el glucógeno, glucosa, maltosa y producen ácido láctico que regula el pH ácido vaginal de 3,8 a 4,4 aproximadamente; factor que es considerado como un sello distintivo de salud vaginal (Mendling, 2016).

**Tabla 2**

*Géneros de Microorganismos que se Encuentran en la Vagina de Mujeres Sanas*

<b>Cocos y bacilos grampositivos anaerobios aerotolerantes</b>	<i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i>
<b>Cocos y bacilos grampositivos anaerobios facultativos</b>	<i>Corynebacterium</i> <i>Gardnerella</i> <i>Staphylococcus</i> (fundamentalmente <i>S. epidermidis</i> )
<b>Bacilos gramnegativos anaerobios facultativos</b>	<i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Proteus</i>
<b>Micoplasmas</b>	<i>Mycoplasma</i> (sobre todo <i>M. hominis</i> ) <i>Ureaplasma</i>
<b>Bacilos y cocos grampositivos anaerobios estrictos</b>	<i>Atopobium</i> <i>Peptococcus</i> <i>Peptostreptococcus</i> <i>Clostridium</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Propionibacterium</i> <i>Eubacterium</i>
<b>Bacilos gramnegativos anaerobios estrictos</b>	<i>Bacteroides</i> <i>Prevotella</i>

*Nota.* Recuperado de Martín, Soberóna, Vázquez, & Suárez (2008)

### 2.3.1. Variaciones de la microbiota vaginal en la mujer

Durante diferentes etapas de la vida, la vagina femenina está regulada por la actividad endocrina, que influye en la colonización por diferentes microorganismos (Figura 1). La microbiota vaginal se establece desde el nacimiento, cuando el neonato paso por el canal del parto, se transfiere microbiota de la madre a la hija (Martínez, Castro, & Aguilera, 2012). El sistema endocrino está en reposo en las niñas que tendrán su primera menstruación, los nutrientes son mínimos y presenta una mucosa poco húmeda y delgada, los microorganismos que habitan en esta etapa serán los que están presentes en la piel y el intestino. En mujeres que atraviesan la pubertad, el sistema endocrino se activa segregando estrógeno que favorece al aumento de grosor de la mucosa vaginal y la secreción de un exudado rico en nutrientes que propicia la colonización de lactobacilos. Durante el embarazo existe, un incremento en la población de lactobacilos, en consecuencia, una disminución del pH vaginal, que protege la mucosa vaginal (Álvarez-Calatayud, Suárez, Rodríguez, & Pérez-Moreno, 2015). Así mismo, se presenta una inmunosupresión, con liberación de mediadores antiinflamatorios y concomitantemente una disminución de mediadores proinflamatorios, esta modulación descendente de la respuesta inmune a los microorganismos, es vital durante la gestación (Ramos, Kanninen, Sisti, & Witkin, 2015). Cuando se atraviesa la menopausia los niveles de estrógeno disminuyen gradualmente, por consecuencia también disminuye el glucógeno en las células epiteliales vaginales, la disminución del exudado vaginal y la disminución de las poblaciones microbianas (Hillier & Lau, 1997).

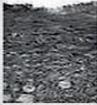
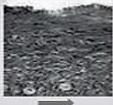
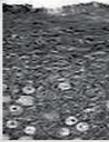
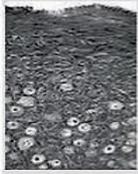
	NEONATA	1 MES	PUBERTAD	MADUREZ SEXUAL	EMBARAZO	MENOPAUSIA
ESTRÓGENOS	++	—	+	++	+++	—
EPITELIO						
GLUCÓGENO	+	—	—+	+	++	—
pH	4-5	7	7-5	4-5	3,5-4,5	6-7
MICROBIOTA	Estéril <i>Lactobacillus</i>	Escaso	Mixto	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>	Mixto

Figura 1. Fluctuaciones de la microbiota vaginal en función de los cambios fisiológicos que aparecen en las distintas etapas de la mujer. Recuperado de Álvarez-Calatayud, Suárez, Rodríguez, & Pérez-Moreno (2015)

## **2.4. Microbiota vaginal anormal**

Existen distintos factores físicos, químicos y mecánicos (Martínez, Castro, & Aguilera, 2012); además de interferencias externas como ser: higiene vaginal, relaciones sexuales con múltiples parejas, terapia hormonal y antibióticos, que alteran la homeostasis dentro la cavidad vaginal, que conducen a desequilibrios microbianos o disbiosis, provocando diversas enfermedades. Ahora bien, los microorganismos que normalmente pertenecen a la microbiota autóctona (Tabla 1) como por ejemplo: *G. vaginalis*, *C. albicans*; en determinadas circunstancias pueden proliferar causando patogenicidad, si las condiciones son favorables para su colonización (Huang, Fettweis, Brooks, Jefferson, & Buck, 2014). A continuación se describen las enfermedades caracterizadas por el desequilibrio o disbiosis vaginal.

### **2.4.1. Vulvovaginitis candidiásica**

JS Wilkinson en 1949, estableció la relación de vaginitis con levaduras en la vagina, debido a que no todas las vaginitis son causadas por las especies del género *Candida*, actualmente se denomina vulvovaginitis micótica (Barrenetxea, 2002). En ginecología *C. albicans* es la especie oportunista patógena diagnosticada (Sobel J. , 1996). Un factor para la patogénesis es la adhesión de esporas, por un ambiente hiperestrogénico, por lo tanto, en estadios de premenarquia y postmenopausia (ambiente hipoestrogénico) las infecciones por *C. albicans* es menos habitual. Otro factor que inhibe la adhesión de *C. albicans* son los lactobacilos de la microbiota vaginal, una espora es incapaz de penetrar el epitelio vaginal, para ello es necesario la germinación, desarrollo de hifas y micelios, una vez formada dichas estructuras, *C. albicans* logra invadir y penetrar el epitelio vaginal, causando la vulvovaginitis, ocasionando leucorrea, eritema y edema (Barrenetxea, 2002). El clotrimazol es el fármaco de elección para el tratamiento de vulvovaginitis candidiásica, en una dosis de 100 mg cada noche durante 7 días (Ergueta, Evia, & Santivañez, 2012).

### **2.4.2. Tricomoniasis**

La tricomoniasis se desarrolla por la presencia del protozoo flagelado *Trichomonas vaginalis*, en el tracto urogenital del hombre y de la mujer, es una infección de transmisión sexual (ITS) a diferencia de la vulvovaginitis candidiásica (Cadena, Miranda, & Calderón, 2006). En la superficie de la membrana de *T. vaginalis* existe N-acetilglucosamina y alfa D-manosa, que facilitan la adherencia al epitelio uretral y vaginal. (Arroyo & Alderete, 1995), los eritrocitos

proveen los lípidos y la producción de proteasas regulada por el ion hierro. Existe una infiltración de polimorfonucleares y neutrófilos cuando los parásitos se multiplican en la vagina (Carrada-Bravo, 2006).

Las manifestaciones clínicas en el sexo masculino pueden provocar uretritis, prostatitis irritativas o ser asintomáticas. A diferencia del sexo femenino donde los síntomas que presenta son: prurito vulvar, ardor irritación genital dolorosa hasta provocar dispareunia y una leucorrea de color amarillento verdoso o gris de olor marcado o inodora (Cadena, Miranda, & Calderón, 2006). La tricomoniasis se trata con óvulos de 500 mg de metronidazol, durante 10 días (Ergueta, Evia, & Santivañez, 2012).

### **2.4.3. Vaginosis bacteriana**

Gardner (1983), estableció la relación de *Haemophilus vaginalis* (al momento denominada *Gardnerella*), con una condición previamente clasificada como vaginitis inespecífica actualmente llamada vaginosis bacteriana (VB) (Csángó, 1982). Dado que vaginosis describe una condición de vagina enferma o anormal, dicho agente etiológico rara vez provoca un cambio histológico, reacción inflamatoria o irritaciones; a diferencia de vaginitis que tiene una connotación de inflamación, síntomas desagradables y alteraciones anormales.

La VB es un síndrome polimicrobiano que afecta frecuentemente a mujeres en edad fértil, donde existe un reemplazo de *Lactobacillus sp* (disbiosis), por bacterias anaerobias y facultativas como, por ejemplo: *G. vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mobiluncus sp.*, *Prevotella sp* y *Atopobium vaginae*, que recientemente fue identificado (Fredricks, Tina L. Fiedler, & Marrazzo, 2005). Varias mujeres que posiblemente padecen este síndrome, se quejan de una descarga vaginal excesiva, con un olor fétido similar al pescado, el olor es más pronunciado después de un acto sexual debido al pH alcalino del semen, al reaccionar con las aminos producidas, no obstante, el 50% de las mujeres se muestran asintomáticas (Caballero, Batista, Cué, Ortega, & Rodríguez, 2000). Entre las complicaciones que acarrea podemos citar: ruptura de membranas. Sin embargo, el mecanismo por el cual la VB induce al parto prematuro no ha sido elucidado por completo (McGregor & French, 2000; Nelson, y otros, 2014). Otra complicación, se atribuye a la enfermedad inflamatoria pélvica (Haggerty, y otros, 2016), que puede ser un factor favorable para la transmisión de VIH entre parejas heterosexuales (Al-Harhi, y otros, 1999). A través del

tiempo la VB sufrió muchos cambios en su denominación (Tabla 3) hasta su denominación actual.

La VB es conocida hace varias décadas atrás, sin embargo, en los tiempos actuales no se logra esclarecer los factores causales. Una posible explicación se debe a que la VB no solamente es un estado caracterizado por crecimiento excesivo de microorganismos, sino también incluye la formación de una biopelícula adherente polimicrobiana con un contenido elevado de *G. vaginalis* en la mucosa vaginal, que está presente solo en pacientes que padecen esta enfermedad y no así en pacientes sanos (Swidsinski, y otros, 2005).

**Tabla 3**

*Historia de la Nomenclatura de la Vaginosis Bacteriana*

Afeccion	Bacterias sospechadas
Vaginitis no específica	<i>Diplobacillus variabilis</i> . (Henriksen, 1947). <sup>7</sup> Anaerobios (Pheifer et al. 1978) <sup>8</sup> . Estreptococos anaerobios (Krönig, 1982) <sup>9</sup> .
Vaginitis Haemophilus vaginalis	<i>Haemophilus vaginalis</i> . (Gardner and Dukes, 1955). <sup>9</sup>
Vaginitis Corynebacterium	<i>Corynebacterium vaginale</i> . (Zinnerman and Turner, 1963). <sup>10</sup>
Vaginitis Gardnerella	<i>Gardnerella vaginalis</i> . (Greenwood and Pickett, 1980) <sup>11</sup>
Vaginosis anaeróbica	Anaerobios. (Blackwell and Barlow, 1982). <sup>12</sup>
Vaginosis bacteriana	Polimicrobiana. (Weström et al, 1984). <sup>5</sup>
Vaginosis no específica	Polimicrobiana. (Thomason, 1990). <sup>6</sup>

*Nota.* Recuperado de Caballero, Batista, Cué, Ortega, & Rodríguez (2000)

La evaluación de los signos clínicos es vital para el diagnóstico de VB, la agudeza de detectar dichos signos, depende del personal de salud que hace la prueba. El diagnóstico se establece por la presencia de al menos 3 de 4 criterios establecidos en el Simposio Internacional sobre Vaginosis Bacteriana en Estocolmo, como ser: descarga de flujo vaginal homogénea blanca grisácea, células epiteliales vaginales recubiertas por bacterias (células clave), liberación de un olor a pescado de la secreción vaginal con hidróxido de potasio al 10% (prueba de olor) un pH mayor a 4,5 (Amsel, y otros, 1983). Otra forma de diagnosticar la VB, que resulta ser menos costosa y más accesible en todo laboratorio clínico, es mediante la tinción Gram de los frotis vaginales, desarrollando criterios estandarizados (Spiegel, Amsel, & Holmes, 1983). Además,

existe un sistema de puntuación modificado que va de 0 hasta 10; donde 0 a 3 se considera normal, 4 a 6 intermedio y 7 a 10 es el criterio de VB (Nugent, Krohn, & Hillier, 1991).

El diagnóstico mediante el cultivo de *G. vaginalis*, no es una prueba fehaciente de que la paciente padece de VB, debido a que dicho microorganismo se encuentra en el 5 a 60 % de mujeres sanas, por tal hecho se recomienda el soporte de pruebas de laboratorio y evidencias clínicas (Caballero, Batista, Cué, Ortega, & Rodríguez, 2000).

El tratamiento que se emplea en la actualidad en mujeres no gestantes es el metronidazol por ser altamente efectivo contra anaerobios y otros microorganismos, la dosis recomendada es de 2 g en dosis única. En mujeres gestantes, el antibiótico de elección es la clindamicina y el régimen recomendado es de 300 mg cada 12 horas durante 7 días (Ergueta, Evia, & Santivañez, 2012).

## **2.5. *Gardnerella vaginalis* principal agente etiológico de VB**

### **2.5.1. Taxonomía, estructura y composición**

La presencia de un microorganismo muy similar al género *Haemophilus*, pleomórfico en forma de bastón, Gram-negativo, se aisló de mujeres con cervicitis y hombres con prostatitis (Leopold, 1953). Transcurrido un par de años otros investigadores reportaron un microorganismo similar (descrito anteriormente) llamándolo *Haemophilus vaginalis*, además lo relacionaron como el agente etiológico de la vaginitis inespecífica (Gardner & Dukes, 1955). Al no requerir los factores de crecimiento V y X, se descartó que pertenece al género *Haemophilus* (Greenwood & Pickett, 1980), en consecuencia, se recomendó el cambio, al género *Corynebacterium* por tener similar morfología microscópica, pero en disparidad a su reacción a tinción de Gram (Gram-positivo), una disposición de letras chinas (Zinnemann & Turner, 1963) y al no existir géneros compatibles, se propuso el nuevo género *Gardnerella* (Greenwood & Pickett, 1980) denominada así actualmente.

Debido a las contradicciones entre reportes de distintas investigaciones, en relación a la reacción de la tinción de Gram, por presentar una gran variabilidad surgió el conflicto de clasificarlo. Entonces se realizó el estudio de la pared celular a nivel estructural, donde se reportó que es un microorganismo que tiene propiedades más cercanas a los Gram-negativos, debido a la cantidad de peptidoglucano presente en su pared celular, alrededor de 20 %, muy similar a la *E.*

*coli* de 23 %, en comparación con un Gram-positivo de 40-97 %, asimismo no se detectó ácidos lipoteicoicos característicos de las bacterias Gram-positivas (Criswell, Marston, Stenback, Black, & Gardner, 1971). Dichos resultados fueron refutados por varios autores; otra investigación evidencio que *G. vaginalis* tiene una pared celular delgada, dicha característica explicaría la tendencia de teñirse de Gram-negativo o Gram-variable, considerando que el envejecimiento de la pared celular afecta a la tinción de Gram, no presenta una membrana externa y no se detecta lipopolisacáridos, por consiguiente, se concluye inequívocamente que la pared celular es Gram-positiva (Sadhu, Chow, Nelligan, Cheng, & Costerton, 1989). Las citolisinas dependientes del colesterol (CDC) se evidenciaron solo en bacterias Gram-positivas, *G. vaginalis* produce una CDC denominada vaginolisina, por lo tanto, se proporciona una evidencia más para catalogarlo como Gram-positivo, a pesar de su característica de tinción variable (Gelber, Aguilar, Lewis, & Ratner, 2008).

El análisis de secuencia del 16S rDNA, es un método taxonómico muy útil en la filogenia de las bacterias, se analizó 21 especies de *Bifidobacterium* y *G. vaginalis*, donde se concluyó que ambos pertenecen a un grupo filogenético (Miyake, Watanabe, Watanabe, & Oyaizu, 1998). Fenotípicamente *G. vaginalis* muestra actividad fructosa-6-fosfato fosfocetolasa, típica del género *Bifidobacterium*, pero, el contenido de G+C es demasiado diferente para que se considere *G. vaginalis* una especie del género *Bifidobacterium*, entonces, se establece que ambos microorganismos representan distintos géneros pertenecientes a un único linaje filogenético (Van Esbroeck, y otros, 1996).

### **2.5.2. Mecanismos de patogenia**

En las infecciones bacterianas recalcitrantes se producen biopelículas que mejoran la fijación bacteriana a las superficies epiteliales, propiciando poblaciones bacterianas más altas y desestabilizando los mecanismos inmunes, previniendo de esta forma que los antimicrobianos lleguen a su blanco (Costerton, y otros, 2003); por consiguiente, son un factor patogénico muy importante. En un estudio se demostró que en pacientes con diagnóstico positivo de VB, se produce una biopelícula polimicrobiana con alto contenido de *G. vaginalis* alcanzando una concentración de  $10^{11}$  bacterias por milímetro cuadrado, además, de otros microorganismos. También demostraron que las células epiteliales vaginales recubiertas por bacterias (células clave), están revestidas por una biopelícula (Swidsinski, y otros, 2005). Es posible un enlace

entre la producción de sialidasas y la producción de biopelículas bacterianas en la VB (Lopes dos Santos Santiago, y otros, 2011).

La respuesta inmune del huésped, mediada por la inmunoglobulina A, ocurre durante la VB, la cual sirve como marcador de dicha enfermedad, y se produce en respuesta a una toxina proteica (vaginolisina) generada por la *G. vaginalis*, que actúa como una hemolisina y es miembro de las CDC, asimismo es muy selectivo por las células humanas. La molécula reguladora del complemento CD59 interviene en la especificidad del huésped (Gelber, Aguilar, Lewis, & Ratner, 2008). La presencia de bacterias Gram-variables se evidencia la adhesión a las células clave mediante una capa fibrilar externa, igualmente se observan fimbrias (Scott, Curran, & Smyth, 1989).

### **2.5.3. Aislamiento e identificación de *G. vaginalis***

La *G. vaginalis* es un microorganismo con exigencias nutricionales, requiere de un medio de cultivo de alta calidad nutricional, es así que, inicialmente se logró aislar en agar proteosona N°3, suplementado con sangre de cordero (Gardner & Dukes, 1955). Ahora bien, los compuestos que requieren son: la tiamina, riboflavina, niacina, fólico ácido, biotina y al menos dos purinas y pirimidina bases, pero no requieren la nicotinamida adenina dinucleótido y hemina (Dunkelberg & McVeigh, 1969). Habitualmente pueden crecer en agar chocolate y agar colistina-ácido nalidixico (CNA). Para obtener mayores tasas de aislamiento en muestras clínicas se utiliza el medio de cultivo semiselectivo Agar Sangre Humana con Bicapa-Tween (Totten, Amsel, Hale, Piot, & Holmes, 1982). La temperatura óptima de crecimiento es de 35 a 37°C, en condiciones de microaerofilia incubado de una jarra de anaerobiosis por extinción de vela, ahora bien, el anticoagulante polianetol sulfonato de sodio (SPS) utilizado en los hemocultivos podrían interferir en el aislamiento ya que inhibe su crecimiento, en efecto, la gelatina al 1% v/v puede evitar el efecto del SPS sobre *G. vaginalis* (Reimer & Reller, 1984).

Las características macroscópicas de *G. vaginalis* en medios de cultivo suplementados con sangre humana (5%), muestran una  $\beta$  hemolisis con bordes difusos, de un diámetro de 0,3 a 0,5 mm. Ahora bien, respecto a sus características microscópicas, presentan forma de cocobacilos de reacción variable a la tinción de Gram. La identificación bioquímica (Tabla 4), presenta un alto nivel de incertidumbre que dirigen a resultados irreales, ya que la identificación de *G. vaginalis* en esta tesis se basa precisamente en métodos bioquímicos, por lo tanto, se

requiere métodos que sean confiables, y para ello existen los métodos moleculares que tienden a hacer los procesos de identificación más fiables. El gen 16S rRNA es utilizado para la detección de *G. vaginalis* (Nath, Sarosy, & Stylianou, 2000).

**Tabla 4**

*Características Bioquímicas para la Identificación de G. vaginalis*

<b>Característica</b>	<b>Reacción</b>
Hemolisis	β
Oxidasa	-
Catalasa	-
Hidrolisis del hipurato	+
Producción de ácido a partir de:	
Glucosa	+
Maltosa	+
Sacarosa	+
Manitol	-
Almidón	+
Zona de inhibición de crecimiento con:	
Metronidazol (disco de 50 µg)	+
Trimetoprim	+
Sulfonamida	+

*Nota.* Extraído de Winn, y otros, (2013)

## 2.6. Bacterias ácido lácticas

El hombre desde tiempos antiguos fue empleando bacterias ácido lácticas para la conservación de sus alimentos, es posible que el descubriendo del efecto de las bacterias ácido lácticas sobre la leche fue accidental, sin embargo, actualmente muchas industrias aplican las bacterias ácido lácticas en diferentes procesos (Agurto & Ramos, 2008). Las bacterias ácido lácticas tienen la particularidad de transformar los carbohidratos en ácido láctico. Además, son un grupo taxonómico diverso, Gram positivos, facultativos o anaerobios, no patógenos, no toxigénicos, no forman esporas y no producen pigmentos (Crittenden, 2009), también, forman parte de la microbiota humana, localizados en el tracto gastrointestinal y genitourinario donde cumplen funciones en beneficio del hospedero (Guarner & Malagelada, 2003), en consecuencia, son considerados como organismos GRAS (General Regarded As Safe) (Obed, 2011). Ahora bien, presentan una capacidad biosintética limitada, por lo tanto, son exigentes nutricionalmente,

debido a que requieren precursores de ácidos nucleicos como vitaminas y aminoácidos (Dellaglio, de Roissart, Torriani, Curk, & Janssens, 1994).

### **2.6.1. Clasificación de las bacterias ácido lácticas**

Los géneros que pertenecen a este grupo de bacterias son los siguientes: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y la especie *Streptococcus thermophilus*. A pesar de que otros géneros como *Propionabacterium* y *Bifidobacterium* no están emparentados filogenéticamente con las bacterias ácido lácticas (Schleifer & Ludwig, 1995), tienen una aplicación industrial similar y también se encuentran en los mismos nichos ecológicos, por lo tanto, son incluidos tradicionalmente en el grupo de bacterias ácido lácticas. En ese sentido, en el presente trabajo se evaluó el efecto antagónico de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, por ende, se describirán sus características más importantes.

### **2.6.2. Género *Lactobacillus***

Los *Lactobacillus* se caracterizan por reaccionar positivamente a la tinción de Gram, y visualizarse mediante un microscopio óptico en forma de bastoncillos, agrupados en cadenas, su crecimiento es favorecido por anaerobiosis, crecen entre 2°C a 53°C, son resistentes a pH ácidos y generan una producción elevada de ácido láctico, aproximadamente de 27 g/L (Agurto & Ramos, 2008). Otra característica de este género es su heterogeneidad en su ADN por su proporción de G+C que varía del 32 al 52 % (Kandler & Weiss, 1986). A nivel de especie se pueden clasificar según el tipo de fermentación (homofermentadoras, heterofermentadoras facultativas o heterofermentadoras estrictas) y su temperatura óptima de crecimiento (mesófilas o termófilas moderadas) (Flores, 2007). Sin embargo, Orla-Jasen, (1919); los clasifica en tres grupos que se describirán a continuación:

#### **2.6.2.1. Grupo I: *Lactobacillus* homofermentativos estrictos**

Los *Lactobacillus* homofermentativos estrictos, están conformados por dos subgrupos, el subgrupo *acidophilus* que a su vez se divide en: *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. crispatus*, *L. johnsonii* y *L. helveticus* (caracterizado por ser el mayor productor de ácido láctico) (Kandler & Weiss, 1986). Y el otro subgrupo, que forma parte de los homofermentativos estrictos, es *delbrueckii*, que a su vez esa conformado por las siguientes subespecies: *L. delbrueckii subsp.*

*delbrueckii*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. delbrueckii subsp. lactis* y *L. delbrueckii subsp. leichmanii* (Agurto & Ramos, 2008).

### **2.6.2.2. Grupo II: *Lactobacillus* homofermentativos facultativos**

Este grupo de microorganismos se caracteriza por el metabolismo de las hexosas homofermentativo (Kandler & Weiss, 1986). Las especies que forman parte de este grupo son muy heterogéneas, entre ellas: *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. curvatus* y *L. casei*. Además, cabe resaltar que la especie *L. casei* a su vez está conformada por tres genotipos, la cepa tipo (*L. casei*) con tres subespecies (*L. casei subsp. casei*, *L. casei subsp. pseudoplanarum* y *L. casei subsp. tolerans*) por último, *L. casei subsp. rhamnosus* (Agurto & Ramos, 2008).

### **2.6.2.3. Grupo III: *Lactobacillus* heterofermentativos estrictos**

El metabolismo heterofermentativa se caracteriza por la bioconversión de hexosas, gluconato y pentosas a ácido láctico y acético. Los pertenecientes a este grupo son: *L. reuteri*, *L. brevis*, *L. buchneri* y *L. fermentum*, existe baja homología entre especies (Flores, 2007).

El género *Lactobacillus* taxonómicamente pertenece al filo Firmicutes, clase Bacilos, orden *Lactobacillales*, familia *Lactobacillaceae*, y está compuesta por más de 170 especies (Kleerebezem & Vaughan, 2009). Los lactobacilos que habitan el tracto gastrointestinal incluyen las especies, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, y *L. rhamnosus* (Turróni, y otros, 2014), también otros lactobacilos que habitan la cavidad vaginal, son: *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. vaginalis* y *L. iners* (De Gregorio, Juárez Tomas, Leccese Terraf, & Nader-Macias, 2014).

### **2.6.3. Género *Bifidobacterium***

Las bifidobacterias están presentes en el tracto gastrointestinal humano y de otros animales, en la actualidad el género *Bifidobacterium* cuenta con 28 especies ilustradas en la Tabla 5 (Collado, 2004). Los miembros de este género son anaerobios estrictos, sin embargo, según la especie y el medio de cultivo, existe un grado de tolerancia al oxígeno (De Vries & Stouthamer, 1969), la morfología es bacilar cóncava con extremos en forma de espátula, de reacción positiva a la tinción de Gram, se los puede observar en cadenas, en forma empalizada o en forma de V, Y, T. La temperatura óptima de crecimiento oscila entre 36°C a 38°C para especies aisladas de origen humano y de 41°C a 43°C para especies aisladas de origen animal, un

dato importante es que no existe crecimiento a temperaturas inferiores de 20°C y tampoco resisten temperaturas superiores a 46°C (Collado, 2004). Existe una inhibición del crecimiento a un pH menor a 4, o mayor a 8, por lo tanto, el pH ideal oscila entre 6,5 a 7 (Scardovi, 1986).

Las bifidobacterias se diferencian de las bacterias ácido lácticas, en el metabolismo de las hexosas/pentosas llevado a cabo por la ruta de la fructosa-6-fosfato/xilulosa-6-fosfato-fosfocetolasa que produce ácido acético y ácido láctico, pero, no produce CO<sub>2</sub>, denominada también bifid-shunt (derivación bífida) (De Vries & Stouthamer, 1969).

**Tabla 5**  
*Taxonomía del Género Bifidobacterium*

Dominio	Bacteria
Linaje	<i>Firmicutes</i>
Clase	<i>Actinobacteria</i>
Subclase	<i>Actinobacteridae</i>
Orden	<i>Bifidobacteriales</i>
Familia	<i>Bifidobacteraceae</i>
Géneros	<i>Bifidobacterium</i> (28 especies)
	<i>Gardnerella</i> (1 especie)
	<i>Aeriscardovia</i> (1 especie)
	<i>Parascardovia</i> (1 especie)
	<i>Scardovia</i> (2 especies)

*Nota. Extraído de Collado, (2004)*

Actualmente, una microbiota vaginal saludable en mujeres de edad reproductiva esta caracterizada por la colonización de los lactobacilos. Sin embargo, estudios demuestran que las bifidobacterias son miembros dominantes de algunos microbiomas vaginales en mujeres sanas (*B. breve* y *B. longum* especies encontradas en la cavidad vaginal), lo cual sugiere que el género *Bifidobacterium* tiene potencial para ser tan protector como los lactobacilos de acuerdo a la composición actual de un microbioma (Freitas & Hill, 2017).

#### 2.6.4. Aplicaciones de los probióticos

La microbiota autóctona de la piel, boca, tracto gastrointestinal, tracto respiratorio y tracto genitourinario, conforma un microecosistema sumamente complejo, que está en equilibrio entre sí y con el hospedero. Esta microbiota cumple diversas funciones, entre ellas digestiva, asimilación de nutrientes, estimulación y maduración de tejidos, regulación de respuesta inmune del hospedero y una de las más sobresalientes: logra prevenir o proteger al hospedero de la colonización por microorganismos patógenos (Bäckhed, Ley, Sonnenburg, Peterson, & Gordon, 2005). Dentro del grupo de los microorganismos autóctonos se encuentran los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que en la actualidad son reconocidos por su efecto positivo sobre la salud humana (Wang, Gao, Zhang, & Pan, 2016; Collado, 2004).

Los efectos de los probióticos en beneficio del hospedero dependen de la adaptación al entorno que colonizan, en ese sentido, la guía publicada por la FAO/OMS en mayo 2002 establece los criterios para la evaluación de los probióticos. Es así que, los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, deben ser identificados a nivel de especie, para garantizar el efecto benéfico de estos microorganismos, ya que no se puede generalizar su efecto respecto al género (Collado, 2004). Otra característica del beneficio de los probióticos radica en su tolerancia a ácidos gástricos, sales biliares, durante el tránsito gastrointestinal para llegar a colonizar esta superficie (Fuochi, Petronio, Lissandrello, & Furneri, 2015). Otra propiedad que poseen los probióticos, es la adherencia hacia las células epiteliales de las mucosas, para ejercer efectos inmunomoduladores, asimismo, la adherencia es muy importante, para promover la colonización en la célula hospedera. Entre otras propiedades también se resalta la capacidad antagónica que ejercen los probióticos, ya sea por el desplazamiento de patógenos y la competición por nutrientes (Sengupta, y otros, 2013). También, los probióticos sintetizan una variedad de metabolitos bioactivos como ser: peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, ácido láctico y ácido fenilacético con capacidad antimicrobiana contra bacterias, virus, hongos y parásitos (Dec, Puchalski, Urban-Chmiel, & Wernicki, 2014).

Se ha reportado que varias cepas probióticas mejoran la biodisponibilidad de los nutrientes mediante la síntesis de factores de crecimiento y vitamina B (Turpin, Humblot, Thomas, & Guyot, 2010), también, los lactobacilos tienen la capacidad de degradar la lactosa resolviendo problemas digestivos relacionados con la intolerancia (de Vrese, y otros, 2001).

Los efectos de los probióticos, se aplican en prevención y tratamiento de enfermedades, como por ejemplo, la leche fermentada por las cepa *L. rhamnosus* GG y *L. helveticus* NS8, pueden ser útiles para la prevención y tratamiento de enfermedades asociadas a la inflamación (Yoda, y otros, 2014; Rong, y otros, 2015). Aunque, se sabe que los probióticos de origen humano no son efectivos contra *E. coli* diarreogenica, sé ésta realizando otros estudios de las cepas *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. plantarum* y *L. rhamnosus*, para la prevención de infecciones intestinales (Davoodabadi, Soltan Dallal, Lashani, & Tajabadi Ebrahimi, 2015).

Los lactobacilos tienen una función muy importante en el equilibrio ecológico del tracto genitourinario, varias infecciones se caracterizan por la disminución de los lactobacilos naturalmente presentes en la cavidad vaginal. La restauración de la microbiota autóctona normal urogenital, es posible con el uso de los probióticos como alternativa, ya que se han reportado tratamientos prometedores, usándolos de forma independiente o adicional a la terapia antimicrobiana (Kovachev & Vatcheva-Dobrevska, 2016). Muchos estudios emplean diferentes cepas probióticas por vía local, realizando un seguimiento de su capacidad de colonización de la cavidad vaginal en pacientes con VB (Hallen, Jarstrand, & Pahlson, 1992). Estudios sobre LCR35 demostraron en condiciones *in vitro*, las características requeridas para la colonización, adherencia rápida a la pared vaginal e inhibición de patógenos como *P. bivia* y *G. vaginalis* (Coudeyras, Jugie, Vermerie, & Forestier, 2008).

### **3. Justificación**

En la actualidad varias mujeres en edad reproductiva que padecen de VB, siendo la afección vaginal más común (Sobel J. , 1997), tiene una prevalencia de hasta un 21,1 % de la población (Monterrosa-Castro, Blaquicet-Anaya, Cantillo-Cabarcas, Muñoz-Marrugo, & Valverde-Farre, 1996), un dato muy similar reportado por la Unidad de Epidemiología del Servicio Departamental de Salud, La Paz-Bolivia, detallado en el Perfil Epidemiológico de Enfermedades Transmisibles, indica que en la gestión 2009 de cada 100 muestras para VB, 24 fueron positivas (Servicio Departamental de Salud La Paz, 2016). Además, el desarrollo de este tipo de infección da lugar a varias complicaciones como endometritis, ruptura prematura de membranas, parto prematuro (Nelson, y otros, 2014), enfermedad inflamatoria pélvica (Haggerty, y otros, 2016). Existen indicios de que la VB sería un factor favorable para que, en

parejas heterosexuales, se pueda transmitir el virus de la inmunodeficiencia humana (Al-Harthi, y otros, 1999).

Actualmente en Bolivia la VB es tratada con metronidazol y en el caso de mujeres embarazadas con clindamicina (Ergueta, Evia, & Santivañez, 2012), a pesar de la alta eficacia de estos antimicrobianos existen reincidencias aproximadamente en el 30 % de los casos, los síntomas clínicos retornan en tres meses y en el primer año hasta un 80% después del tratamiento (Sobel, Schmitt, & Meriweather, 1993). El incremento en la resistencia bacteriana a los agentes antimicrobianos y las dificultades en el manejo de las infecciones recurrentes (Palmeira de Oliveira, Palmeira de Oliveira, & Palmeira de Oliveira, 2015), disminuye la posibilidad de un tratamiento eficaz y puede que en un futuro cambien los esquemas de tratamiento (Tomusiak, Strus, & Heczko, 2011). En ese sentido, sin lugar a dudas existe la necesidad de controlar la propagación de la resistencia, lo que conlleva a estudiar otras modalidades de tratamiento, ya sea nuevos medicamentos, basándose en, principios activos de extractos vegetales y mediante el uso de la restauración de la microbiota normal, empleando microorganismos probióticos. El antagonismo de los probióticos contra microorganismos patógenos causantes de la VB es una alternativa muy estudiada (Aroutcheva, y otros, 2001). Sin embargo, en Bolivia no existen estudios para este fin.

Otro factor importante es, que el grupo mayoritario que asiste al CDVIR para su respectivo control y diagnóstico de enfermedades, son trabajadoras sexuales. En el desempeño de su trabajo existe una prevalencia en el consumo de bebidas alcohólicas, y en el caso hipotético de que se encuentren con el tratamiento de metronidazol, es posible que se desarrolle el efecto que genera reacciones adversas de tipo disulfiram (Vicente & Pérez-Trallero, 2009). Lo que provocaría el abandono y fracaso terapéutico, además, de la resistencia a metronidazol por las complicaciones que pueden producirse.

La importancia de esta investigación radica entonces en buscar un tratamiento de alternativo o coadyuvante al metronidazol. Es así que se evaluó el efecto de los probióticos, definidos como microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del hospedador (FAO/OMS, 2006).

## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivo general

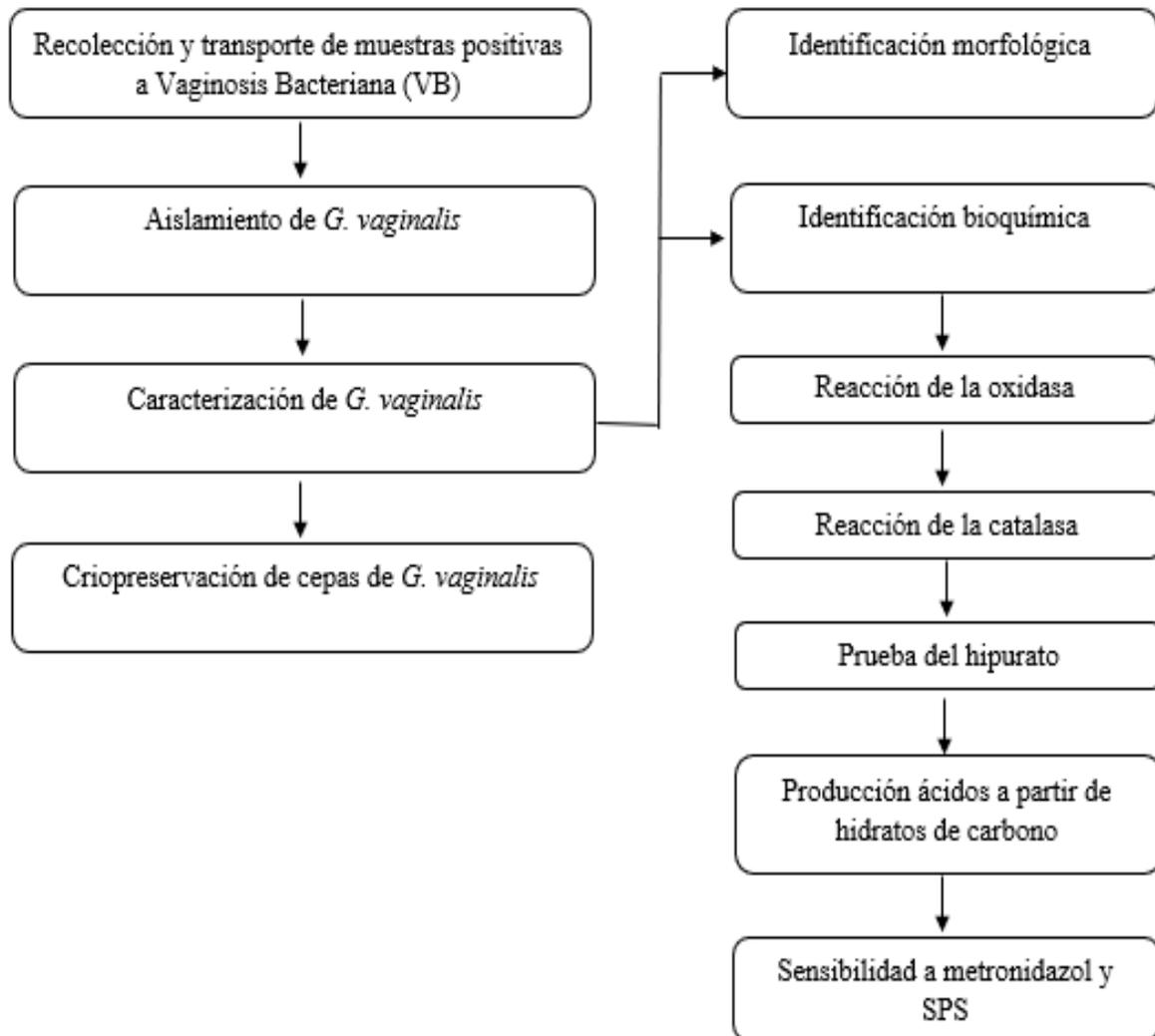
Evaluar el efecto antagonista probiótico contra *G. vaginalis*, aislada de muestras provenientes de mujeres con diagnóstico de Vaginosis Bacteriana asistentes al Centro Departamental de Vigilancia Información y Referencia (CDVIR) La Paz-Bolivia, entre los meses de marzo a agosto de la gestión 2016.

### 4.2. Objetivos específicos

- Aislar e identificar por pruebas bioquímicas cepas de *G. vaginalis*, a partir de muestras provenientes de mujeres en edad fértil con diagnóstico positivo de Vaginosis bacteriana, asistentes al Centro Departamental De Vigilancia Información y Referencia (CDVIR).
- Determinar la actividad antagónica de diferentes probióticos, provenientes del banco de cepas del Área de Biotecnología Microbiana del IIFB contra *G. vaginalis*.
- Seleccionar y caracterizar el probiótico con mayor actividad antagónica contra las cepas identificadas de *G. vaginalis*.
- Comparar escenarios para la reducción *G. vaginalis in vitro*: por efecto del metronidazol, por efecto del probiótico LCR35 y por el efecto del probiótico LCR35 en presencia de metronidazol.
- Evaluar la reducción del banco de cepas nativas de *G. vaginalis in vitro*, por efecto del probiótico LCR35 en presencia de metronidazol.

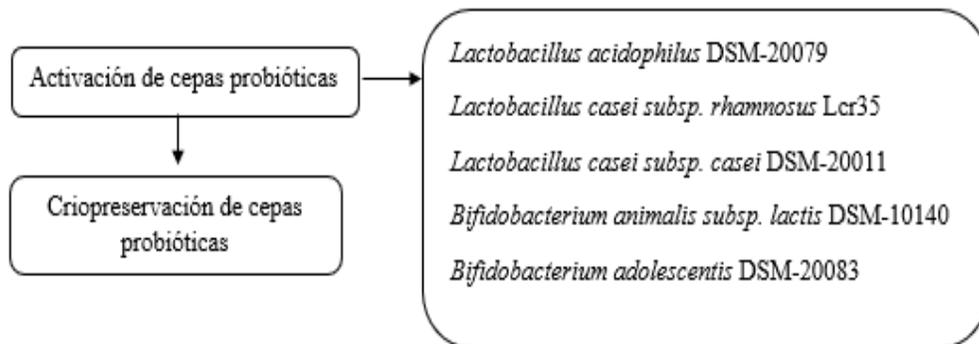
## 5. Metodología

### 1 Aislamiento y caracterización de cepas de *G. vaginalis*



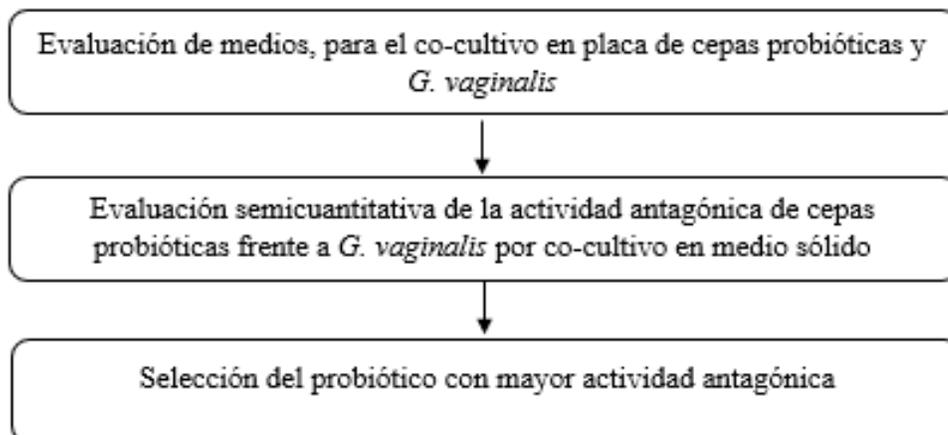
2

## Evaluación de cepas probióticas



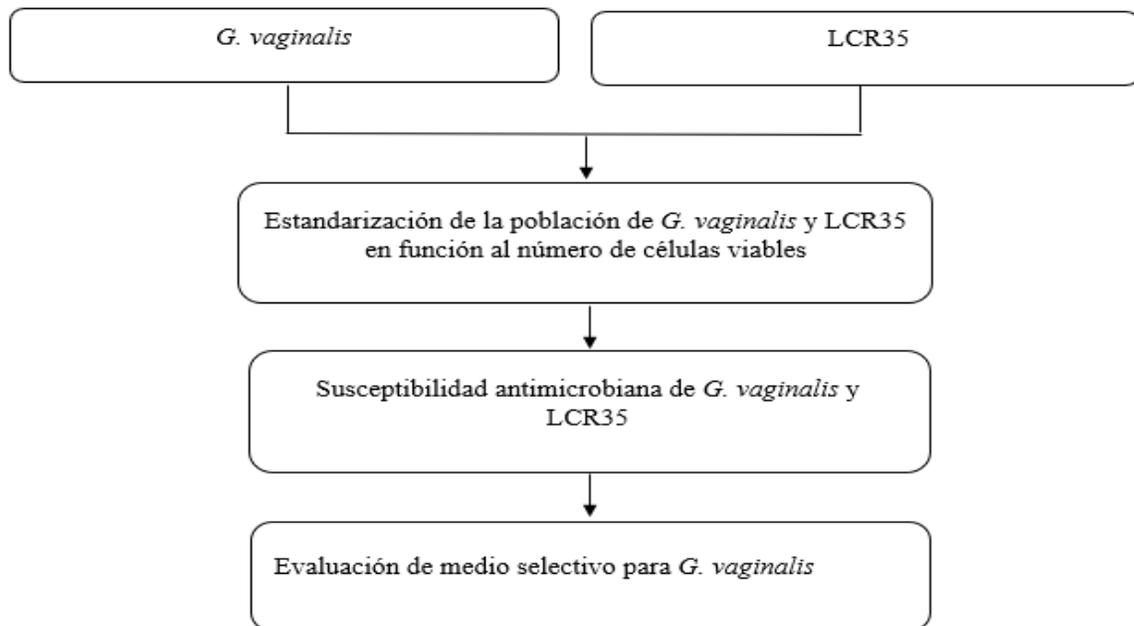
3

## Evaluación de la actividad antagonica de cepas probióticas frente a *G. vaginalis* por co-cultivo en medio sólido



4

#### Evaluación *in vitro* del crecimiento de *G. vaginalis* y LCR35



5

#### Ensayos cuantitativos de actividad antagónica de LCR35 *in vitro* contra *G. vaginalis*

Evaluación del crecimiento de *G. vaginalis* expuesta a metronidazol (**Ensayo 1**)

Evaluación de la actividad antagónica de LCR35 contra *G. vaginalis* sobreviviente a la exposición de metronidazol (**Ensayo 2**)

Evaluación de la actividad antagónica de LCR35 contra *G. vaginalis* (**Ensayo 3**)

Evaluación de la actividad antagónica de LCR35 contra *G. vaginalis* en presencia de metronidazol (**Ensayo 4**)

Evaluación del efecto antagónico de LCR35 frente al resto de *G. vaginalis* nativas pertenecientes al banco de cepas del IIFB, en presencia de metronidazol

## **5.1. Aislamiento y caracterización de cepas de *G. vaginalis***

### **5.1.1. Recolección y transporte de muestras positivas a Vaginosis Bacteriana (VB)**

El personal del Centro Departamental de Vigilancia, Información y Referencia (CDVIR-La Paz), colectó muestras de exudado vaginal pertenecientes a trabajadoras sexuales (mujeres en edad fértil, entre 18 a 45 años, sexualmente activas y que no se encontraban en estado gestación), las cuales asistieron para su control sanitario a este centro de referencia, entre los meses de marzo a agosto del 2016.

Las muestras fueron inmediatamente remitidas a la Unidad de Laboratorio Clínico del CDVIR, para diagnóstico de Vaginosis Bacteriana, entre otros. 150 muestras positivas a vaginosis bacteriana (debido a la presencia de células clave y prueba positiva de aminas) fueron transferidas al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB) para esta investigación. Para este fin, 0.5 mL de exudado vaginal suspendido en solución fisiológica estéril (proveniente de muestras positivas a vaginosis bacteriana), fueron inoculados en Caldo Soya Triptona anóxico (TSB), y transportados a temperatura ambiente al Laboratorio de Biotecnología Microbiana del IIFB, para su posterior procesamiento.

### **5.1.2. Aislamiento de *G. vaginalis***

El inóculo proveniente de muestras positivas transportadas en caldo TSB anóxico, fue inmediatamente sembrado por estría de agotamiento en placas de Agar Soya Triptona suplementado con sangre humana al 5 % (denominado como TSA+S), e incubado en microaerofilia a 37°C durante 24 horas. Las colonias desarrolladas que presentaron el morfotipo presumible de *G. vaginalis* (colonias puntiformes de 0.3-0.5 mm de diámetro con beta hemólisis difusa) fueron colectadas y resembradas en TSA+S en las condiciones previamente descritas.

### **5.1.3. Caracterización de *G. vaginalis***

La identificación morfológica de *G. vaginalis* se basó en las características macroscópicas de colonias desarrolladas en TSA+S. Para la determinación de las características macroscópicas se realizó una inspección de la superficie de las placas observando la forma, densidad, elevación, borde,  $\beta$ -hemólisis y el tamaño de las colonias. Para la determinación de la morfología microscópica se colectó colonias de un cultivo de 24 horas de incubación en TSA+S, y se observó la reacción a la tinción de Gram y la morfología bacteriana en un microscopio óptico,

empleando una magnificación de 1000x. Adicionalmente, se realizó la caracterización fisiológica a través de pruebas bioquímicas según el esquema de identificación para cepas de *G. vaginalis* propuesto por Winn y otros (2013), que incluye: reacción de oxidasa, reacción de catalasa, producción de ácido a partir de glucosa, sacarosa, maltosa, manitol y almidón, hidrólisis de hipurato, evaluación de la sensibilidad a metronidazol y polianetol sulfonato de sodio (SPS). Todos los morfotipos similares a *G. vaginalis*, fueron sometidos a las pruebas bioquímicas mencionadas, empleando un cultivo activo (24hrs) desarrollado en medio TSA+S.

La determinación de la reacción de oxidasa, hidrólisis de hipurato, e inhibición de crecimiento con metronidazol (50 µg) y SPS (1000 µg), se llevó a cabo empleando un cultivo activo de *G. vaginalis* sometido a tabletas Diatabs™: OXI, HIP, MTR50 y SPS, respectivamente (Rosco, Dinamarca), de acuerdo a las instrucciones de uso (Rosco, 2003). La determinación de la reacción de catalasa se realizó depositando colonias sobre un portaobjetos, y adicionando una gota de peróxido de hidrogeno (3 %, v/v), la formación de efervescencia demostró una reacción positiva.

Para determinar la producción de ácido a partir de glucosa, maltosa, sacarosa, manitol y almidón, se empleó la técnica descrita por Brown (1974), para esto, se preparó una batería de tubos con tapas a presión: en el primer tubo se depositaron 1000 µL de Solución de Trabajo [compuesta por: 10 mL de Solución amortiguadora de fosfatos equilibrada BBS (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,40 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,10 g, KCl 8 g, para 100 mL), 90 mL de agua destilada y 0.5 mL de rojo fenol (1%, p/v), a pH 7,0; esterilizada por filtración] y se suspendió biomasa bacteriana hasta obtener una turbidez similar al tubo 2 de la escala de McFarland. En los 5 tubos restantes, se depositó 200 µL de Solución de Trabajo, 100 µL de glucosa, maltosa, sacarosa, manitol o almidón (20% p/v), esterilizados por filtración, e inoculó 100 µL del primer tubo a cada uno de ellos, incubándolos a 37°C durante 24 horas. El viraje a un color amarillo determinó la reacción positiva.

#### **5.1.4. Criopreservación de cepas de *G. vaginalis***

A partir de cultivos activos desarrollados en placas con Agar Soya Triptona suplementada con sangre humana (5 %) y glucosa (20 g/L), denominado como TSA+S+G, se suspendió la biomasa bacteriana en 5 mL de Caldo Soya Triptona suplementada con 20 g/L de glucosa (denominado como TSB+G) hasta obtener una turbidez similar al tubo 2 de la escala de McFarland. 750 µL de esta suspensión fueron dispensados en tubos de criopreservación con 250

$\mu\text{L}$  de glicerol estéril, se homogenizó y almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$  por una hora, después a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas y finalmente a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para obtener cepas activas de *G. vaginalis* a partir de criopreservados, estos fueron trasladados de  $-80^{\circ}\text{C}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$  (1 hora),  $4^{\circ}\text{C}$  (1 hora), temperatura ambiente (1 hora) y finalmente a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Los criopreservados fueron inoculados en placas TSA+S+G por estría agotamiento, incubando a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas en microerofilia, posteriormente se realizaron tres subcultivos para obtener células de *G. vaginalis* activas.

## **5.2. Evaluación de Cepas Probióticas**

### **5.2.1. Activación de cepas probióticas**

*Lactobacillus acidophilus* DSM-20079, *Lactobacillus casei subsp. casei* DSM-20011, *Bifidobacterium adolescentis* DSM-20083, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* DSM-10140 y *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* LCR35, fueron empleados como cepas probióticas en esta investigación. Un liofilizado de cada cepa (proveniente del banco de cepas probióticas del IIFB) fue suspendido en medio de cultivo comercial MRS estéril (CMO359 OXOID), preparado en condiciones anaerobias de acuerdo a la técnica de Hungate (1969), el medio fue incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Posteriormente, se realizaron tres subcultivos para obtener células probióticas activas.

### **5.2.2. Criopreservación de cepas probióticas**

15 mL de un cultivo activo de cada cepa probiótica (24 horas de incubación) fueron centrifugados a 3500 rpm por 10 minutos, el paquete celular fue resuspendido en medio líquido MRS fresco hasta obtener una turbidez similar al tubo 4 de la escala de McFarland, se dispensó 750  $\mu\text{L}$  en tubos de criopreservación que contenían 250  $\mu\text{L}$  de glicerol estéril, se homogenizó y almacenó en el rango de temperaturas descrito en la sección 5.1.4.

Para obtener cepas probióticas activas a partir de criopreservados, estos fueron trasladados de  $-80^{\circ}\text{C}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$  (1 hora),  $4^{\circ}\text{C}$  (1 hora), temperatura ambiente (1 hora) y finalmente a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Los criopreservados fueron inoculados en caldo MRS anaerobio, incubando a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, posteriormente se realizaron tres subcultivos para obtener células probióticas activas.

### **5.3. Evaluación de la actividad antagónica de cepas probióticas frente a *G. vaginalis* por co-cultivo en medio sólido**

#### **5.3.1. Evaluación de medios para el co-cultivo en placa de cepas probióticas y *G. vaginalis***

Para determinar la actividad antagónica de cepas probióticas frente a *G. vaginalis* por co-cultivo en medio sólido, fue necesario evaluar medios de cultivo que permitan el crecimiento de ambas cepas debido a que poseen requerimientos nutricionales diferentes. En este sentido, se evaluó el medio Agar Soya Triptona con sangre humana al (5% v/v) y glucosa (20g/L) denominado TSA+S+G, como medio propuesto para el cultivo de *G. vaginalis* y con suplemento de glucosa para impulsar la fermentación probiótica, empleando como controles: medio Agar Soya Triptona suplementado con sangre humana (5% v/v) denominado TSA+S para favorecer el crecimiento de *G. vaginalis* y medio MRS agar empleado para el cultivo de cepas probióticas. En este sentido, células activas de *G. vaginalis* (preparación descrita en la sección 5.1.4.) y cepas probióticas (preparación descrita en la sección 5.2.2.) fueron resuspendidas en solución fisiológica hasta obtener una turbidez similar al tubo 0.5 de la escala de McFarland, se realizaron diluciones y se sembró 100  $\mu$ L de la suspensión bacteriana en placas de TSA+S+G, TSA+S y MRS. Las placas fueron incubadas en condiciones de microaerofilia a 37°C por 48 horas. Se evaluó la población bacteriana de *G. vaginalis* y cepas probióticas por recuento en placa. Para este ensayo fueron utilizadas 5 cepas de *G. vaginalis* (aisladas e identificadas como se describe en las secciones 5.1.2.; 5.1.3.) y seleccionadas al azar.

#### **5.3.2. Evaluación semicuantitativa de la actividad antagónica de cepas probióticas frente a *G. vaginalis* por co-cultivo en medio sólido**

La determinación de la actividad antagónica de las cepas probióticas frente a *G. vaginalis*, fue realizada mediante el ensayo de difusión en pozos (Schillinger & Lucke, 1989) con las siguientes modificaciones: Cultivos activos de *G. vaginalis* y cepas probióticas desarrollados en placas de TSA+S+G, fueron resuspendidos en 1 mL de solución fisiológica, realizando dos lavados celulares a 5000 rpm durante 5 minutos, y obteniendo densidades celulares similar al tubo 1 de la escala de McFarland para *G. vaginalis* y tubo 2 en el caso de las cepas probióticas. *G.vaginalis* fue inoculada en toda la superficie de la placa TSA+S+G empleando un hisopo estéril. Posteriormente, se realizaron horadaciones de 5 mm en la superficie de las placas y se depositaron 20  $\mu$ L de las cepas probióticas a ser evaluadas. Se empleó como control positivo de

inhibición discos de metronidazol (50 µg). Las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas, en microaerofilia a excepción de *Bifidobacterium adolescentis* DSM-20083 que fue incubado en condiciones anaerobias. Este ensayo fue realizado empleando 5 morfotipos de *G. vaginalis* del banco de cepas nativas (11307, 21008, 11104, 10508 y 20508), seleccionados al azar, aislados e identificados como se describe en las secciones (5.1.2.) y (5.1.3.). Se determinaron los halos de inhibición para seleccionar la cepa probiótica que presentó mayor actividad antagónica.

#### **5.4. Evaluación *in vitro* del crecimiento de *G. vaginalis* y *L. casei subsp. rhamnosus* LCR35**

Para llevar a cabo los ensayos cuantitativos de actividad inhibitoria de *L. casei subsp. rhamnosus* LCR35 (en adelante LCR35) frente a *G. vaginalis*, fue necesario determinar las poblaciones bacterianas a inocular al inicio de cada ensayo (descrito en la sección 6.6.), por otra parte, se determinó el perfil de sensibilidad contra antimicrobianos con el objetivo de seleccionar un antimicrobiano, al cual *G. vaginalis* fue resistente y LCR35 sensible (sección 6.3.1.). Finalmente, se evaluó distintas concentraciones del antimicrobiano seleccionado para desarrollar un medio selectivo para *G. vaginalis* e inhibitorio para LCR35 (descrito en la sección 6.5.). Todos los ensayos de la presente sección, se llevaron a cabo por la cepa probiótica LCR35 y la cepa 11307 de *G. vaginalis*.

##### **5.4.1. Estandarización de la población de *G. vaginalis* y LCR35 en función al número de células viables**

En experimentos anteriores el crecimiento de poblaciones bacterianas *G. vaginalis* y LCR35, fue determinado de forma indirecta a través del método turbidimétrico, comparando la turbidez de suspensiones bacterianas con la escala de McFarland (Meyer, Kiippeli, & Fiechter, 1985). Sin embargo, este método no fue aplicable para determinar con exactitud poblaciones viables de *G. vaginalis*, por tanto, fue necesario estandarizar una equivalencia entre la turbidez y concentración de bacterias viables (en ufc/mL) de *G. vaginalis* y LCR35, dado que para ensayos cuantitativos de actividad antagónica (descritos en la sección 6.6.) es necesario determinar la reducción de poblaciones bacterianas. Para este fin, se prepararon patrones de la escala de McFarland, correspondientes a los tubos 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 (Rojas, 2011). Posteriormente, se determinaron las densidades ópticas a 600 nm para cada tubo (Pérez, 2003). Células activas (24 horas) de *G. vaginalis* y LCR35, fueron resuspendidas en 1 mL de PBS (pH 7,2), realizando dos lavados celulares a 5000 rpm durante 5 minutos, cuyo paquete celular fue resuspendido en

TSB+G, obteniendo una batería de tubos con densidades ópticas similares a las establecidas para la escala de McFarland. Posteriormente, se realizaron diluciones para cada tubo y se sembraron 100 µL en placas TSA+S+G, las cuales fueron incubadas en microaerofilia a 37°C durante 48 horas para realizar el recuento de colonias de *G. vaginalis* y LCR35.

#### **5.4.2. Susceptibilidad antimicrobiana de *G. vaginalis* y LCR35**

Cuando *G. vaginalis* y LCR35 desarrollaron conjuntamente en medio de cultivo sólido no fue posible su recuento. Por otro lado, la evaluación cuantitativa de la actividad antagónica del probiótico frente a *G. vaginalis*, se basa en la reducción de la carga bacteriana contable. En ese sentido, fue necesario evaluar antimicrobianos que inhiban el crecimiento de LCR35 y permitan el desarrollo de *G. vaginalis*.

A efecto de determinar el comportamiento de *G. vaginalis* y LCR35 frente a diferentes antimicrobianos se emplearon cultivos activos de estos microorganismos (24 horas) para ser sometidos a pruebas de sensibilidad por difusión de discos (Bauer, Kirby, & Sherris, 1966) empleando: metronidazol (50 µg), clindamicina (2 µg), azitromicina (15 µg), eritromicina (15 µg), vancomicina (30 µg), lincomicina (2 µg), penicilina (10 UI), colistina (10 µg), neomicina (30 µg), amikacina (30 µg), ciprofloxacino (5µg), cefotaxima (30 µg), gentamicina (10 µg), nitrofurantoina (300 µg), amoxicilina (30 µg), fluconazol (25 µg), clotrimazol (10 µg), nistatina (50 µg), en TSA+S+G, como medio de cultivo, en condiciones de microaerofilia, a 37°C, durante 48 horas. Los resultados se evaluaron según los criterios de interpretación de CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017) que incluyen: halos de inhibición  $\geq 20$  mm sensible, 15 -19 mm intermedio y  $\leq 14$ mm resistente.

#### **5.4.3. Evaluación de medio selectivo para *G. vaginalis***

El método desarrollado por Bauer y otros (1966), define si un microorganismo es sensible o resistente por el tamaño del halo de inhibición formado alrededor de sustancias antimicrobianas. Esta prueba semicuantitativa permite seleccionar antimicrobianos efectivos. En esta investigación fue necesario evaluar el efecto de la concentración de neomicina (antibiótico seleccionado en la sección 5.4.2.), que permita el desarrollo de *G. vaginalis* e inhiba LCR35. Para este fin, biomasa de cultivos activos desarrollados en TSA+S+G durante 24 horas, fueron suspendidos en 1mL de PBS (pH 7,2), realizando 2 lavados celulares a 5000 rpm durante 5

minutos. Los pellets fueron resuspendidos en TSB+G hasta obtener concentraciones de  $3 \times 10^8$  ufc/ml y  $6 \times 10^8$  ufc/mL, de *G. vaginalis* y LCR35, respectivamente (concentraciones estandarizadas en la sección 5.4.1.). Posteriormente, se realizaron diluciones y se sembró 100  $\mu$ L en placas de TSA+S+G suplementado con neomicina 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml y 0.025 mg/ml (medio denominado TSA+S+G+N), las cuales fueron incubadas a 37°C en microaerofilia durante 48 horas. Los resultados fueron evaluados en base al recuento de colonias de *G. vaginalis* y la completa inhibición de LCR35, en los medios suplementados con neomicina a las concentraciones descritas, empleando como control positivo placas TSA+S+G sin suplemento de neomicina.

### **5.5. Ensayos cuantitativos de actividad antagónica de LCR35 *in vitro* contra *G. vaginalis***

Para demostrar cuantitativamente la reducción de la carga de *G. vaginalis* por efecto del probiótico, fue necesario evaluar un escenario constituido por cuatro ensayos, en los que se estudió el crecimiento de *G. vaginalis* expuesta a metronidazol (Ensayo 1), el efecto de LCR35 contra *G. vaginalis* sobreviviente a metronidazol (Ensayo 2), el efecto de LCR35 contra *G. vaginalis* en presencia de metronidazol (Ensayo 4) y el efecto antagónico de LCR35 contra *G. vaginalis* (Ensayo 3). Los ensayos fueron realizados a través de la evaluación de la actividad antagónica mediante co-cultivo en caldo de las cepas en estudio, empleando 5 morfotipos de *G. vaginalis* (descritos en la sección 5.3.2.).

#### **5.5.1. Evaluación del crecimiento de *G. vaginalis* expuesta a metronidazol (Ensayo 1)**

Un cultivo activo de 24 horas de *G. vaginalis* desarrollado en TSA+S+G, fue suspendido en 1 mL de PBS (pH 7,2), realizando 2 lavados celulares a 5000 rpm por 5 minutos. El paquete celular fue resuspendido en caldo TSB+G (de composición descrita en la sección 5.1.4.), obteniendo  $3 \times 10^8$  ufc/mL de *G. vaginalis* (población bacteriana estandarizada en la sección 5.4.1). Posteriormente, 1 mL de la suspensión celular fue distribuido en dos microtubos, a los que se adicionó sangre humana (5 % v/v). Uno de los tubos fue suplementado con metronidazol 50  $\mu$ g/mL (Cavera, Volski, & Chikindas, 2015), y el otro con PBS (mismo volumen de metronidazol, tubo control). Se incubaron ambos tubos en microaerofilia a 37°C y se colectaron muestras a las 0, 24 y 48 horas, las cuales fueron diluidas e inoculadas (100  $\mu$ L) en placas de TSA+S+G. Subsecuentemente, las placas fueron incubadas en microaerofilia, a 37°C durante 48

horas, para determinar por recuento de colonias la población de *G. vaginalis* sobreviviente de la exposición a metronidazol en el tiempo.

### **5.5.2. Evaluación de la actividad antagónica de LCR35 contra *G. vaginalis* sobreviviente de la exposición a metronidazol (Ensayo 2)**

En este experimento se evaluó la actividad antagónica de LCR35 contra *G. vaginalis* proveniente del Ensayo 1 (sub-cultivo de *G. vaginalis* proveniente de la exposición a metronidazol), para determinar el efecto de LCR35 en la reducción de la población de *G. vaginalis* viable después del tratamiento con metronidazol.

La evaluación de la actividad antagónica de LCR35 contra *G. vaginalis* se realizó en co-cultivo en caldo de acuerdo a la técnica descrita por (Sung-Mee & Dong-Soon, 2008). Cultivos activos de LCR35 y *G. vaginalis* (Ensayo 1) desarrollados en TSA+S+G, fueron suspendidos en 1 ml de PBS, realizando dos lavados celulares a 5000 rpm durante 5 minutos. Ambos pellets celulares se resuspendieron en 1mL de TSB+G para su co-cultivo en un microtubo, conteniendo  $3 \times 10^8$  ufc/mL y  $6 \times 10^8$  ufc/mL, de *G. vaginalis* y LCR35, respectivamente (concentraciones estandarizadas en la sección 5.4.1.). Microtubos conteniendo solo  $3 \times 10^8$  ufc/mL de *G. vaginalis* o  $6 \times 10^8$  ufc/mL de LCR35 fueron empleados como controles. Posteriormente, todos los microtubos fueron suplementados con sangre humana (5 % v/v). Los mismos se incubaron en microaerofilia a 37°C colectando muestras a las 0, 6, 12, 15, 18, 24 y 48 horas. Estas muestras, fueron diluidas e inoculadas (100 µL) en placas de TSA+S+G+N como medio selectivo para *G. vaginalis* y TSA+S+G como medio para recuento de LCR35 y microtubos control. Todas las placas fueron incubadas en microaerofilia a 37°C durante 48 horas. Posteriormente, se realizó recuento de colonias, para determinar la reducción de la población de *G. vaginalis* y el desarrollo LCR35.

### **5.5.3. Evaluación de la actividad antagónica de LCR35 contra *G. vaginalis* (Ensayo 3)**

La evaluación de la actividad antagónica de LCR35 contra *G. vaginalis*, se realizó según Sung-Mee & Dong-Soon, (2008). Cultivos activos en placa de *G. vaginalis* y LCR35, fueron sometidos al procedimiento descrito en la sección 5.5.2.; con la diferencia que *G. vaginalis* no fue expuesta previamente a metronidazol. Los microtubos se incubaron en microaerofilia a 37°C colectando muestras a las 0, 6, 12, 15, 18, 24 y 48 horas. Estas muestras, fueron diluidas e

inoculadas (100 µL) en placas de TSA+S+G+N como medio selectivo para *G. vaginalis* y TSA+S+G como medio para recuento de LCR35 y microtubos control. Todas las placas fueron incubadas en microaerofilia a 37°C durante 48 horas, posteriormente se realizó recuento de colonias, para determinar la reducción de la población de *G. vaginalis* y el desarrollo de LCR35.

#### **5.5.4. Evaluación de la actividad antagónica de LCR35 contra *G. vaginalis* en presencia de metronidazol (Ensayo 4)**

En este experimento se evaluó la actividad antagónica de LCR35 contra *G. vaginalis* en presencia de metronidazol, para determinar si la actividad antagónica de LCR35, es afectada por metronidazol en dosis habitualmente empleada para el tratamiento de VB.

La evaluación de la actividad antagónica de LCR35 contra *G. vaginalis*, en presencia de metronidazol, se realizó según Sung-Mee & Dong-Soon, (2008). Cultivos activos en placa de *G. vaginalis* y LCR35, fueron sometidos al procedimiento descrito en la sección 5.2.2, con las siguientes modificaciones: al co-cultivo de LCR35 y *G. vaginalis*, se suplementó metronidazol 50 µg/mL y al tubo control de *G. vaginalis* se suplementó 50 µg/mL de PBS (el mismo volumen de metronidazol). Los mismos se incubaron en microaerofilia a 37°C colectando muestras a las 0, 6, 12, 15, 18, 24 y 48 horas. Estas muestras, fueron diluidas e inoculadas (100 µL) en placas de TSA+S+G+N como medio selectivo para *G. vaginalis* y TSA+S+G como medio para recuento de LCR35 y microtubos control.

#### **5.5.5. Evaluación del efecto antagónico de LCR35 frente al banco de cepas *G. vaginalis* nativas, en presencia de metronidazol**

Este ensayo fue realizado con todos los morfotipos de *G. vaginalis*, aislados e identificados como se describe en las secciones (5.1.2.) y (5.1.3). Empleando el procedimiento descrito en la sección (5.5.2.), donde se aplicaron condiciones de tratamiento combinado simultaneo probiótico y metronidazol (Ensayo 4) colectando muestras a las 0, 6, 12, 15, 18 y 24 horas.

## **6. Resultados y discusiones**

### **6.1. *Gardnerella vaginalis* proveniente de muestras infecciosas**

Las infecciones vaginales se caracterizan por un flujo vaginal con síntomas como molestia, ardor, dolor, prurito y mal olor genital, entre otros, y constituyen una de las causas más

frecuentes de consulta ginecológica en mujeres de edad fértil, sexualmente activas (Salas, Ramirez, Ruiz, Torrez, & Jaramillo, 2009). Se ha determinado que más el 90% de los casos de infección es causado por grupos de agentes etiológicos, clasificados por orden de prevalencia en: 1) bacterias anaerobias, entre ellas *G. vaginalis*, *Mobiluncus sp*, *Prevotella sp*, *Mycoplasma hominis*, y otras; 2) Levaduras del género *Candida sp* y 3) parásitos como *Trichomonas vaginalis*, entre otros (Salas, Ramirez, Ruiz, Torrez, & Jaramillo, 2009). Entre las infecciones más frecuentes la VB, es causada por agentes del grupo 1) y se caracteriza por el desbalance de la microbiota vaginal normal, con un decremento de bacterias del género *Lactobacillus sp*, y un incremento de otros anaerobios oportunistas-patógenos, como *G. vaginalis* (Koumans, y otros, 2007). En la presente investigación se evaluaron 150 muestras vaginales, obtenidas entre los meses de marzo a agosto de la gestión 2016, provenientes del Centro Departamental de Vigilancia Información y Referencia, el cual desarrolla un conjunto de actividades orientadas a la promoción, prevención, control y vigilancia epidemiológica de las infecciones de Transmisión Sexual (ITS), VIH y SIDA (Centro Departamental de Vigilancia Información y Referencia, 2017). En este sentido, la afluencia de pacientes mujeres en edad fértil, sexualmente activas, y con síntomas de infección vaginal es frecuente. El diagnóstico de VB desarrollado por el CDVIR, se basa en la verificación de al menos dos de, los cuatro criterios de Amsel y otros (1983) (consensuado por el Simposio Internacional sobre Vaginosis en Estocolmo), los cuales son aceptables para confirmar la enfermedad la presencia de células clave y la prueba positiva de aminas (Thomason, y otros, 1990). La Tabla 6, describe el número de muestras con diagnóstico positivo de VB colectadas durante el tiempo de estudio, reportando una mayor ocurrencia de casos positivos en el mes de junio de la gestión 2016.

Las 150 muestras colectadas presentaron las características descritas anteriormente para el diagnóstico positivo a VB, por lo cual fueron procesadas para el aislamiento de *G. vaginalis*, principal microorganismo causal de la enfermedad. De las 150 muestras procesadas se recuperaron 107 aislados bacterianos con el morfotipo de *G. vaginalis*, desarrollados en Agar Tripton Soya suplementado con sangre humana al 5 % v/v (TSA+S), las cuales presentaron las siguientes características macroscópicas: colonias de 0,3 - 0,5 mm diámetro, borde liso, puntiforme,  $\beta$ -hemólisis difusa. Asimismo, también se observaron características microscópicas como ser: cocobacilos Gram-variables, características típicas de *G. vaginalis* descritas también en estudios previos (Winn, y otros, 2013). En este sentido, se recuperó *G. vaginalis* de alrededor

del 70% de las muestras que fueron positivas al examen directo. Otros criterios no considerados, como pH vaginal y flujo vaginal homogéneo grisáceo-lechoso (Amsel, y otros, 1983), pudieron haber contribuido a una mejor selección de la muestra para aislamiento. Otro de los factores que pudo haber influido en el aislamiento y la recuperación de *G. vaginalis* a partir de las muestras colectadas, fue el medio de cultivo enriquecido empleado, que permitió el desarrollo de otros microorganismos anaerobios o facultativos, con velocidades de crecimiento superiores a *G. vaginalis*, que limitaron su desarrollo imposibilitando su aislamiento, lo cual pudo haber sido corregido empleando medio semi-selectivo como el agar sangre humana con bicapa-Tween (Totten, Amsel, Hale, Piot, & Holmes, 1982).

**Tabla 6**

*Muestras Colectadas del Laboratorio Clínico del CDVIR entre los Meses Marzo hasta Agosto del 2016*

Meses	Muestras con Diagnóstico confirmado de VB	Aislados bacterianos con morfotipo de <i>G. vaginalis</i>
Marzo	27	16
Abril	25	15
Mayo	18	16
Junio	35	26
Julio	22	13
Agosto	23	21
Total	150	107

*Nota.* Fuente: Elaboración propia.

### 6.1.1. Aislados bacterianos identificados como *Gardnerella vaginalis*

La identificación mediante pruebas bioquímicas fue posible en 54 (50%) aislados bacterianos identificados como *G. vaginalis*, otros 9 (8%) aislados exhibieron características bioquímicas similares a *G. vaginalis*, sin embargo, presentaban resistencia a metronidazol (característica poco frecuente en biotipos de *G. vaginalis*). No fue posible la identificación de 44 (41 %) aislados debido a su baja viabilidad durante el proceso de identificación bioquímica (Tabla 7). La identificación definitiva de *G. vaginalis* por pruebas bioquímicas rutinariamente se desarrolla de acuerdo a las reacciones descritas en la Tabla 4 (Winn, y otros, 2013). En este sentido, 54 cepas identificadas como *G. vaginalis*, fueron recuperadas de 150 muestras colectadas, constituyendo el banco de cepas nativas de *G. vaginalis* criopreservadas para

evaluación; otros 9 morfotipos de *G. vaginalis* resistentes a metronidazol no fueron considerados en posteriores experimentos.

**Tabla 7**

*Características Bioquímicas de los Morfotipos de G. vaginalis Aislados*

Número de aislados bacterianos con morfotipo de <i>G. vaginalis</i>	Oxidasa	Catalasa	Glucosa	Manosa	Sacarosa	Manitol	Almidón	Metronidazol	SPS
54	-	-	+	+	+	-	+	S	S
9	-	-	+	+	+	-	+	R	S
44	Aislados no viables/no identificados								
<i>G. vaginalis</i> (Winn, y otros, 2013)									
	-	-	+	+	+	-	+	S	S

*Nota.* +, reacción positiva; -, reacción negativa; S, sensible (halo de inhibición mayor a 12mm para metronidazol y 10 mm para SPS); R, resistente. Fuente: Elaboración propia.

## 6.2. Cepas Probióticas

Las bacterias probióticas provenientes del banco de cepas del IIFB, fueron activadas en medio MRS (CMO359 OXOID) y exhibieron características macroscópicas y microscópicas descritas en la Tabla 8. El cultivo de *Lactobacillus casei rhamnosus* LCR35 desarrollado en medio sólido presenta colonias de 3 – 4 mm de diámetro, a diferencia de *L. acidophilus* DSM-20079 que se desarrolla formando colonias de 1 – 5 mm. Ambas especies de *Lactobacillus* poseen morfología bacilar con tendencia de formar cadenas siendo positivos a la tinción de Gram. En relación a las cepas del género *Bifidobacterium*, el tamaño de las colonias oscila desde 1 a 6 mm, generalmente poseen morfología bacilar con ramificaciones y abultamientos en los extremos, de forma muy variada (letra Y, T y V), siendo positivos a la tinción de Gram. Es importante mencionar que a partir de *B. animalis subsp. lactis* DSM-10140, se obtuvieron 3 morfotipos diferenciados por el tamaño de colonias, denominados morfotipo G, M y P a colonias grandes, medianas y pequeñas, respectivamente. Todos los morfotipos G, M y P de *B. animalis subsp. lactis* DSM-10140 fueron evaluados en ensayos semicuantitativos para determinar su actividad antagónica (sección 6.3.2.).

Existen reportes demostrando que las colonias de *L. acidophilus* DSM-20079 presentan dos variantes morfológicas, una de ellas (S) colonia de borde definido y brillante y otra denominada (R) colonia irregular y opaca (Klaenhammer & Kleeman, 1981), estas variantes

morfológicas también fueron observadas en el presente estudio (Tabla 8). Esta variación se debe a la disociación bacteriana, un fenómeno de cambios observados en la morfología de las colonias bacterianas [denominadas lisa (S), rugosa (R), mucoide (M) o Intermedia (I)] y cambios en las propiedades antigénicas. La alteración morfológica de la colonia es una expresión fenotípica mediada por el ambiente y no así por cambios genéticos. Este fenómeno se puede explicar al observar la morfología de colonias en sub-cultivos con pases entre medios líquido a sólido, ocasionando variaciones morfológicas que pueden estar acompañadas por cambios químicos en la célula, como ser perdida de un polisacárido u otro componente (Braun, 1947).

**Tabla 8**  
*Características Macroscópicas y Microscópicas de Cepas Probióticas*

Cepa probiótica	Código de referencia	Tinción de Gram	Tamaño colonia (mm)	Descripción de las colonias
<i>L. casei rhamnosus</i>	LCR35	+	3 – 4	Blanquecinas, brillantes, convexas, mucoides, ovaladas o redondas, borde liso
<i>L. acidophilus</i>	DSM-20079	+	1 – 5	Blanquecinas, brillantes, convexas, con dos tipos de bordes rugoso (R) y liso (S)
<i>L. casei subsp. casei</i>	DSM-20011	+	1 – 3	Blanquecinas, brillantes, convexas, redondas, borde liso
<i>B. animalis subsp. lactis</i> (G)	DSM-10140	+	5 – 6	Blanquecinas, brillantes, convexas, redondas, borde liso
<i>B. animalis subsp. lactis</i> (M)	DSM-10140	+	4 – 5	Blanquecinas, brillantes, convexas, redondas, borde liso
<i>B. animalis subsp. lactis</i> (P)	DSM-10140	+	4 – 5	Blanquecinas, brillantes, convexas, redondas, borde liso
<i>B. adolescentis</i>	DSM-20083	+	1 – 4	Blanquecinas, brillantes, convexas, redondas, borde liso

Nota. Fuente: Elaboración propia

El género *Bifidobacterium* presenta colonias de diámetros muy variables, redondas y brillantes, a consecuencia de las condiciones de anaerobiosis y en función al medio que se emplee, por consiguiente, para la identificación del género, la morfología de la colonia no es un buen referente (Collado, 2004). Así mismo, esta variación puede ser explicada por el fenómeno anteriormente descrito para *L. acidophilus* DSM-20079 (Braun, 1947).

### **6.3. Actividad antagónica de cepas probióticas frente a *G. vaginalis* por co-cultivo en medio sólido**

#### **6.3.1. Medio óptimo para el co-cultivo en placa de cepas probióticas y *G. vaginalis***

En esta sección se evaluó el crecimiento de cepas probióticas y *G. vaginalis* en co-cultivo, seleccionando el medio que permitió el desarrollo de ambos microorganismos para posteriormente evaluar el efecto antagónico de cepas probióticas frente a *G. vaginalis* en el medio seleccionado. Rutinariamente, se emplean los medios enriquecidos, Agar Soya Triptona (TSA) suplementado con sangre humana (S) al 5% y medio comercial MRS para el cultivo de *G. vaginalis* y cepas probióticas, respectivamente. Es importante destacar que el medio Soya Triptona (CM0129, OXOID) está compuesto por: hidrolizado pancreático de caseína, peptona de soya, fosfato dipotásico, cloruro de sodio y glucosa (2,5 g/L); aporta grandes cantidades de fuente de nitrógeno y carbono para el desarrollo de *G. vaginalis* que carece de mecanismos biosintéticos eficaces, por lo que se considera una bacteria fastidiosa de difícil crecimiento (Dunkelberg & McVeigh, 1969). Así mismo, el medio comercial MRS (CM0359, OXOID) descrito por Man, Rogosa y Sharpe (1960), empleado para el cultivo de probióticos, posee algunos componentes similares al TSA, además, de extracto de carne, extracto de levadura, mono-oleato de sorbitan, acetato de sodio, citrato de triamonio, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso y glucosa (20g/L). Es así, que en estos tipos de medios existe una variación en el aporte de nutrientes. Dado el hecho de que *G. vaginalis* no crece en medio comercial MRS, en el presente estudio se evaluó la alternativa de emplear TSA+S (medio de rutina para *G. vaginalis*) y TSA+S suplementado con 20g/L de glucosa (TSA+S+G), para favorecer el desarrollo de *G. vaginalis* y el metabolismo fermentativo de las cepas probióticas, en co-cultivo en placa. En la Tabla 9, se observan los resultados de la evaluación de dos medios de cultivo TSA+S y TSA+S+G, para el desarrollo de cepas viables probióticas y *G. vaginalis*. Se destaca que, no existe una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en la viabilidad celular ( $\text{Log}_{10} \text{ufc/mL}$ ) para cada una de las cepas, empleando TSA+S o TSA+S+G. No se realizó un análisis estadístico  $\tau$  de student, para evaluar el rendimiento celular alcanzado con el medio MRS comercial, debido a que este no permite el desarrollo de *G. vaginalis*.

A pesar de que se obtuvo una viabilidad celular similar empleando TSA+S y TSA+S+G, se seleccionó el medio TSA+S+G para experimentos subsecuentes, debido a que permitió el desarrollo de colonias más robustas, característica reflejada en el tamaño de colonia (Tabla 9).

No existen reportes del empleo de TSA+S+G como medio de cultivo para *G. vaginalis* y cepas probióticas, sin embargo TSA base suplementado con sangre humana es empleado para el desarrollo de microorganismos fastidiosos (Chen, Abercrombie, Jeffrey, & Leung, 2012), por lo que, en esta investigación se propone emplear este medio de cultivo que favorece el desarrollo de ambos tipos de microorganismos, ya que no afecta drásticamente el rendimiento celular si se compara con medios de referencia TSA+S+G y MRS para *G. vaginalis* y cepas probióticas, respectivamente.

**Tabla 9**

*Viabilidad Celular, Tamaño de las Colonias, de Cepas Probióticas y G. vaginalis, en los Medios de Cultivo TSA+S, TSA+S+G y MRS*

Microorganismo	Medio de cultivo					
	TSA+S		TSA+S+G		MRS comercial	
	Tamaño colonia (mm)	Viabilidad celular (Log10 ufc/mL)	Tamaño colonia (mm)	Viabilidad celular (Log10 ufc/mL)	Tamaño colonia (mm)	Viabilidad celular (Log10 ufc/mL)
<i>Lactobacillus casei rhamnosus</i> LCR35	1 - 2	8,52±0,06	3 - 4	8,47±0,03	3 - 4	8,07±0,04
<i>L. acidophilus</i> DSM-20079	1 - 2	7,72±0,10	1 - 3	7,66±0,26	1 - 5	7,99±0,01
<i>B. animalis subsp. lactis</i> DSM-10140 (G)	1 - 2	7,87±0,16	3 - 4	7,85±0,20	5 - 6	8,13±0,05
<i>B. animalis subsp. lactis</i> DSM-10140 (M)	1 - 2	8,04±0,11	3 - 4	8,05±0,09	4 - 5	8,34±0,06
<i>B. animalis subsp. lactis</i> DSM-10140 (P)	1 - 2	8,14±0,17	3 - 4	8,11±0,28	4 - 5	8,37±0,05
<i>Gardnerella vaginalis</i> Cepa 11307	< 0,5	7,53±0,33	< 0,5	7,51±0,28	N/C	N/C

*Nota.* (N/C) No Crece; TSA+S (Agar Soya Triptona +Sangre 5%); TSA+S+G (Agar Soya Triptona +Sangre 5%+Glucosa20g/L). Fuente: elaboración Propia.

### 6.3.2. Inhibición de *G. vaginalis* en placa y selección de cepas probióticas

Una disminución de la población de lactobacilos en la cavidad vaginal está fuertemente asociada con el desarrollo de VB (Alvarez-Olmos, y otros, 2004), favoreciendo las condiciones para el crecimiento de microorganismos oportunistas y/o patógenos. En la microbiota vaginal de mujeres sanas, se encuentran en equilibrio las poblaciones de *G. vaginalis* y los lactobacilos, junto a otros microorganismos, con una población de lactobacilos que oscila entre  $4,5 \times 10^8$  -  $6,3 \times 10^8$  ufc/mL (Chooruk, y otros, 2013; Jespers, y otros, 2012; Mikamo, Sato, Hayasaki, Hua, & Tamaya, 2000) y de *G. vaginalis* en concentraciones de  $6,3 \times 10^6$  -  $3,7 \times 10^7$  ufc/mL (Mikamo, Sato, Hayasaki, Hua, & Tamaya, 2000; Zariffard, Saifuddin, Sha, & Spear, 2002). Al contrario, en mujeres que padecen VB, las concentraciones de lactobacilos se reducen a  $2 \times 10^5$  -  $8,5 \times 10^6$

ufc/mL (Blackwell, Phillips, Fox, & Barlow, 1983; Hillier, Krohn, Rabe, Klebanoff, & Eschenbach, 1993; Chooruk, y otros, 2013; Zariffard, Saifuddin, Sha, & Spear, 2002) y existe un incremento en la población de *G. vaginalis* que fluctua entre  $1,6 \times 10^8$  -  $2,1 \times 10^8$  ufc/mL (Blackwell, Phillips, Fox, & Barlow, 1983; Spiegel, Amsel, Eschenbach, Schoenknecht, & Holmes, 1980), lo descrito anteriormente se resume en la Figura 2.

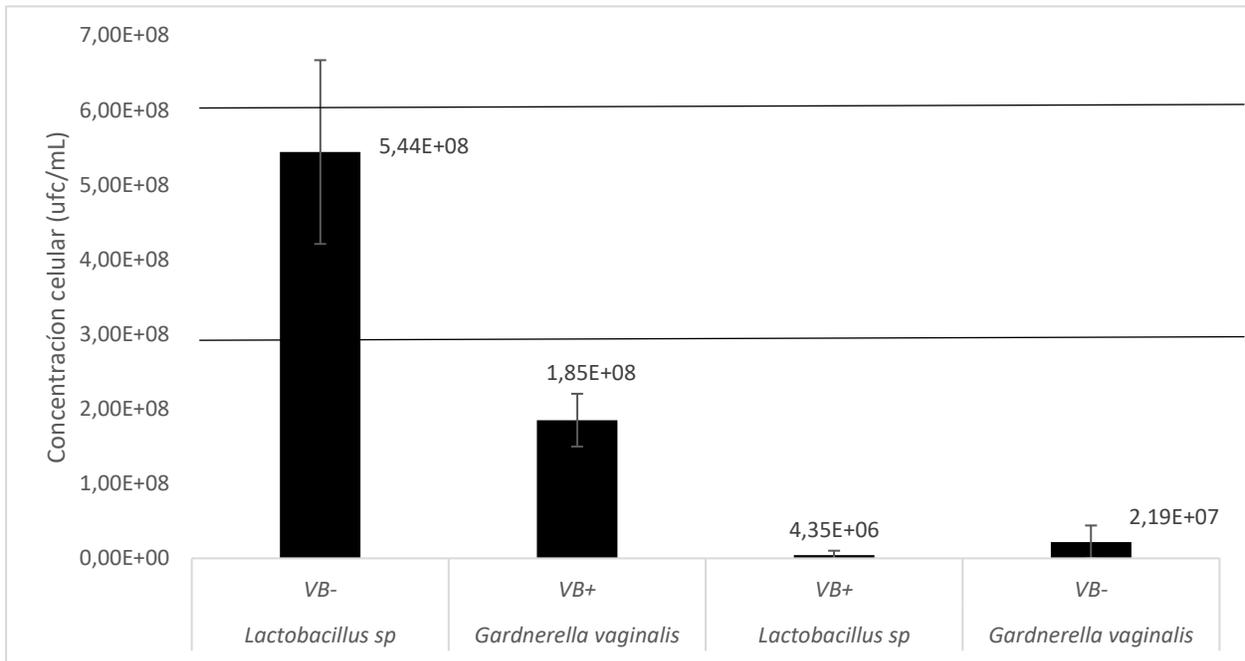


Figura 2. Concentración de *Lactobacillus sp.* y *G. vaginalis* en mujeres sanas (VB-) y con VB (+). Los datos son promedios de resultados reportados en Chooruk, y otros, 2013; Jespers, y otros, 2012; Mikamo, Sato, Hayasaki, Hua, & Tamaya, 2000; Zariffard, Saifuddin, Sha, & Spear, 2002; Blackwell, Phillips, Fox, & Barlow, 1983; Hillier, Krohn, Rabe, Klebanoff, & Eschenbach, 1993; Spiegel, Amsel, Eschenbach, Schoenknecht, & Holmes, 1980; y las barras de error son las desviaciones estándar.

En función de lo anteriormente descrito, para la evaluación de la actividad antagónica de los probióticos frente a cepas nativas de *G. vaginalis* identificadas mediante pruebas bioquímicas en este estudio, se emplearon poblaciones similares a las presentes en dos condiciones reales:  $6 \times 10^8$  ufc/mL de *Lactobacillus sp.*, concentración habitual en mujeres sanas (dosis protectora de lactobacilos) y  $3 \times 10^8$  ufc/mL de *G. vaginalis* concentración habitual en mujeres con VB (dosis infectante de *G. vaginalis*), asumiendo un periodo infeccioso característico por su alta dosis de *G. vaginalis* y el posible uso de un restaurador probiótico con alta dosis del mismo. Otros estudios, también reportan el empleo de una población bacteriana de  $10^8$  ufc/mL de cepas probióticas y patógenos asociados a la vaginosis, con la finalidad de, determinar su efecto antagónico (Coudeyras, Jugie, Vermerie, & Forestier, 2008). Además, es importante destacar

que, el efecto antagónico ocurrió por contacto directo (ambos microorganismos se inocularon en el medio de cultivo al mismo tiempo), a diferencia de otros estudios, donde el probiótico tiene la ventaja de desarrollar durante un tiempo previo, incrementando su concentración celular y posteriormente el microorganismo patógeno/oportunista es expuesto al cultivo desarrollado (McLean & McGroarty, 1996; Soleimani, Kermanshah, Yakhchali, & Sattari, 2010). Por lo expuesto anteriormente, en ensayos cuantitativos, es muy importante determinar, las poblaciones iniciales en co-cultivo de las cepas probióticas y *G. vaginalis*, para la evaluación real del efecto antagónico.

El efecto antagónico generado por las cepas probióticas frente a cepas de *G. vaginalis*, indica su grado de inhibición y se ilustra en la Figura 3, Figura 4 y Figura 5. Este efecto, se evaluó mediante la medición de diámetro de halo, en comparación al del antimicrobiano metronidazol (50 µg) empleado como control agua destilada.

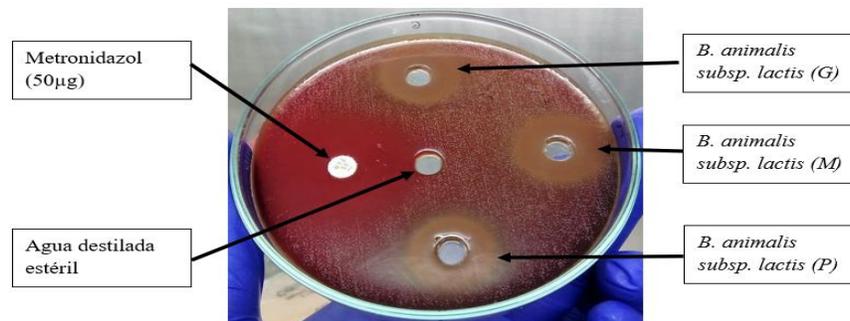


Figura 3. Efecto antagonista en placa de las cepas probióticas *B. animalis* subsp. lactis DSM-10140 (G), (M), (P) frente a *G. vaginalis* (cepa 11307).

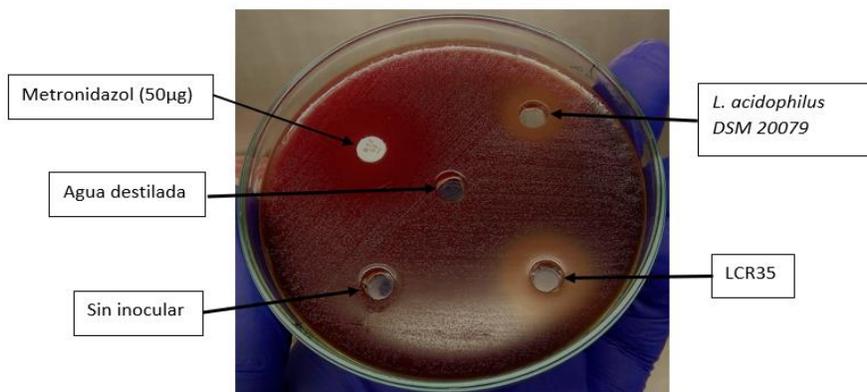


Figura 4. Efecto antagonista en placa de las cepas probióticas LCR35 y *L. acidophilus* DSM-20079 frente a *G. vaginalis* (cepa 11307).

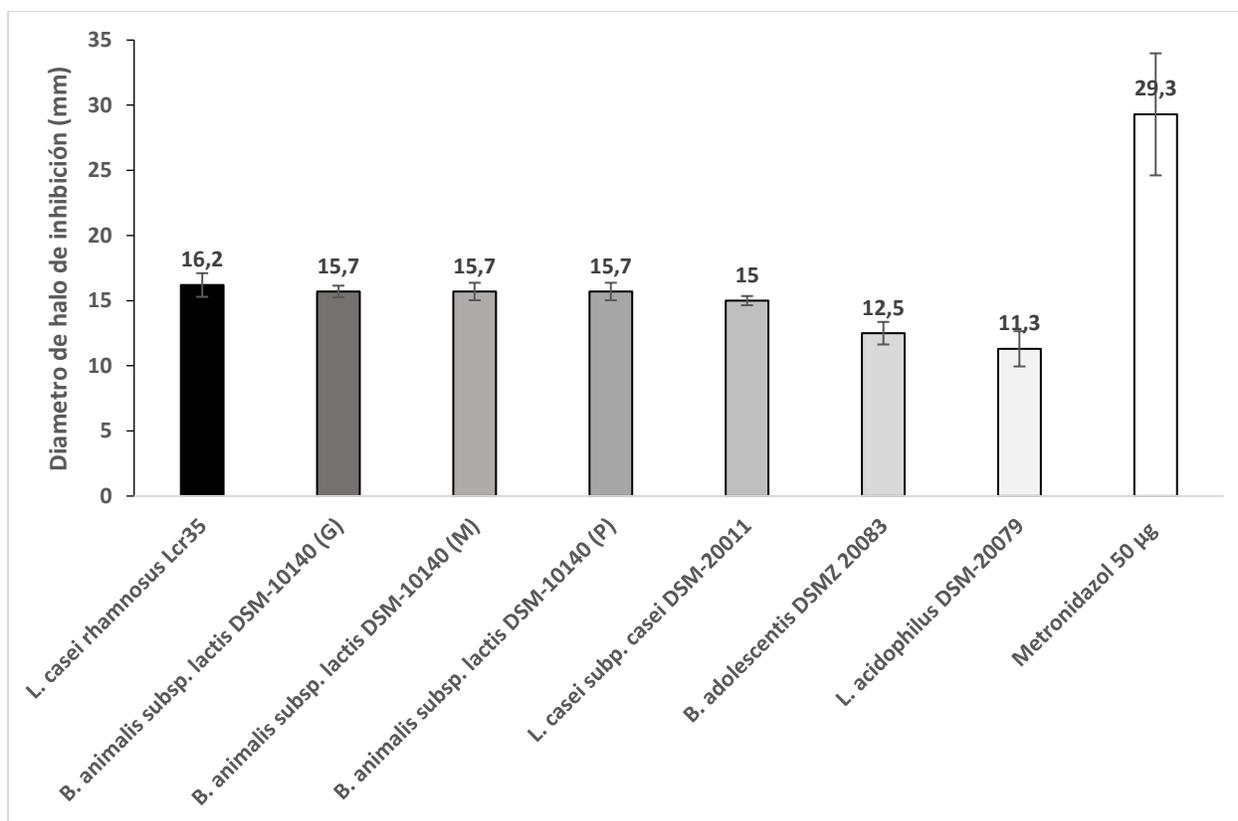


Figura 5. Efecto antagónico generado por las cepas probióticas frente a *G. vaginalis* en co-cultivo en placa. Los datos son promedios de la evaluación de 5 cepas de *G. vaginalis* realizados por duplicado. Las barras de error indican la desviación estándar.

Los resultados obtenidos de la Figura 5, presentan diámetros de inhibición (mm) para *Lactobacillus casei rhamnosus* LCR35 de  $16,2 \pm 0,90$  mm; resultado que difiere con McLean & McGroarty (1996) que reportan halos de inhibición de 30 mm. *B. animalis subsp. lactis* DSM-10140 (G), (M), (P) expresó halos de inhibición de  $15,7 \pm 0,44$ mm;  $15,7 \pm 0,67$ mm;  $15,7 \pm 0,67$ mm; respectivamente y para la cepa probiótica *Lactobacillus casei subsp. casei* DSM-20011,  $15 \pm 0,35$ mm. Entre estas cepas probióticas no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ), en consecuencia, se puede utilizar cualquiera de los probióticos, lo que conlleva, a seleccionar al probiótico de acuerdo a las ventajas y desventajas que presenten. Ahora bien, las cepas probióticas restantes, *B. adolescentis* DSM-20083 ( $12,5 \pm 0,86$ mm) y *L. acidophilus* DSM-20079 ( $11,3 \pm 1,35$ mm) respecto a LCR35, *B. animalis subsp. lactis* y *L. casei subsp. casei*, presentan una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ), según los resultados los halos de inhibición son menores, razón por la cual se descartaron para la evaluación en posteriores experimentos. Por último, el antimicrobiano de control (Metronidazol) presentó un halo de  $29,6 \pm 4,33$ mm, por lo tanto, el

efecto inhibitorio fue el mayor en comparación a las cepas probióticas, además, este resultado concuerda con otras investigaciones donde se reporta  $29 \pm 3,67$ mm de inhibición (McLean & McGroarty, 1996).

Las especies que pertenecen al género *Bifidobacterium* son exigentes nutricionalmente, requieren sustancias biológicas complejas, y son incapaces de desarrollar en medios totalmente sintéticos, la necesidad de anaerobiosis hace que su cultivo sea laborioso (Poch & Bezkorovainy, 1988; Collado, 2004) y dificultoso al momento de formular un suplemento probiótico con células viables. Por otro lado, *Lactobacillus casei subsp. casei* DSM-20011, aislado inicialmente del queso (BacDive, 2017), no es comúnmente empleado como restaurador de la microbiota vaginal. En ese sentido, la cepa probiótica *Lactobacillus casei rhamnosus* LCR35, fue seleccionada para estudios posteriores de actividad antagónica contra cepas nativas de *G. vaginalis*, debido a que, es una de las cepas probióticas que presentó mayor efecto antagónico. Asimismo, LCR35 es constituyente de la microbiota normal, se encuentra habitualmente colonizando tejido humano (Forestier, De Champs, Vatoux, & Joly, 2001), y es producido a nivel industrial por diferentes compañías farmacéuticas (Nivoliez, y otros, 2012). Cabe resaltar que muchos investigadores documentaron las características de LCR35 *in vitro* e *in vivo* (Bohbot & Cardot, 2012; Coudeyras, Jugie, Vermerie, & Forestier, 2008; De Champs, Maroncle, Balestrino, Rich, & Forestier, 2003; Kovachev & Vatcheva-Dobrevska, 2014; Kovachev & Vatcheva-Dobrevska, 2016; Petricevic & Witt, 2008). Sin embargo, no existen estudios de su efectividad contra cepas nativas de *G. vaginalis*, circulantes y causantes de numerosos casos de VB reportados diariamente por el CDVIR en Bolivia (Servicio Departamental de Salud La Paz, 2016).

#### **6.4. Relación entre la viabilidad de LCR35, *G. vaginalis* y su medida turbidimetría**

La determinación de masa celular por métodos indirectos como la turbidimetría óptica, se realiza comparando suspensiones bacterianas con estándares químicos, preparados a partir de reacciones de precipitación con cloruro de bario en presencia de ácido sulfúrico. Este método se basa en la comparación visual, y resulta ser subjetivo y poco preciso, ya que no permite discriminar la población celular viable de la no viable (McFarland, 1907). Por lo tanto, para evaluar la actividad antagónica es imprescindible determinar la concentración de poblaciones bacterianas viables para ensayos cuantitativos, lo cual solo es posible si se determinan unidades

formadoras de colonias (bacterias viables). En la Figura 6 se ilustra la curva de relación del número de células viables en función a la densidad óptica.

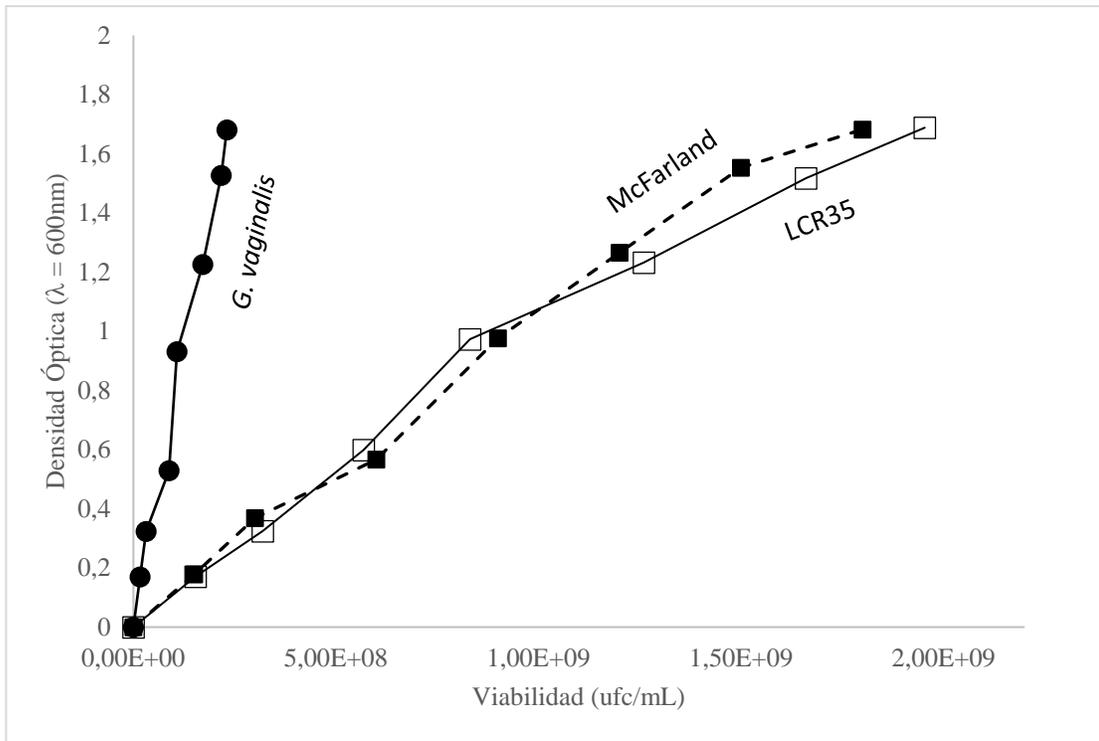


Figura 6. Correlación entre la densidad óptica en función a las ufc/mL de la cepa 11307 de *G. vaginalis* y LCR35.

Los estándares de la escala de McFarland de los tubos N.º: 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 y 6 teóricamente corresponden a una población bacteriana de (expresada en ufc/mL):  $1,5 \times 10^8$ ;  $3,0 \times 10^8$ ;  $6,0 \times 10^8$ ;  $9,0 \times 10^8$ ;  $1,2 \times 10^9$ ;  $1,5 \times 10^9$  y  $1,8 \times 10^9$ , respectivamente (Rojas, 2011). A partir de dichos estándares, se determinaron sus densidades ópticas a 600 nm (Pérez, 2003) y se realizó una curva (Figura 6, en líneas punteadas). Los resultados muestran, que los valores teóricos de ufc/mL de los estándares de la escala de McFarland presentan una correlación con los valores de viabilidad encontrados para LCR35 (en ufc/mL), no existiendo diferencia significativa ( $p > 0,05$ ). Es decir que, para determinar la población bacteriana de la cepa probiótica LCR35 es factible utilizar los valores teóricos de la escala de McFarland. En ese sentido, para alcanzar una población de  $6 \times 10^8$  ufc/mL (concentración de *Lactobacillus* en mujeres sanas sin VB) es necesaria una densidad óptica de 0,61 aprox., siempre que se emplee un cultivo activo de LCR35. Respecto a *G. vaginalis*, existe una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los valores

teóricos de la escala de McFarland y la viabilidad de *G. vaginalis*. Similares densidades celulares determinadas por turbidimetría óptica corresponden a menores poblaciones viables de *G. vaginalis* (Fig. 6). Esto podría estar relacionado a las características intrínsecas de *G. vaginalis*, su morfología y sensibilidad al medio ambiente. No existen otros estudios que reporten un modelo de relación entre la densidad óptica y la viabilidad de *G. vaginalis*. Debido a esta diferencia significativa, se empleó densidades ópticas próximas a 2 para obtener  $3 \times 10^8$  ufc/mL (concentración de *G. vaginalis*) para ensayos subsecuentes.

### **6.5. Perfil de sensibilidad/resistencia a antimicrobianos**

Los antimicrobianos, por sus diversos mecanismos de acción, inhiben a los microorganismos y su eficacia incide en la supresión de la infección. Sin embargo, existen microorganismos con mecanismos de resistencia a los antimicrobianos (Daza, 1998). En Bolivia cuando una mujer presenta un cuadro infeccioso de VB, es incluida en el programa de Atención de Enfermedades de Transmisión Sexual (Ergueta, Evia, & Santivañez, 2012) y se le aplica un esquema preestablecido de tratamiento antimicrobiano que incluye el uso de Metronidazol (2g en dosis única) como tratamiento de elección en mujeres no embarazadas, y Clindamicina (300 mg cada 12 horas durante 7 días) en mujeres embarazadas (Ergueta, Evia, & Santivañez, 2012). A pesar de la eficacia de este esquema, el mismo no considera recurrencia de infecciones, por lo que los microorganismos infecciosos pueden adquirir resistencia a estos antimicrobianos y el tratamiento puede fracasar. Por lo tanto, una evaluación constante de la susceptibilidad a antimicrobianos, guiaría al personal de salud a tomar decisiones acertadas.

En concordancia con la presente investigación, se obtuvo el perfil de sensibilidad y resistencia de LCR35 y *G. vaginalis* a diferentes antimicrobianos ilustrados en la Tabla 10. Los resultados, muestran la sensibilidad de *G. vaginalis* a metronidazol y clindamicina, que también fueron reportados previamente por Knupp de Souza, y otros, (2016). Y en contraposición, LCR35, fue resistente a ambos antimicrobianos (Charteris, Kelly, & Morelli, 1998). El metronidazol tiene un amplio espectro sobre bacterias anaerobias, protozoos y algunas microaerófilas (Vicente & Pérez-Trallero, 2009), este ingresa a la célula por difusión pasiva y, en un ambiente fuertemente reductor, es reducido y activado al recibir un electrón del complejo ferredoxina o flavodoxina, que se libera durante la conversión del piruvato a acetil coenzima A, el metronidazol reducido, desestabiliza la estructura helicoidal del ADN e inhibe la síntesis de ácidos nucleicos, ocasionando así la declinación de los microorganismos (Samuelson, 1999). Por

consiguiente, el tratamiento de elección aplicado en la actualidad, es relativamente efectivo para tratar la VB al ocasionar la declinación de su agente etiológico, sin embargo, se pueden generar mecanismos de resistencia a metronidazol por parte de *G. vaginalis*, datos reportados en otros estudios y que serán discutidos más adelante (Knupp de Souza, y otros, 2016; Tomusiak, Strus, & Heczko, 2011).

**Tabla 10**

*Perfil de Sensibilidad/Resistencia de LCR35 y G. vaginalis*

Antimicrobiano	Concentración	<i>L. casei</i>	<i>G. vaginalis</i>
		<i>rhamonsus</i> LCR35	Cepa 11307
Metronidazol	50 µg	R	S (22mm)
Clindamicina	2 µg	R	S (>30 mm)
Azitromicina	15 µg	R	S (>30 mm)
Eritromicina	15 µg	R	S (>30 mm)
Vancomicina	30 µg	R	S (30 mm)
Lincomicina	2 µg	R	S (>30 mm)
Penicilina	10 UI	R	S (15 mm)
Colistina	10 µg	R	R
<b>*Neomicina</b>	<b>30 µg</b>	<b>S (25 mm)</b>	<b>R</b>
Amikacina	30 µg	S (22 mm)	R (12 mm)
Ciprofloxacina	5 µg	S (24mm)	S (22 mm)
Cefotaxima	30 µg	S (23mm)	S (>30 mm)
Gentamicina	10 µg	S (21 mm)	S (15 mm)
Amoxicilina	30 µg	S (>30mm)	S (>30 mm)
Nitrofurantoina	300 µg	S (>30mm)	S (>30 mm)
Fluconazol	25 µg	S (>30mm)	S (>30 mm)
Clotrimazol	10 µg	S (>30mm)	S (>30 mm)
Nistatina	50 µg	R	R

*Nota:* R (Resistente); S (Sensible)

\*Antimicrobiano seleccionado para estudios subsecuentes. Fuente: Elaboración propia

Respecto a otros antimicrobianos, la vancomicina logra inhibir el desarrollo de *G. vaginalis*, por el contrario, LCR35 es resistente, esto puede ser explicado por la ausencia del

dipéptido D-alanina-D-alanina y la presencia de D-alanina-D-lactato (Elisha & Courvalin, 1995). Además, existe resistencia por parte de ambos microorganismos hacia la colistina, antibiótico con actividad a microorganismos Gram-negativos multirresistentes (Falagas & Kasiakou, 2005). Asimismo, el medio semiselectivo para *G.vaginalis* es el agar sangre humana con bicapa-Tween (Totten, Amsel, Hale, Piot, & Holmes, 1982) que es suplementado con colistina y ácido nalidíxico, en consecuencia, *G.vaginalis* es intrínsecamente resistente a ambos antibióticos, característica evidenciada también en el presente estudio, al ser *G.vaginalis* resistente a colistina. Sin embargo, en esta investigación no se evaluó la resistencia de *G.vaginalis* y LCR35 a ácido nalidíxico. Respecto a ciprofloxacina, se esperaba que *G. vaginalis*, fuera resistente a este antibiótico por pertenecer a la familia de las quinolonas, pero su sensibilidad indica discrepancia con otros estudios (Martínez, y otros, 2004). Por otro lado, la cepa probiótica LCR35 fue sensible a ciprofloxacina, dato concordante con Charteris, Kelly, & Morelli (1998). Además, *G. vaginalis* fue sensible y LCR35 resistente a los siguientes antibióticos: azitromicina, eritromicina, lincomicina y penicilina, dichos antibióticos pueden ser utilizados como alternativa opcional al tratamiento de elección al no inducir la muerte celular del lactobacilo. No obstante, ambas bacterias fueron sensibles a cefotaxima, gentamicina, amoxicilina y nitrofurantoina. Por otra parte, *G. vaginalis* y LCR35 son resistentes a nistatina y sensibles a fluconazol y clotrimazol, antifúngicos utilizados para tratar infecciones vaginales.

Además de aportar información, el perfil de sensibilidad, también tuvo como finalidad seleccionar a un antimicrobiano, con la capacidad de inhibir el crecimiento de LCR35 y permitir el desarrollo de *G. vaginalis*, para evaluar la viabilidad de esta por recuento en placa, cuando es sometida al antagonismo de LCR35. En ese sentido, se evidenció que *G. vaginalis* es resistente a neomicina y este antibiótico inhibe totalmente el desarrollo de LCR35 (Figura 7). Alternativamente, amikacina también inhibe el desarrollo de LCR35, y *G. vaginalis* es resistente, sin embargo, en esta investigación amikacina no fue considerada para estudios de actividad antagónica, debido al halo de inhibición producido (12mm para *G. vaginalis*), muy cercano al límite que indica sensibilidad ( $\geq 14$ mm, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017), rango poco confiable para evaluar el efecto antagónico de LCR35 sobre *G. vaginalis*.

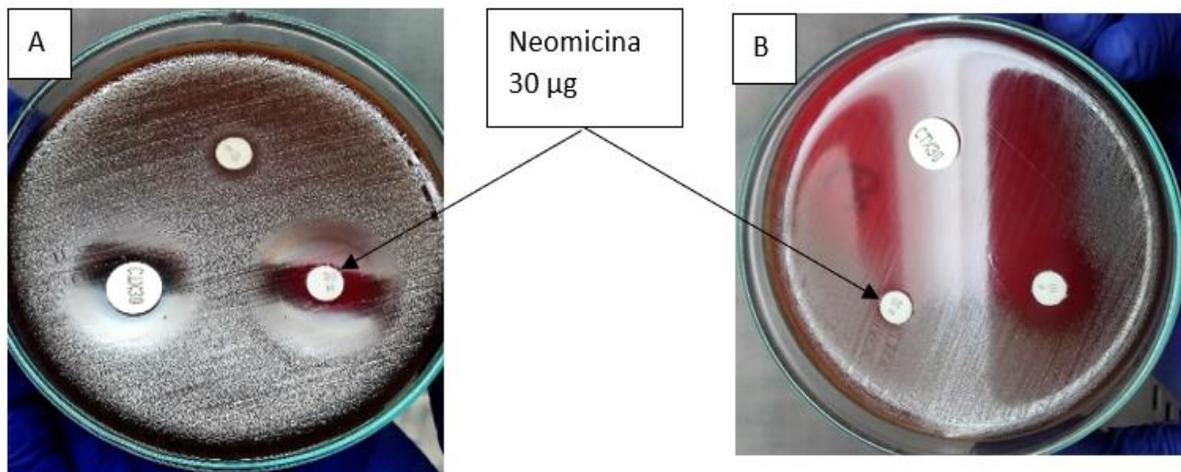


Figura 7. (A) Sensibilidad de LCR35 a neomicina (30µg), (B) Resistencia de *G. vaginalis* a neomicina (30µg)

La determinación del efecto antagónico de LCR35 frente a *G. vaginalis*, ambas en co-cultivo en medio líquido, se fundamenta en la cuantificación de la reducción de la población bacteriana de *G. vaginalis* en el tiempo, para ello es necesario emplear un medio selectivo para *G. vaginalis* que permita el recuento exclusivo de sus colonias, sin la existencia de interferencias que afecten la fidelidad de los resultados. Según el perfil de sensibilidad y resistencia (Tabla 10), se seleccionó neomicina como agente de selección en el medio de cultivo (TSA+S+G). Sin embargo, fue necesario evaluar concentraciones del antibiótico para su optimización. Los resultados muestran que cuando el medio de cultivo TSA+S+G no se encuentra suplementado con neomicina, existe el desarrollo simultáneo de LCR35 y *G. vaginalis* ( $8,84 \pm 0,12$  y  $8,54 \pm 0,06$  Log<sub>10</sub> ufc/mL respectivamente) (Tabla 11). Ahora bien, cuando el medio de cultivo es suplementado con neomicina a concentraciones de 0,025 a 1 mg/mL, el desarrollo de LCR35 es completamente inhibido, por el contrario, existe desarrollo de *G. vaginalis*. Por consiguiente, se utilizó, la mínima concentración (0,025 mg/mL de neomicina), para realizar los protocolos de evaluación de la actividad antagónica de LCR35 frente a cepas nativas de *G. vaginalis*.

El efecto bactericida de la neomicina, radica en la inhibición de la síntesis de proteínas a nivel de subunidad 30 S de los ribosomas además induce lecturas erróneas del RNAm, debido a que puede penetrar en las células por un sistema de transporte activo dependiente de oxígeno.

**Tabla 11.**

*Viabilidad de LCR35 y G. vaginalis en TSA+S+G Suplementado con Diferentes Concentraciones de Neomicina*

Medio de cultivo	LCR35 Viabilidad (Log10 ufc/mL)	<i>G. vaginales</i> Cepa 11307 Viabilidad (Log10 ufc/mL)
TSA+S+G sin neomicina	8,84±0,12	8,54±0,06
TSA+S+G y neomicina al 0,1 mg/mL	0	8,57±0,07
TSA+S+G y neomicina al 0,05 mg/mL	0	8,50±0,10
TSA+S+G y neomicina al 0,025 mg/mL	0	8,57±0,02

*Nota.* Fuente: Elaboración Propia

### 6.6. Reducción de poblaciones nativas de *Gardnerella vaginalis* bajo diferentes escenarios

La prevención y el tratamiento de VB, documentado en varios estudios, involucran el uso de agentes químicos y/o biológicos que tienen como función reducir poblaciones nativas de *G. vaginalis* que habitan la mucosa vaginal (Mur, Mateo, Ramírez, & Vela, 2016). En Bolivia comúnmente se utiliza metronidazol como agente químico de elección (Ergueta, Evia, & Santivañez, 2012), debido al amplio espectro que presenta (protozoos, bacterias anaerobias y facultativas). Asimismo, en otros países se utilizan probióticos del género *Lactobacillus* en tratamiento combinado con metronidazol o post-tratamiento (Palmeira de Oliveira, Palmeira de Oliveira, & Palmeira de Oliveira, 2015; Krauss-Silva, y otros, 2011). A pesar de recetarse y expendirse probióticos como post tratamiento en VB, no existen estudios que evalúen la efectividad de ambos agentes, tanto de metronidazol como la cepa probiótica LCR35, sobre cepas circulantes nativas de *G. vaginalis* en nuestro medio. En ese sentido, la presente investigación contempla la evaluación de la reducción de poblaciones de *G. vaginalis*, bajo 4 escenarios que representan las condiciones en las que estos agentes antimicrobianos podrían prescribirse de forma combinada o independiente, estos incluyen: efecto de metronidazol en la reducción de población de *G. vaginalis* (tratamiento habitual en caso de BV, Ensayo 1), efecto de LCR35 en la reducción de la población de *G. vaginalis* sobreviviente a la exposición a metronidazol (tratamiento combinado no simultaneo: prescripción de probiótico después un tratamiento con metronidazol, Ensayo 2), efecto de LCR35 contra *G. vaginalis* (tratamiento alternativo al metronidazol en caso de VB, Ensayo 3) y efecto de LCR35 contra *G. vaginalis* en

presencia de metronidazol (tratamiento combinado simultaneo probiótico y metronidazol, Ensayo 4). Esta comparación de condiciones de tratamiento podría encaminar a la elección del más efectivo y/o adecuado, en caso de VB.

### 6.7.1. Efecto del metronidazol frente a *G. vaginalis* (Ensayo 1)

El metronidazol tiene un amplio espectro contra bacterias anaerobias propias de la microbiota vaginal como ser: *Prevotella sp.*, *Porphyromonas sp.*, *Bacteroides sp.*, *Mycoplasma hominis*, *A. vaginalis* y *G. vaginalis* (uno de los agentes etiológicos más importantes en la VB) (Shipitsyna, y otros, 2013). Sin embargo, los lactobacilos son resistentes a su actividad inhibitoria (Danielsen & Wind, 2003), en efecto, es el antimicrobiano estándar para tratar la VB, pese a estudios que reportan el incremento de la resistencia de *G. vaginalis* (Tomusiak, Strus, & Heczko, 2011; Knupp de Souza, y otros, 2016). Para el tratamiento de VB en mujeres en edad fértil, se administra 2g de metronidazol por vía oral en dosis única (Ergueta, Evia, & Santivañez, 2012), esa dosis administrada, equivale a una concentración sérica de 40 µg/mL después de 1 a 2 horas de absorción (Vicente & Pérez-Trallero, 2009). Asimismo, otros estudios reportan la concentración mínima inhibitoria (CIM) de metronidazol es 50 µg/mL para *G. vaginalis* (Cavera, Volski, & Chikindas, 2015). En el presente estudio se evaluó la actividad inhibitoria de 50 µg/mL de metronidazol frente a la concentración de *G. vaginalis* reportada en cuadros infecciosos de VB ( $3 \times 10^8$  ufc/mL), empleando como control la dosis infectante de *G. vaginalis*, en ausencia de metronidazol. Los resultados que se muestran en la Figura 8, presentan una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre las poblaciones de *G. vaginalis* expuestas a Metronidazol (50µg/mL) y el control. Asimismo, inicialmente existió una población de *G. vaginalis* equivalente a la dosis infectante aproximadamente,  $8,4 \pm 0,04$  ciclos logarítmicos ( $2,98 \times 10^8$  ufc/mL) tanto en el experimento como en el control (tiempo 0). A las 24 horas, la población de *G. vaginalis* sometida a metronidazol, es reducida a  $7,45 \pm 0,05$  ciclos logarítmicos ( $2,82 \times 10^7$  ufc/mL) a diferencia del control que mantiene su concentración con una ligera disminución.

Ahora bien, a las 48 horas, la población de *G. vaginalis* expuesta a metronidazol se redujo hasta  $6,3 \pm 0,07$  ciclos logarítmicos ( $2,09 \times 10^6$  ufc/mL) y la población control de *G. vaginalis*, se redujo a  $7,24 \pm 0,15$  ciclos logarítmicos ( $1,58 \times 10^7$  ufc/mL). Por lo tanto, en condiciones *in vitro*, cuando *G. vaginalis* es sometida al antimicrobiano existe una disminución de 2,16 ciclos logarítmicos ( $1,47 \times 10^2$  ufc/mL) hasta las 48 horas, sin embargo, cuando *G. vaginalis* no está en

contacto con el antimicrobiano, existe una reducción de 1,23 ciclos logarítmicos ( $1,71 \times 10^1$  ufc/mL), Por otro lado, a pesar de que, la evaluación de la actividad inhibitoria en medio solido (sección 6.3.2.) reflejó que el metronidazol presentó el mayor efecto antagonista con un halo de inhibición de 29,3 mm, se podría esperar que este antimicrobiano elimine totalmente la dosis infectante de *G. vaginalis* en un medio de cultivo líquido. Sin embargo, este ensayo permitió evidenciar que existe una población de *G. vaginalis* nativa sobreviviente, esto sugiere que se evalúe la efectividad de este antimicrobiano en condiciones más controladas y otras alternativas de tratamiento.

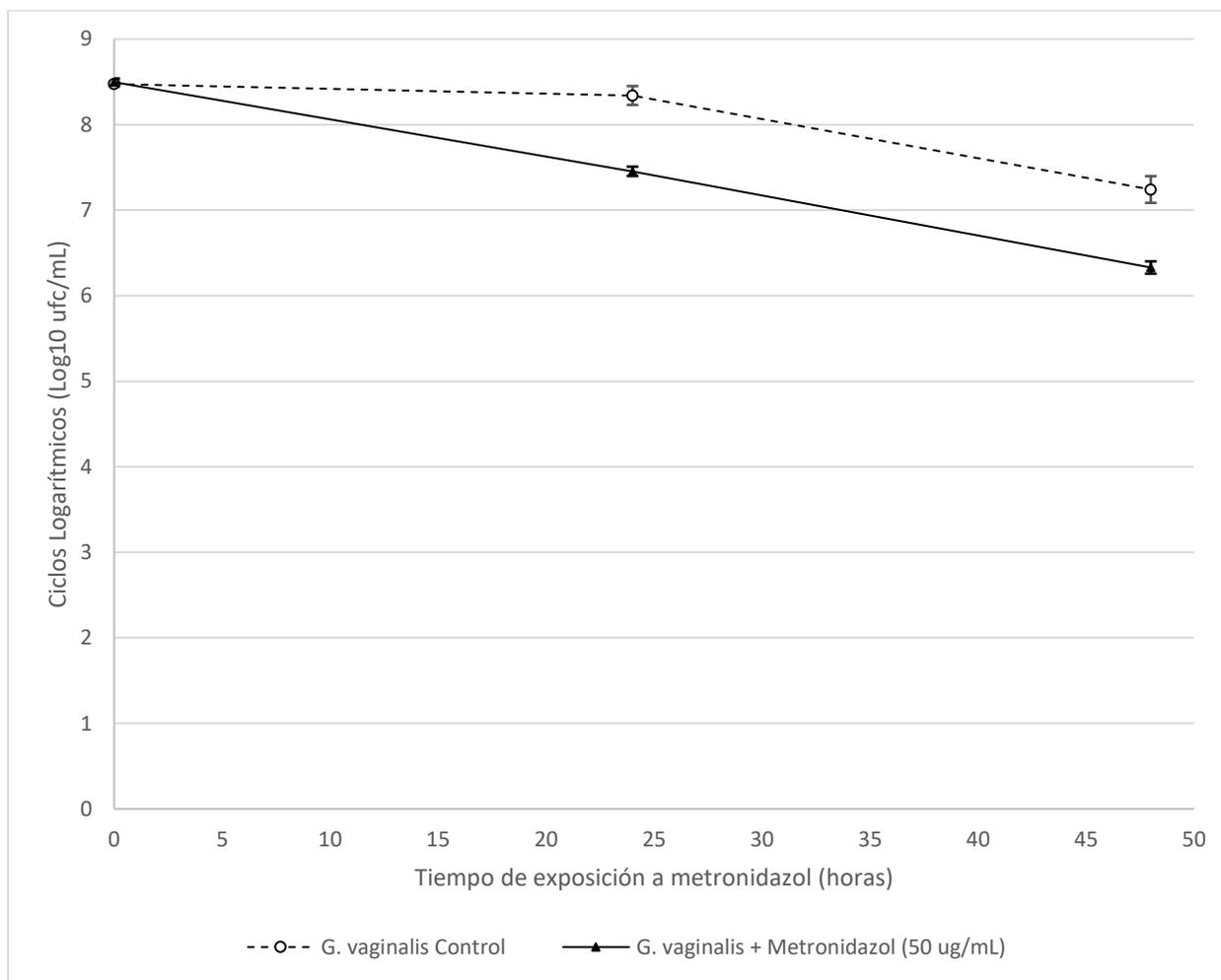


Figura 8. Reducción de la población *G. vaginalis* en función al tiempo de exposición a metronidazol (50µg/mL). *G. vaginalis* se expuso a metronidazol durante 48 horas de incubación en microaerofilia. Cada valor mostrado es la media de tres experimentos ( $\pm$  desviación estándar), se utilizaron 5 biotipos de *G. vaginalis* nativas, se determinó la reducción de ciclos logarítmicos (Log10 de ufc/mL) a las 0, 24 y 48 horas.

Un estudio, mediante la prueba de Etest (Jaramillo, 1998), evaluó cepas de *G. vaginalis*, reportando que el 68,7% (46 de 76 pacientes) fueron resistentes a metronidazol y recomienda en

futuros periodos cambiar el esquema de tratamiento (Tomusiak, Strus, & Heczko, 2011). Asimismo, se han reportado estudios *in vitro* de resistencia de *G. vaginalis* a metronidazol, según diversas investigaciones, se observa una resistencia del 29% (Goldstein, y otros, 2002), 68% (Austin, Meyn, & Hillier, 2006) y 70% (Teixeira, y otros, 2010). En ese sentido, nuestros resultados también reflejan esa capacidad alta de sobrevivir al efecto del metronidazol, dicha resistencia se está reportando cada vez más en todo el mundo (Nagaraja, 2008), Se ha reportado que la resistencia de *G. vaginalis* a metronidazol, está asociada a la incapacidad de activar a dicho antimicrobiano, por efecto de proteínas de transporte de electrones con potencial redox significativamente negativo (Land & Johnson, 1999; Samuelson, 1999), esa explicación podría sostener la supervivencia de *G. vaginalis* determinada en este estudio.

### **6.7.2. Efecto antagónico de LCR35 contra *G. vaginalis* sobrevivientes a metronidazol**

#### **(Ensayo 2)**

El efecto de LCR35 en la reducción de la población de *G. vaginalis* previamente expuesta a metronidazol (tratamiento combinado no simultaneo: prescripción de probiótico después de un tratamiento con metronidazol), se evaluó por la reducción de la población de *G. vaginalis* sobrevivientes al tratamiento con metronidazol. Los resultados se muestran en la Figura 9, y permitieron evidenciar que desde el tiempo inicial (0 horas) existe una reducción gradual en relación a los ciclos logarítmicos, de  $8,57 \pm 0,04$  ( $3,76 \times 10^8$  ufc/mL) a  $6,53 \pm 0,33$  ( $3,47 \times 10^6$  ufc/mL) de la población de *G. vaginalis* sobreviviente al efecto del metronidazol, hasta las 6 horas. Interesantemente, a las 12 horas se registra una pérdida total de la viabilidad de *G. vaginalis*, monitoreada hasta las 48 horas. El control empleado, cultivo axénico de *G. vaginalis* sobreviviente a metronidazol, al no ser sometido al efecto antagónico de LCR35 presenta una leve reducción de la viabilidad de  $8,52 \pm 0,03$  ( $3,32 \times 10^8$  ufc/ml) a  $7,78 \pm 0,16$  ( $6,13 \times 10^7$  ufc/mL) durante 48 horas de incubación. Además, los resultados indican, que no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ), en la población de LCR35 co-cultivado con *G. vaginalis* y la población LCR35 control, que inicia con  $8,7 \pm 0,04$  ciclos logarítmicos ( $5,01 \times 10^8$  ufc/mL) y hasta las 48 horas, se registra  $8,9 \pm 0,05$  ( $7,94 \times 10^8$  ufc/mL) aproximadamente, demostrando que *G. vaginalis* no influye en el desarrollo de LCR35 microorganismo probiótico sugerido como alternativa de tratamiento post-metronidazol. Además, según los resultados obtenidos con este ensayo, aun, no se podría aseverar que el probiótico tiene un efecto antagónico mayor al metronidazol, puesto

que, los biotipos de *G. vaginalis*, fueron previamente expuestos a metronidazol por lo que posiblemente pudieron presentar daño celular y mayor sensibilidad al efecto probiótico, caso que será discutido en el ensayo 3.

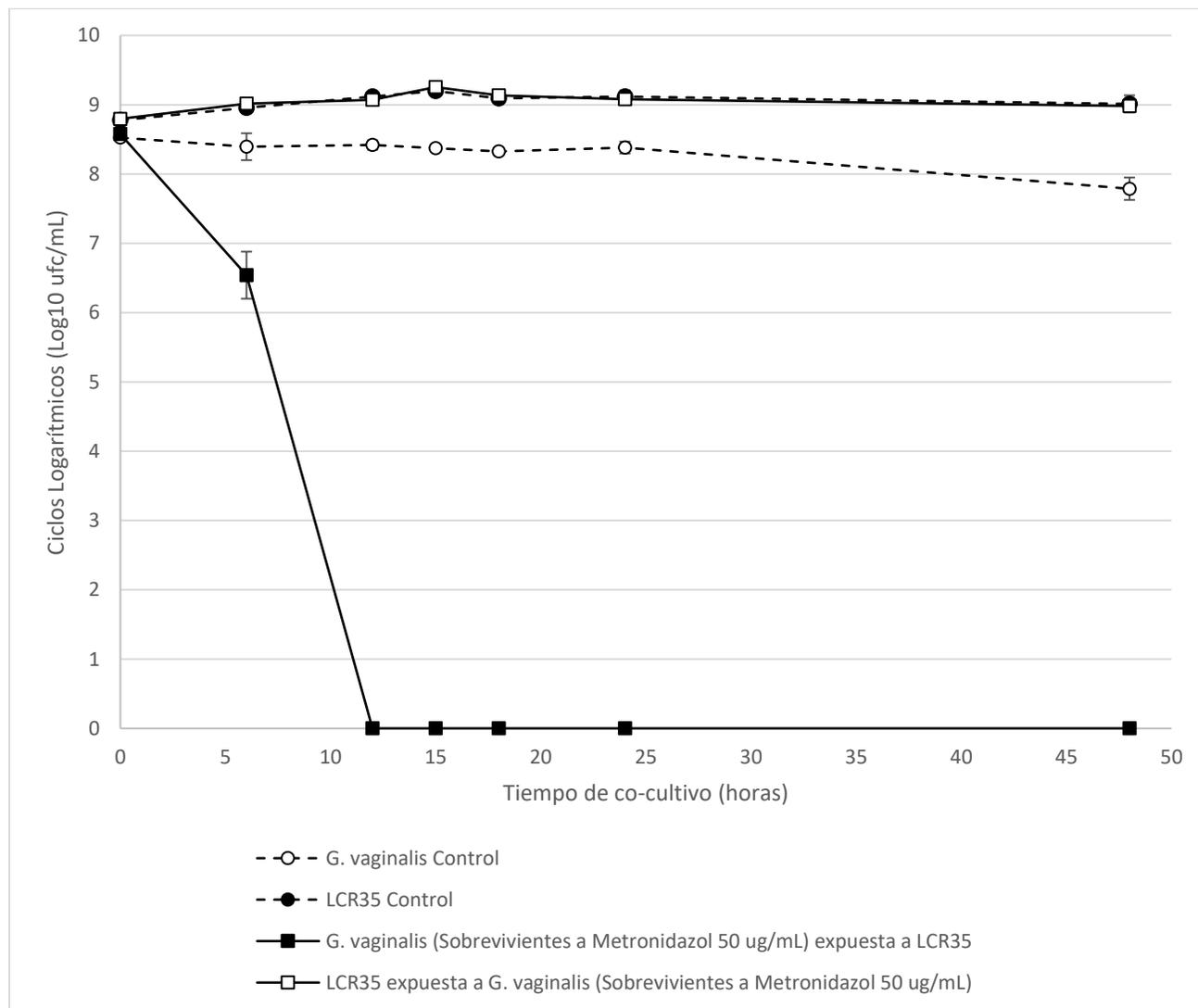


Figura 9. Efecto de LCR35 en la viabilidad de *G. vaginalis* sobrevivientes a metronidazol, en función al tiempo de co-cultivo. *G. vaginalis* se co-cultivo con LCR35 durante 48 horas en microaerofilia. Cada valor mostrado es la media de tres experimentos ( $\pm$  desviación estándar), se utilizaron 5 biotipos de *G. vaginalis* para determinar la reducción de los ciclos logarítmicos (Log10 ufc/mL) a las 0, 6, 12, 15, 18, 24 y 48 horas.

### 6.7.3. Efecto antagonístico de LCR35 contra *G. vaginalis* (Ensayo 3)

Para la evaluación del efecto antagonístico de LCR35 contra *G. vaginalis* (tratamiento probiótico alternativo al metronidazol en caso de VB), se procedió de manera similar a la sección previa, co-cultivando LCR35 con *G. vaginalis*, no expuesta previamente a metronidazol. Los resultados se muestran en la Figura 10, donde *G. vaginalis* co-cultivado con LCR35 presenta una

disminución gradual de ciclos logarítmicos, de  $8,5 \pm 0,06$  ( $3,23 \times 10^8$  ufc/mL) (0horas) a  $7,7 \pm 0,11$  ( $5,02 \times 10^7$  ufc/mL), a las 6 horas de co-cultivo. Además, dicha población disminuye a  $6,05 \pm 0,16$  ( $1,13 \times 10^6$  ufc/mL) y  $3,84 \pm 0,09$  ( $7,04 \times 10^3$  ufc/mL) ciclos logarítmicos a las 12 y 15 horas de co-cultivo. Interesantemente, a las 18 horas, se reduce totalmente la población de *G. vaginalis* no existiendo células viables de *G. vaginalis*. Asimismo, el control de *G. vaginalis* de población similar  $8,5 \pm 0,06$  ( $3,17 \times 10^8$  ufc/mL) reduce levemente su población hasta las 48 horas de incubación, a una concentración final de  $6,91 \pm 0,28$  ciclos logarítmicos ( $8,24 \times 10^6$  ufc/mL). Respecto a la evaluación de la población de LCR35 en co-cultivo con *G. vaginalis* su concentración incrementa levemente de  $8,7 \pm 0,08$  ciclos logarítmicos ( $5,41 \times 10^8$  ufc/mL) a  $9,31 \pm 0,03$  ciclos logarítmicos ( $2,04 \times 10^9$  ufc/mL) a las 15 horas, y posteriormente se reduce a  $8,98 \pm 0,15$  ciclos logarítmicos ( $9,62 \times 10^8$  ufc/mL) a las 48 horas. Asimismo, respecto a LCR35 control, no existe una diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) con LCR35 co-cultivado con *G. vaginalis*, en relación a los ciclos logarítmicos.

Comparando, *G. vaginalis* sobreviviente a metronidazol co-cultivada con LCR35 (ensayo 2), y *G. vaginalis* co-cultivada con LCR35 (ensayo 3). Se logra evidenciar, la actividad antagónica de LCR35 para lograr la total reducción de la población de *G. vaginalis* a las 12 horas (ensayo 2) y a las 18 horas (ensayo 3). La posible explicación de esta diferencia de tiempos puede fundamentarse en la previa exposición de las cepas nativas de *G. vaginalis* al antimicrobiano, cuyo efecto indicaría un daño celular en *G. vaginalis* para que sea más susceptible al efecto antagonista de LCR35, dicho resultado difiere de la investigación de McLean & McGroarty (1996), donde cepas de *G. vaginalis* sensibles a metronidazol, después de 5 subcultivos con exposición a metronidazol adquirieron resistencia al antimicrobiano, dichas cepas fueron menos susceptibles a la actividad antagónica de los lactobacilos. Sin embargo, cabe destacar que las cepas nativas de *G. vaginalis* evaluadas fueron sometidas a una solá exposición a metronidazol, por lo cual definitivamente no podría compararse este efecto. Por otro lado, otros investigadores reportan que, el efecto antagónico de una cepa del género *Lactobacillus*, frente a *G. vaginalis* se manifiesta en la primera hora de exposición en co-cultivo (Atassi, Brassart, Grob, Graf, & Servin, 2006).

Por otro lado, se ha reportado que la actividad antagónica de LCR35 en co-cultivo con *G. vaginalis* es posible entre las 8 y 24 horas, asimismo, en ningún caso existe efecto antagónico

contra LCR35, debido a que el número de células viables de LCR35 fue consistente, resultados concordantes con la presente investigación (Coudeyras, Jugie, Vermerie, & Forestier, 2008).

Existen varios estudios que atribuyen que los lactobacilos proporcionan una barrera natural contra potenciales microorganismos patógenos incluyendo *G. vaginalis* (López & Domingo, 2007), dicho efecto benéfico puede ser explicado por diferentes mecanismos, entre ellos, competición con bacterias patógenas por los sitios de adhesión y por los nutrientes, modificación del pH debido a la segregación del ácidos orgánicos principalmente lactato, acetato, propionato y butirato, producción de sustancias antimicrobianas como bacteriocinas y peróxido de hidrogeno (Rodríguez, Camuesco, Zarzuelo, & Gálvez, 2008). Otro factor distinto a los mecanismos mencionados anteriormente, es la cantidad de biomasa presente en la cavidad vaginal de cepas pertenecientes al género *Lactobacillus*. Según Aroutcheva, y otros (2001), la biomasa o el número de bacterias esta relacionado con respecto a la concentración de ácidos orgánicos producidos, por lo tanto, la presencia de *Lactobacillus* y su capacidad para producir ácido lactico y otros, no es el único factor importante para mantener el ecosistema vaginal saludable, también es importante el crecimiento activo dado por el incremento en el número de bacterias. Dicho postulado, se logró verificar en la presente investigación (datos no mostrados), donde se co-cultivaron, *G. vaginalis* sobreviviente a metronidazol (ensayo 2) y LCR35, ambas poblaciones a una concentración de 6 ciclos logarítmicos (a diferencia del presente ensayo, donde las poblaciones oscilan alrededor de 8 ciclos logarítmicos). Los resultados obtenidos mostraron que, hasta las 24 horas, la población de *G. vaginalis* sobrevivientes a metronidazol, logro mantener su concentración  $6,27 \pm 0,16$  ciclos logarítmicos ( $1,88 \times 10^6$  ufc/mL), en otras palabras, LCR35 no logro la disminución total de *G. vaginalis*, como ocurre en el co-cultivo de la dosis infectante de *G. vaginalis* ( $3 \times 10^8$  ufc/mL) y la dosis protectora de LCR35 ( $6 \times 10^8$  ufc/mL) (ensayo 3) contrariamente, la disminución total de *G. vaginalis*, se registró a las 48 horas (datos mostrados en el Anexo 2). En efecto, hasta ese momento, se especuló que *G. vaginalis* sobreviviente a metronidazol (50  $\mu$ g/mL), debido a la previa exposición al antimicrobiano, obtuvo la capacidad de ser resistente al efecto antagonista de LCR35, cuya hipótesis fue descartada en el ensayo 2 (la completa extinción de *G.vaginalis* fue a las 12 horas). En consecuencia, se sugiere evaluar el efecto antagonista de otras cepas probióticas utilizando la dosis infectante de *G. vaginalis* ( $3 \times 10^8$  ufc/mL) y la dosis protectora de los lactobacilos ( $6 \times 10^8$  ufc/mL) o inclusive dosis mayores, que garanticen la eliminación total de *G. vaginalis*.

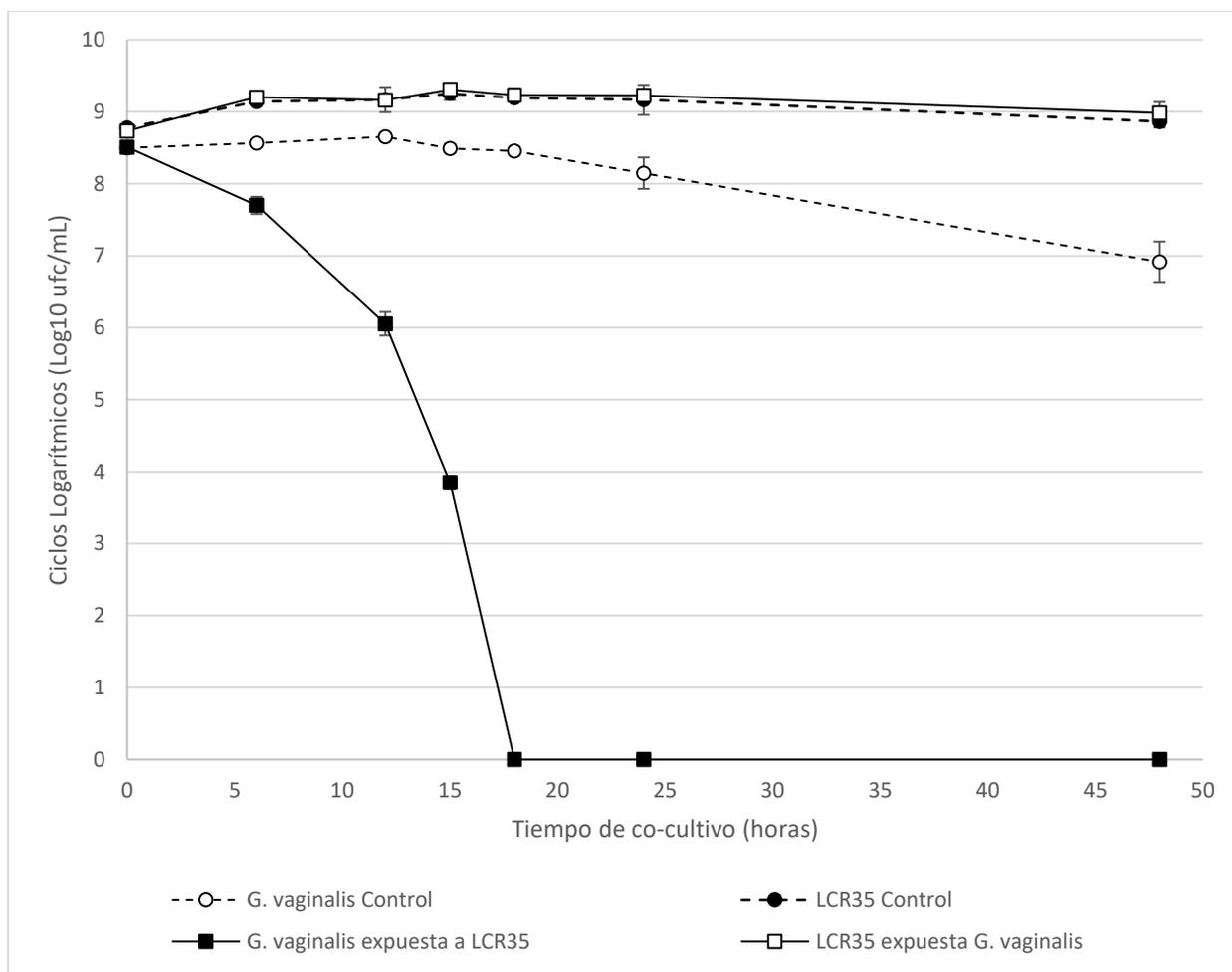


Figura 10. Efecto de LCR35 en la viabilidad de *G. vaginalis*, en función al tiempo de co-cultivo. *G. vaginalis* se incubo con y sin LCR35 durante 48 horas en microaerofilia. Cada valor mostrado es la media de tres experimentos ( $\pm$  desviación estándar), se utilizaron 5 biotipos de *G. vaginalis* para determinar la reducción de los ciclos logarítmicos ( $\text{Log}_{10}$  ufc/mL) a las 0, 6, 12, 15, 18, 24 y 48 horas.

Por lo tanto, se podría afirmar que la previa exposición de metronidazol a *G. vaginalis*, causa un daño celular, haciendo que la población de *G. vaginalis* sea más vulnerable al efecto antagónico de LCR35. Asimismo, el presente estudio, no contempló, determinar la naturaleza de la sustancia inhibitoria. No obstante, existen otros estudios con este fin, por ejemplo, McLean & McGroarty (1996), concluyen, que el pH ácido y el peróxido de hidrógeno son la causa del 60 al 90 % de la actividad inhibitoria. Igualmente, otros investigadores, atribuyen, al ácido láctico, por el hecho de mantener un pH ácido en el ecosistema vaginal, eliminando a las bacterias causantes de la VB (Aroutcheva, y otros, 2001).

#### 6.7.4. Efecto antagónico de LCR35 contra *G. vaginalis* en presencia de metronidazol (Ensayo 4)

El efecto antagónico de LCR35 contra *G. vaginalis*, en presencia de metronidazol (tratamiento combinado simultáneo: probiótico y metronidazol), fue evaluado por la reducción de la población de *G. vaginalis* (Figura 11). Los resultados muestran una disminución gradual de *G. vaginalis* co-cultivada con LCR35 y metronidazol (50µg/mL). Al respecto, inicialmente se reportó  $8,49 \pm 0,07$  ciclos logarítmicos ( $3,09 \times 10^8$  ufc/mL), pero, a medida que transcurrió el tiempo, los ciclos logarítmicos descienden;  $7,71 \pm 0,15$  ( $5,14 \times 10^7$  ufc/mL),  $5,64 \pm 0,17$  ( $4,37 \times 10^5$  ufc/mL),  $2,22 \pm 0,23$  ( $1,68 \times 10^2$  ufc/mL) a las 6, 12 y 15 horas respectivamente. En ese sentido, a las 18 horas se observa la completa reducción de la población de *G. vaginalis*. Por otro lado, la concentración de LCR35 co-cultivada con *G. vaginalis* en presencia de metronidazol, inicia con  $8,71 \pm 0,07$  ciclos logarítmicos ( $5,16 \times 10^8$  ufc/mL), finalizando con  $8,86 \pm 0,08$  ciclos logarítmicos ( $5,79 \times 10^8$  ufc/ml) a las 48 horas. Los resultados del ensayo 3 y de la presente sección (ensayo 4), presentaron un grado de eficacia similar, demostrando eliminación de la población de *G. vaginalis* a las 18 horas, además, no existe una diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre los ensayos 3 y 4. Por consiguiente, la administración en monoterapia de probiótico, en comparación con la administración simultánea de probiótico y antimicrobiano tienen la misma efectividad antagónica. Dicha actividad antagónica ejercida sobre *G. vaginalis* en condiciones *in vitro*, es atribuible a LCR35, más que a metronidazol (razones discutidas en la sección 6.7.1, ensayo 1). Sin embargo, otro estudio concluye que la monoterapia probiótica es menos eficaz en comparación al tratamiento simultáneo del probiótico y el antimicrobiano (Kovachev & Vatcheva-Dobrevska, 2014).

La VB es una infección polimicrobiana donde interaccionan muchos microorganismos como ser: *Prevotella sp*, *Porphyromonas sp*, *Bacteroides sp*, *Mycoplasma hominis* y *A. vaginae*, además, de uno de los agentes etiológicos más importantes como es *G. vaginalis* (Shipitsyna, y otros, 2013). Las interacciones sinérgicas o antagonistas entre los microorganismos son muy importantes durante condiciones sanas o en condiciones de enfermedad, a pesar de, que existen pocos informes de las interacciones de los patógenos involucrados en la VB, un estudio evaluó la posible producción de sustancias antagonistas producidas por *G. vaginalis*, que produce compuestos ya sean antagonistas o sinérgicos dependiendo de las condiciones de crecimiento

(Teixeira, y otros, 2010). En efecto, la presente investigación evaluó, el efecto antagónico de LCR35 frente a *G. vaginalis*, donde se verificó que LCR35 desarrolla sin inhibición, es decir, que posiblemente *G. vaginalis* no tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de LCR35, y tampoco el metronidazol interfiere en su desarrollo, resultado confirmado en las secciones 6.7.2., 6.7.3 y la presente sección (Bayer, Chow, Concepcion, & Guze, 1978).

Por otro lado, ante un proceso infeccioso típico de VB, con tratamiento probiótico como monoterapia, existiría la posibilidad de que otros microorganismos presentes (a diferencia de *G. vaginalis*) produzcan sustancias antagonistas contra los probióticos. Asimismo, se desconoce el efecto de LCR35 contra otros microorganismos presentes en cuadros clínicos de VB, e inclusive su efecto sobre la microbiota normal vaginal, estudios que deben ser realizados en el futuro. Por lo pronto, para garantizar un resultado favorable, se puede sugerir el tratamiento simultáneo (administración de LCR35 y metronidazol al mismo tiempo) en casos de VB, debido a que se evidencia que en condiciones *in vitro*, el desarrollo de LCR35 no es afectado por metronidazol, ensayo 2, 3 y 4 (Bayer, Chow, Concepcion, & Guze, 1978). Otro factor que podemos acotar, es que, aunque el tratamiento antimicrobiano es eficiente en la erradicación de los microorganismos patógenos, a menudo se asocia con fracasos y altas tasas de recurrencia (Mastromarino, Vitali, & Mosca, 2013), con un tratamiento antibiótico y probiótico (administración de LCR35 y metronidazol al mismo tiempo) se esperaría reducir recurrencias de VB. Existen estudios que concluyen que la administración conjunta de probióticos y antimicrobianos disminuye las recurrencias (Mur, Mateo, Ramírez, & Vela, 2016; Krauss-Silva, y otros, 2011).

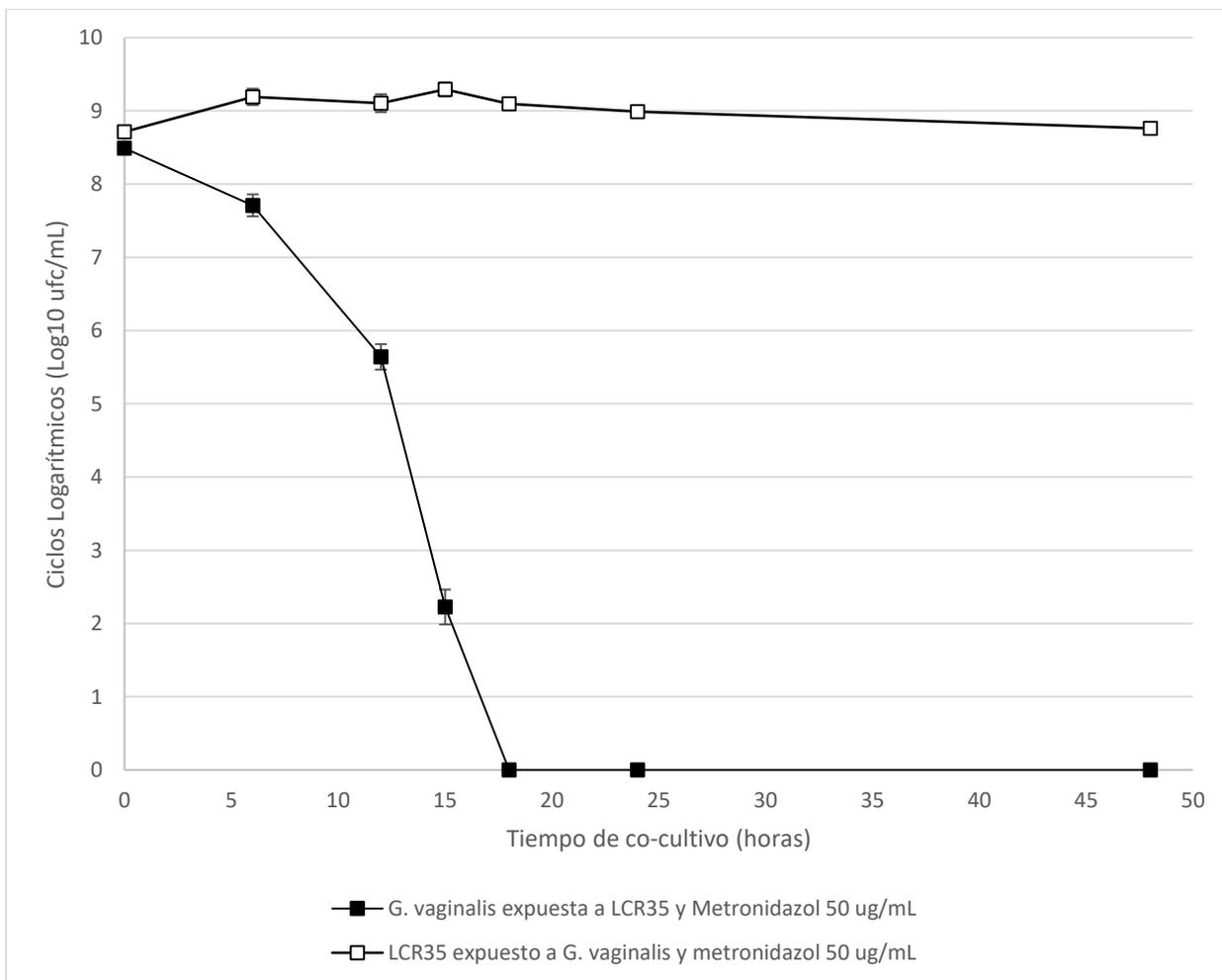


Figura 11. Efecto de LCR35 y metronidazol (50µg/mL) sobre la viabilidad de *G. vaginalis*, en función al tiempo de co-cultivo. *G. vaginalis* se incubo con y sin LCR35 más metronidazol (50µg/mL) durante 48 horas en microaerofilia. Cada valor mostrado es la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos, se utilizaron 5 biotipos de *G. vaginalis* se determinó las ufc/mL a las 0, 6, 12, 18, 24 y 48 horas.

### 6.7.5. Efecto antagónico de LCR35 frente al banco de cepas nativas de *G. vaginalis* en presencia de metronidazol

Las evaluaciones de los ensayos descritos anteriormente, guían a la presente investigación para seleccionar las condiciones de tratamiento más efectivas o adecuadas, demostradas en el ensayo 4 (sección 6.7.4.). Además, existen varios estudios que concluyen que una terapia doble (prescripción de probiótico y metronidazol) reduce la recurrencia de VB y las tasas de infecciones vaginales (Mur, Mateo, Ramírez, & Vela, 2016). En ese sentido, se realizó la evaluación de la reducción de la población de *G. vaginalis* por el efecto inhibitorio de la cepa probiótica LCR35 en presencia de metronidazol, con 49 cepas nativas aisladas e identificadas mediante pruebas bioquímicas como se describen en las secciones 5.1.2 y 5.1.3.

Los resultados muestran que existe una disminución gradual de *G. vaginalis* expuesta a LCR35 y metronidazol respecto a los ciclos logarítmicos, que va desde  $8,47 \pm 0,07$  ( $3 \times 10^8$  ufc/mL) tiempo inicial y  $7,52 \pm 0,04$  ( $3,34 \times 10^7$  ufc/mL);  $5,72 \pm 0,09$  ( $5,35 \times 10^5$  ufc/mL);  $2,27 \pm 0,05$  ( $1,88 \times 10^2$  ufc/mL), a las 6, 12, 15 horas respectivamente, la reducción total de células viables de *G. vaginalis* fue a las 18 horas (Figura 12). A diferencia de la población de LCR35 expuesta a *G. vaginalis* en presencia de metronidazol que inicio con  $8,76 \pm 0,06$  ( $5,83 \times 10^8$  ufc/mL), y hasta las 24 horas se registró,  $9,06 \pm 0,06$  ( $1,16 \times 10^9$  ufc/mL). En efecto, los resultados son similares a los del ensayo 4.

El LCR35 es una de las cepas probióticas más estudiadas para la protección de la mucosa vaginal como agente preventivo y curativo (Coudeyras, Jugie, Vermerie, & Forestier, 2008), sin embargo, su rol contra cepas nativas de *G. vaginalis*, no fue estudiado en nuestro medio. Los roles reguladores atribuidos, de las especies de género *Lactobacillus*, son una alternativa al tratamiento contra VB, también existen otras cepas probióticas que presentan un efecto antagonista frente a diferentes microorganismos patógenos (Reid & Burton, 2002). Sin embargo, Mastromarino, Vitali, & Mosca, 2013, indican que los probióticos no podrían reemplazar el uso de los antimicrobianos. Adicionalmente, la metodología no sistematizada del uso de los probióticos, hace que su aplicación solo sea de recomendación en el tratamiento de la VB y no así una alternativa (Mur, Mateo, Ramírez, & Vela, 2016). Por consiguiente, la variedad de productos y la heterogeneidad de las metodologías, obliga a sugerir un estudio multicéntrico con una muestra mayor que sea representativa y control prospectivo de las recurrencias (Mur, Mateo, Ramírez, & Vela, 2016). Por otra parte, se sugiere evaluar la combinación de dos o más cepas probióticas, con la finalidad de potenciar la actividad antagónica, contra *G. vaginalis*, considerando también el efecto de las cepas probióticas sobre la microbiota normal.

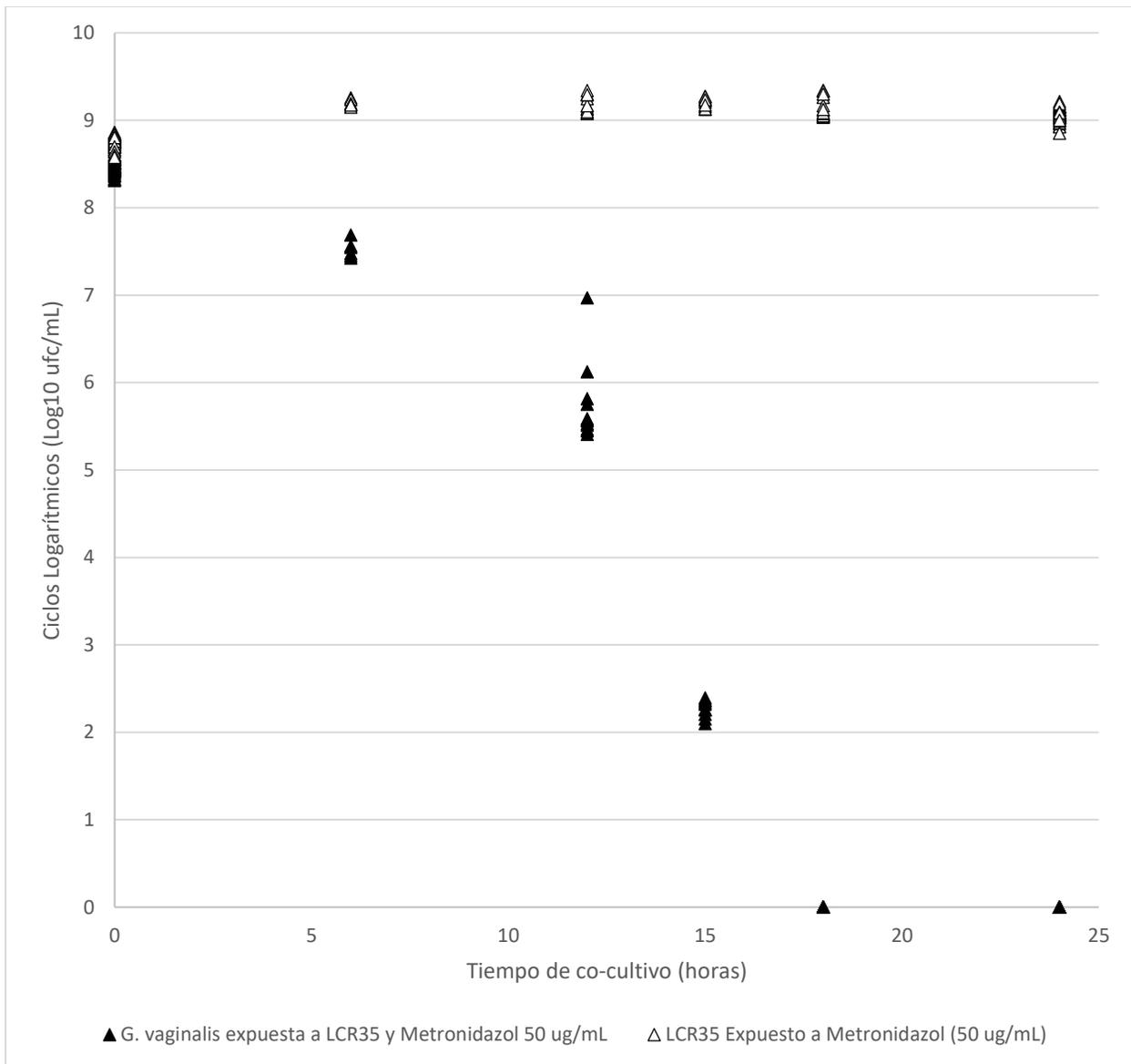


Figura 12. Efecto de LCR35 y metronidazol (50µg/mL) sobre la viabilidad de *G. vaginalis*, en función al tiempo de co-cultivo. *G. vaginalis* se incubo con y sin LCR35 más metronidazol (50µg/mL) durante 24 horas en microaerofilia. Cada valor mostrado es la media ( $\pm$  desviación estándar) de tres experimentos, se utilizaron 54 biotipos de *G. vaginalis* se determinó las ufc/mL a las 0, 6, 12, 18 y 24 horas.

## 7. Conclusiones

La presente investigación, es la primera demostración formal en nuestro medio, del efecto positivo de los probióticos en la reducción de poblaciones de *G. vaginalis* nativas. De esa manera, se recolectaron 150 muestras positivas a VB, del laboratorio clínico del CDVIR entre los meses marzo hasta agosto de la gestión 2016. A partir de estas muestras se lograron aislar e identificar por pruebas bioquímicas 54 cepas nativas de *G. vaginalis*. Por otra parte, según nuestros hallazgos, el medio de cultivo óptimo para realizar las evaluaciones del efecto

antagónico de los probióticos, frente a cepas nativas de *G. vaginalis*, es el medio de cultivo Agar Soya Triptona suplementado con sangre al 5% (v/v) y glucosa (20 g/L). Asimismo, para la evaluación del efecto antagónico en la presente investigación, se empleó  $6 \times 10^8$  ufc/mL como dosis protectora de probióticos y  $3 \times 10^8$  ufc/mL como dosis infectante de *G. vaginalis*. Ahora bien, el probiótico con mayor efecto antagonista, según los ensayos en placa, fue LCR35 y, por ende, fue seleccionado para evaluaciones posteriores, cabe resaltar que fue seleccionado no solo por presentar uno de los mayores halos de inhibición, sino también, por las características intrínsecas que posee. La estandarización entre DO y ufc/mL reveló que la viabilidad de LCR35 corresponde con la escala de McFarland. Sin embargo, *G. vaginalis*, por sus características intrínsecas no se correlaciona con la escala de McFarland.

El metronidazol, es el antimicrobiano utilizado en los esquemas para tratar la VB, según el perfil de sensibilidad realizado en la presente investigación, revela la susceptibilidad de *G. vaginalis* y la resistencia de LCR35. Ahora bien, el perfil de sensibilidad, también ayudo a seleccionar un antibiótico (neomicina, a una concentración de 0,025 mg/mL) para formular el medio selectivo para *G. vaginalis*, constituido por Agar Soya Triptona suplementada con sangre humana al 5 %, 20 g/l de glucosa y 0.025 mg/mL de neomicina.

La dosis de metronidazol por vía oral utilizada en nuestro medio es 2g (dosis única), esa dosis administrada equivale a una concentración sérica de 40  $\mu$ g/mL. La dosis utilizada para las evaluaciones del efecto antagonista de LCR35 en relación a la viabilidad de *G. vaginalis*, fue de 50  $\mu$ g/mL de metronidazol. El ensayo 1 demostró que después de la exposición a metronidazol (50  $\mu$ g) existe una población sobreviviente de *G. vaginalis* a las 48 horas de contacto (reducción de 8 a 6 ciclos logarítmicos). Dicha población sobreviviente de *G. vaginalis* co-cultivada con LCR35 (Ensayo 2), se redujo completamente a las 12 horas de co-incubación con LCR35. Por otro lado, el co-cultivo de *G. vaginalis* y LCR35 (Ensayo 3), la total reducción de *G. vaginalis*, a las 18 horas de co-incubación. Ahora bien, el efecto antagónico, de LCR35 y metronidazol contra *G. vaginalis*, (Ensayo 4), reveló una reducción total de *G. vaginalis* a las 18 horas. Asimismo, se demostró que el metronidazol no influye en el desarrollo de LCR35. Finalmente, evaluando las 54 cepas nativas de *G. vaginalis* en co-cultivo con LCR35 y metronidazol (en condiciones del Ensayo 4), revelo una total reducción de *G. vaginalis* a las 18 horas.

La presente investigación no contempló el estudio del efecto de LCR35 contra otros microorganismos presentes en procesos de VB, ni su efecto sobre la microbiota normal vaginal, por lo cual se sugiere estudios posteriores. Sin embargo, el tratamiento combinado simultáneo probiótico LCR35 y metronidazol, asegura el completo éxito *in vitro* para la reducción de *G. vaginalis*, como tratamiento de VB, considerando la restauración de la microbiota normal de lactobacilos para la reducción de posible recurrencia de VB.

## 8. Bibliografía

- Agurto, T., & Ramos, J. C. (2008). Bacterias ácido lácticas: biopreservante de los alimentos. *Biotempo*, 54-64.
- Al-Harhi, L., Roebuck, K., Olinger, G., Landay, A., Sha, B., & Hashemi, F. S. (1999). Bacterial vaginosis-associated microflora isolated from the female genital tract activates HIV-1 expression. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 194-202.
- Álvarez-Calatayud, G., Suárez, E., Rodríguez, J. M., & Pérez-Moreno, j. (2015). La microbiota en la mujer; aplicaciones clínicas de los probióticos. *Nutrición Hospitalaria*, 56-61.
- Alvarez-Olmos, M. I., Barousse, M. M., Rajan, L., Van Der Pol, B., Fortenberry, D., Orr, D., & Jr., P. F. (2004). Vaginal lactobacilli in adolescents: presence and relationship to local and systemic immunity, and to bacterial vaginosis. *American Sexually Transmitted Diseases Association*, 393-400.
- Amsel, R., Totten, P., Spiegel, C., Chen, K., Eschenbach, D., & Holmes, K. (1983). Nonspecific vaginitis. *The American Journal of Medicine*, 14-22.
- Aroutcheva, A., Gariti, D., Simon, M., Shott, S., Faro, J., Simoes, J. A., . . . Faro, S. (2001). Defense factors of vaginal lactobacilli. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 375-379.
- Arroyo, R., & Alderete, J. (1995). Two *Trichomonas vaginalis* surface proteinases bind to host epithelial cells and are related to levels of cytoadherence and cytotoxicity. *Archives of Medical Research*, 279-289.
- Atassi, F., Brassart, D., Grob, P., Graf, F., & Servin, A. L. (2006). *Lactobacillus* strains isolated from the vaginal microbiota of healthy women inhibit *Prevotella bivia* and *Gardnerella vaginalis* in coculture and cell culture. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 424-432.
- Austin, M. N., Beigi, R. H., Meyn, L. A., & Hillier, S. L. (2005). Microbiologic response to treatment of bacterial vaginosis with topical clindamycin or metronidazole. *American Society for Microbiology*, 4492-4497.

- Austin, M., Meyn, L. A., & Hillier, S. L. (2006). Susceptibility of vaginal bacteria to metronidazole and tinidazole. *Anaerobe*, 155-157.
- BacDive. (22 de 11 de 2017). Obtenido de [https://bacdive.dsmz.de/index.php?site=pdf\\_view&id=6559](https://bacdive.dsmz.de/index.php?site=pdf_view&id=6559)
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 1915-1920.
- Barrenetxea, G. (2002). Vulvovaginitis candidiásica. *Iberoamericana de Micología*, 22-24.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., & Sherris, J. C. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American Journal of Clinical Phatology*, 493-496.
- Bayer, A., Chow, A. W., Concepcion, N., & Guze, L. B. (1978). Susceptibility of 40 lactobacilli to six antimicrobial agents with broad gram-positive anaerobic spectra. *Antimicrob Agents Chemother*, 720-722.
- Bendesky, A., & Menéndez, D. (2001). Metronidazol: una visión integral. *Revista de la Facultad de Medicina*, 255-259.
- Berg, R. D. (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology*, 430-435.
- Blackwell, A., Phillips, I., Fox, A., & Barlow, D. (1983). Anaerobic vaginosis (non-specific vaginitis): clinical, microbiological, and therapeutic findings. *The Lancet*, 1379-1382.
- Bohbot, J. M., & Cardot, J. M. (2012). Vaginal impact of the oral administration of total freeze-dried culture of LCR35 in healthy women. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 1-4.
- Bonjoch, X., Ballesté, E., & Blanch, A. R. (2004). Multiplex PCR with 16s rRNA gene-targeted primers of *Bifidobacterium spp.* to identify sources of fecal pollution. *Applied and Environmental Microbiology*, 3171-3175.
- Braun, W. (1947). Bacterial dissociation: a critical review of a phenomenon of bacterial variation. *Bacteriological Reviews*, 75-114.
- Briggs, M. (1952). An improved medium for lactobacilli. *National Institute for Research in Dairying, University of Reading*, 36-40.
- Brown, J. (1974). Modification of the rapid fermentation test for *Neisseria gonorrhoeae*. *Applied Microbiology*, 1027-1030.

- Burton, J. P., Dixon, J. L., & Reid, G. (2003). Detection of *Bifidobacterium* species and *Gardnerella vaginalis* in the vagina using PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 61-63.
- Caballero, R., Batista, R., Cué, M., Ortega, L., & Rodríguez, M. (2000). Vaginosis bacteriana. *Resumed*, 63-75.
- Cadena, D., Miranda, N., & Calderón, N. (2006). Tricomoniasis urogenital. *Revista Paceña de Medicina Familiar*, 84-89.
- Carrada-Bravo, T. (2006). Tricomoniasis vaginal. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 151-156.
- Cavera, V., Volski, A., & Chikindas, M. (2015). The natural antimicrobial subtilisin a synergizes with lauramide arginine ethyl ester (LAE), e-poly-l-lysine (Polylysine), clindamycin phosphate and metronidazole, against the vaginal pathogen *Gardnerella vaginalis*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-8.
- Centro Departamental de Vigilancia Información y Referencia. (9 de Noviembre de 2017). *cdvirlapaz*. Obtenido de <http://cdvirlapaz.wixsite.com/cdvir>
- Clínica Universidad de Navarra. (16 de Octubre de 2016). *cun.es*. Obtenido de <http://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/microorganismo-opportunista>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). M100 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.
- Collado, M. C. (29 de Noviembre de 2004). Caracterización de cepas del género *Bifidobacterium* con carácter probiótico. Valencia.
- Costerton, W., Veeh, R., Shirtliff, M., Pasmore, M., Post, C., & Ehrlich, G. (2003). The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *The Journal of Clinical Investigation*, 1466-1477.
- Coudeyras, S., Jugie, G., Vermerie, M., & Forestier, C. (2008). Adhesion of human probiotic *Lactobacillus rhamnosus* to cervical and vaginal cells and interaction with vaginosis-associated pathogens. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 1-5.
- Criswell, B. S., Marston, J. H., Stenback, W. A., Black, S. H., & Gardner, H. L. (1971). *Haemophilus vaginalis* 594, a Gram-negative organism? *Canadian Journal of Microbiology*, 865-869.
- Crittenden, R. (2009). Incorporating probiotics into foods. En Y. K. Lee, & S. Salminen, *Handbook of Probiotics and Prebiotics* (págs. 58-75). Hoboken: John Wiley and Sons Ltd.

- Csángó, A. P. (1982). First international conference on vaginosis: nonspecific vaginitis Kristiansand, Norway, April 16–17, 1982. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 1-126.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., & Morelli, L. C. (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection*, 1636-1643.
- Chen, P., Abercrombie, J. J., Jeffrey, N. R., & Leung, K. P. (2012). An improved medium for growing *Staphylococcus aureus* biofilm. *Journal of Microbiological Methods*, 115-118.
- Chooruk, A., Utto, P., Teanpaisan, R., Piwat, S., Chandeying, N., & Chandeying, V. (2013). Prevalence of lactobacilli in normal women and women with bacterial vaginosis. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 519-522.
- Danielsen, M., & Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 1-11.
- Davoodabadi, A., Soltan Dallal, M. M., Lashani, E., & Tajabadi Ebrahimi, M. (2015). Antimicrobial activity of *lactobacillus* spp. isolated from fecal flora of healthy breast-fed infants against diarrheagenic *Escherichia coli*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, e27852.
- Daza, R. M. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de salud*, 57-67.
- De Champs, C., Maroncle, N., Balestrino, D., Rich, C., & Forestier, C. (2003). Persistence of colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* LCR35, after oral consumption. *Journal of Clinical Microbiology*, 1270-1273.
- De Gregorio, P. R., Juarez Tomas, M. S., Leccese Terraf, M. C., & Nader-Macias, M. E. (2014). In vitro and in vivo effects of beneficial vaginal lactobacilli on pathogens responsible for urogenital tract infections. *Journal of Medical Microbiology*, 685-696.
- de Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C., & Schrezenmeir, J. (2001). Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 421S-429S.
- De Vries, W., & Stouthamer, A. H. (1969). Factors determining the degree of anaerobiosis of *Bifidobacterium* strains. *Archives of Microbiology*, 275-287.
- Dec, M., Puchalski, A., Urban-Chmiel, R., & Wernicki, A. (2014). Screening of *Lactobacillus* strains of domestic goose origin against bacterial poultry pathogens for use as probiotics. *Poultry Science*, 2464-2472.

- Deidda, F., Amoroso, A., Allesina, S., Pane, M., Graziano, T., Del Piano, M., & Mogna, L. (2016). In vitro activity of *Lactobacillus fermentum* LF5 against different *Candida* species and *Gardnerella vaginalis* a new perspective to approach mixed vaginal infections? *J Clin Gastroenterol*, S168-S170.
- Dellaglio, F., de Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. C., & Janssens, D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries. En *Bactéries Lactiques* (págs. 25-116). Uriage: H. de Roissart & F. M. Luquet.
- Dunkelberg, W. E., & McVeigh, I. (1969). Growth requirements of *Haemophilus vaginalis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 129-145.
- Elisha, B., & Courvalin, P. (1995). Analysis of genes encoding D-alanine:D-alanine ligase related enzymes in leuconostoc mesenteroides and *Lactobacilli* spp. *Gene*, 79-83.
- Ergueta, D., Evia, G., & Santivañez, M. (2012). *Manual de aplicación de prestaciones del sumi. avanzando al sistema único de salud*. La Paz: Presencia.
- Falagas, M., & Kasiakou, S. K. (2005). Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases*, 1333-1341.
- FAO/OMS. (2006). Probióticos en los alimentos propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. *Consulta de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, incluida la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico*. Córdoba.
- Flores, A. B. (2007). Perfiles de susceptibilidad/resistencia a antibióticos en bacterias del ácido láctico y bifidobacterias caracterización molecular de genes de resistencia. Oviedo, España.
- Forestier, C., De Champs, C., Vatoux, C., & Joly, B. (2001). Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Research in Microbiology*, 167-173.
- Fredricks, D. N., Tina L. Fiedler, T. L., & Marrazzo, J. M. (2005). Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *The New England Journal of Medicine*, 1899-1911.
- Freitas, A. C., & Hill, J. E. (2017). Quantification, isolation and characterization of Bifidobacterium from the vaginal microbiomes of reproductive aged women. *Anaerobe*, 145-156.

- Fuochi, V., Petronio, G. P., Lissandrello, E., & Furneri, P. M. (2015). Evaluation of resistance to low pH and bile salts of human *Lactobacillus spp* isolates. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 426-433.
- Gardner, H. L. (1983). "Non-specific" vaginitis: a non-entity. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 7-10.
- Gardner, H. L., & Dukes, C. D. (1955). *Haemophilus vaginalis* vaginitis. A newly defined specific infection previously classified "nonspecific" vaginitis. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 962-976.
- Gelber, S. E., Aguilar, J. L., Lewis, K. L., & Ratner, A. J. (2008). Functional and phylogenetic characterization of vaginolysin, the human-specific cytolysin from *Gardnerella vaginalis*. *Journal of Bacteriology*, 3896-3903.
- Goldstein, E. J., Citron, D. M., Merriam, C. V., Warren, Y. A., Tyrrell, K. L., & Fernandez, H. T. (2002). In vitro activities of Garenoxacin (BMS 284756) against 108 clinical isolates of *Gardnerella vaginalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 3995-3996.
- Greenwood, J. R., & Pickett, M. J. (1980). Transfer of *Haemophilus vaginalis* Gardner and Dukes to a new genus, *Gardnerella*: *G. vaginalis* (Gardner and Dukes). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 170-178.
- Guarner, F., & Malagelada, J. R. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet*, 512-519.
- Haggerty, C. L., Totten, P. A., Tang, G., Astete, S. G., Ferris, M. J., Norori, J., . . . Ness, R. B. (2016). Identification of novel microbes associated with pelvic inflammatory disease and infertility. *Sex Transm Infect*, 441-446.
- Hallen, A., Jarstrand, C., & Pahlson, C. (1992). Treatment of bacterial vaginosis with lactobacilli. *Sexually Transmitted Diseases*, 146-148.
- Hillier, S. L., & Lau, R. J. (1997). Vaginal microflora in postmenopausal women who have not received estrogen replacement therapy. *Clinical Infectious Diseases*, S123-S126.
- Hillier, S. L., Krohn, M. A., Rabe, L. K., Klebanoff, S. J., & Eschenbach, D. A. (1993). The normal vaginal flora, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. *Clinical Infectious Diseases*, S273-S281.
- Huang, B., Fettweis, J. M., Brooks, J. P., Jefferson, K. K., & Buck, G. A. (2014). The changing landscape of the vaginal microbiome. *Clin Lab Med*, 747-761.
- Hungate, R. E. (1969). Chapter IV a roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods Microbiology*, 117-132.

- Hütt, P., Lapp, E., Štšepetova, J., Smidt, I., Taelma, H., Borovkova, N., . . . Mändar, R. (2016). Characterisation of probiotic properties in human vaginal lactobacilli strains. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 1-9.
- Jaramillo, S. (1998). Prueba Épsilon (Etest). *CES Medicina*, 34-40.
- Jespers, V., Menten, J., Smet, H., Poradosú, S., Abdellati, S., Verhelst, R., . . . Crucitti, T. (2012). Quantification of bacterial species of the vaginal microbiome in different groups of women, using nucleic acid amplification tests. *BMC Microbiology*, 1-10.
- John L. Ingraham, C. A. (1998). Infecciones del aparato genitourinario. En J. L. Ingraham, *Introducción a la microbiología* (págs. 588-589). Barcelona: Reverté.
- Kandler, O., & Weiss, N. (1986). Regular, non-sporing gram-positive rods. En H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, & J. G. Holt, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (págs. 1208-1234). Baltimore: Williams and Wilkins.
- Klaenhammer, T. R., & Kleeman, E. G. (1981). Growth characteristics, bile sensitivity, and freeze damage in colonial variants of *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1461-1467.
- Kleerebezem, M., & Vaughan, E. E. (2009). Probiotic and gut lactobacilli and bifidobacteria: molecular approaches to study diversity and activity. *Annual Review of Microbiology*, 269-290.
- Knupp de Souza, D. M., Diniz, C. G., Filho, D. S., Andrade de Oliveira, L. M., Coelho, D. M., Talha, L. S., . . . Silva, V. L. (2016). Antimicrobial susceptibility and vaginolysin in *Gardnerella vaginalis* from healthy and bacterial vaginosis diagnosed women. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 913-919.
- Knupp de Souza, D., Diniz, C. G., Filho, D. S., Andrade de Oliveira, L. M., Coelho, D. M., Talha, L. S., . . . Silva, V. L. (2016). Antimicrobial susceptibility and vaginolysin in *Gardnerella vaginalis* from healthy and bacterial vaginosis diagnosed women. *Journal of Infection in Developing Countries*, 913-919.
- Koumans, E. H., Sternberg, M., Bruce, C., McQuillan, G., Kendrick, J., Sutton, M., & Markowitz, L. E. (2007). The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001–2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health. *American Sexually Transmitted Diseases Association*, 864-869.
- Kovachev, S., & Vatcheva-Dobrevska, R. (2014). Bacterial vaginosis-Local *Lactobacillus casei* var *rhamnosus* Doderlein monotherapy. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 129-134.

- Kovachev, S., & Vatcheva-Dobrevska, R. (2016). Efficacy of local *Lactobacillus casei var rhamnosus* Döderlein monotherapy for bacterial vaginosis. *Ulutas Medical Journal*, 20-26.
- Krauss-Silva, L., Moreira, M. E., Alves, M. B., Braga, A., Camacho, K. G., Batista, M. R., . . . Guerra, F. (2011). A randomised controlled trial of probiotics for the prevention of spontaneous preterm delivery associated with bacterial vaginosis: preliminary results. *Trials*, 1-11.
- Land, K. M., & Johnson, P. J. (1999). Molecular basis of metronidazole resistance in pathogenic bacteria and protozoa. *Drug Resistance Updates*, 289-284.
- Leopold, S. (1953). Heretofore undescribed organism isolated from the genitourinary system. *United States Armed Forces Medical Journal*, 263-266.
- Lopes dos Santos Santiago, G., Deschaght, P., Aila, N. E., Kiama, T. N., Verstraelen, H., Jefferson, K. K., . . . Vaneechoutte, M. (2011). *Gardnerella vaginalis* comprises three distinct genotypes of which only two produce sialidase. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 450.e1-450.e7.
- Lopéz, M., & Domingo, D. (2007). Antibioticoterapia con probióticos. *Revista Espanola De Quimioterapia*, 170-181.
- Macpherson, A., & Nicola, H. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 478-85.
- Marcone, V., Rocca, G., Lichtner, M., & Ettore, C. (2010). Long-term vaginal administration of *Lactobacillus rhamnosus* as a complementary approach to management of bacterial vaginosis. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 223-226.
- Martín, R., Soberóna, N., Vázquez, F., & Suárez, J. E. (2008). La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enferm Infec Microbiol Clin*, 160-167.
- Martínez, M., Castro, G., & Aguilera, G. (2012). Microbiota vaginal normal: los lactobacilos. *MedLab*, 17-25.
- Martínez, M., Ovalle, A., Reid, I., Céspedes, P., Martínez, M., & Gaete, G. (2004). Biotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *Gardnerella vaginalis*. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 441-445.
- Mastromarino, P., Vitali, B., & Mosca, L. (2013). Bacterial vaginosis: a review on clinical trials with probiotics. *New Microbiologica*, 229-238.

- McFarland, J. (1907). Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association*, 1176-1178.
- McGregor, J. A., & French, J. I. (2000). Bacterial vaginosis in pregnancy. *Obstetrical & Gynecological Survey*, S1-S19.
- McLean, N., & McGroarty, J. (1996). Growth inhibition of metronidazole-susceptible and metronidazole-resistant strains of *Gardnerella vaginalis* by lactobacilli in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, 1089-1092.
- Mendling, W. (2016). Vaginal microbiota. *Microbiota of the Human Body*, 83-93.
- Meyer, H. P., Kiippeli, O., & Fiechter, A. (1985). Growth control in microbial cultures. *Annual Review of Microbiology*, 299-319.
- Mikamo, H., Sato, Y., Hayasaki, Y., Hua, Y., & Tamaya, T. (2000). Vaginal microflora in healthy women with *Gardnerella vaginalis*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 173-177.
- Miyake, T., Watanabe, K., Watanabe, T., & Oyaizu, H. (1998). Phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* and related genera based on 16S rDNA sequences. *Microbiology and Immunology*, 661-667.
- Monterrosa-Castro, A., Blaquicet-Anaya, L., Cantillo-Cabarcas, J., Muñoz-Marrugo, L., & Valverde-Farre, A. (1996). *Gardnerella vaginalis* en informes de citología cérvico-vaginal. *Gac Méd Méx*, 119-125.
- Mur, A., Mateo, Z., Ramírez, N., & Vela, P. (2016). Uso de probióticos en las vaginosis bacterianas. *Sociedad Española de Médicos de Atención Primaria*, 394-398.
- Nagaraja, P. (2008). Antibiotic resistance of *Gardnerella vaginalis* in recurrent bacterial vaginosis. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 155-157.
- Nath, K., Sarosy, J. W., & Stylianou, S. P. (2000). Suitability of a unique 16S rRNA gene PCR product as an indicator of *Gardnerella vaginalis*. *BioTechniques*, 222-224.
- Nelson, D., Hanlon, A., Nachamkin, I., Haggerty, C., DS, M., Liu, C., & Fredricks, D. (2014). Early pregnancy changes in bacterial vaginosis-associated bacteria and preterm delivery. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 88-96.
- Nevado, R., Forcén, R., Layunta, E., Murillo, M. D., & Grasa, L. (2015). La neomicina y bacitracina disminuyen la permeabilidad intestinal en ratones e incrementan la expresión de algunas proteínas de unión estrecha. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 672-676.

- Nivoliez, A., Camares, O., Paquet-Gachinat, M., Bornes, S., Forestier, C., & Veisseire, P. (2012). Influence of manufacturing processes on in vitro properties of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* LCR35®. *Journal of Biotechnology*, 236-241.
- Nugent, R. P., Krohn, M. A., & Hillier, S. L. (1991). Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. *Journal of Clinical Microbiology*, 297-301.
- Obed, D. (2011). Biology of prokaryotic in probiotic biology genetics and health aspects. New York: Min-Tze Liong Springer Heidelberg Dordrecht.
- Palmeira de Oliveira, R., Palmeira de Oliveira, A., & Palmeira de Oliveira, J. (2015). New strategies for local treatment of vaginal infections. *Drug Delivery Reviews*, 1-50.
- Pérez, D. (2003). Adición de probióticos y prebióticos a fórmulas infantiles y su efecto sobre la biodisponibilidad mineral. Murcia, España.
- Petricevic, L., & Witt, A. (2008). The role of *Lactobacillus casei rhamnosus* LCR35 in restoring the normal vaginal flora after antibiotic treatment of bacterial vaginosis. *International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 1369-1374.
- Poch, M., & Bezkorovainy, A. (1988). Growth-enhancing supplements for various species of the genus *Bifidobacterium*. *Journal of Dairy Science*, 3214-3221.
- Proctor, L. (2016). The national institutes of health human microbiome project. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 1-5.
- Ramos, B. d., Kanninen, T. T., Sisti, G., & Witkin, S. S. (2015). Microorganisms in the female genital tract during pregnancy: tolerance versus pathogenesis. *American Journal of Reproductive Immunology*, 383-389.
- Reid, G., & Burton, J. (2002). Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes and Infection*, 319-324.
- Reimer, L. G., & Reller, L. B. (1984). Bacteriemia por *Gardnerella vaginalis*: una revisión de treinta casos. *Obstetrics & Gynecology*, 170-172.
- Rodríguez, A., Camuesco, M. E., Zarzuelo, D., & Gálvez, A. (2008). Aplicaciones terapéuticas de los probióticos. *Ars Pharmaceutica*, 5-30.
- Rojas, A. (6 de Septiembre de 2011). Conceptos y práctica de microbiología general. Palmira, Colombia.

- Rong, J., Zheng, H., Liu, M., Hu, X., Wang, T., Zhang, X., . . . Wang, L. (2015). Probiotic and anti-inflammatory attributes of an isolate *Lactobacillus helveticus* NS8 from Mongolian fermented koumiss. *BMC Microbiology*, 196.
- Rosco. (10 de Octubre de 2003). *Diatabs™- Instrucciones para uso*. Obtenido de [www.medicattec.com/arg/files/IFU-Diatabs-es-011003-301106.pdf](http://www.medicattec.com/arg/files/IFU-Diatabs-es-011003-301106.pdf)
- Sadhu, K. D., Chow, A. W., Nelligan, J., Cheng, N., & Costerton, J. W. (1989). *Gardnerella vaginalis* has a gram-positive cell-wall ultrastructure and lacks classical cell-wall lipopolysaccharide. *Journal of Medical Microbiology*, 229-235.
- Salas, N., Ramirez, J. F., Ruiz, B., Torrez, E., & Jaramillo, L. N.-M. (2009). Prevalencia de microorganismos asociados a infecciones vaginales en 230 mujeres gestantes y no gestantes sintomáticas del centro de salud la milagrosa en el municipio de Armedia (Colombia). *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 135-142.
- Samuelson, J. (1999). Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1533-1541.
- Sanchez, J., Coyatecatl, L., Valentín, E., Vera, L., & Rivera, J. (2007). Diagnóstico clínico, de laboratorio y tratamiento de la vaginosis por *Gardnerella vaginalis*. *Universitarias Médica*, 382-395.
- Scardovi, V. (1986). Genus *Bifidobacterium*. En A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, & J. G. Holt, *Bergey's manual of systematic bacteriology* (págs. 1418-1434). Baltimore: Williams and Wilkins.
- Scott, T. G., Curran, B., & Smyth, C. J. (1989). Electron microscopy of adhesive interactions between *Gardnerella vaginalis* and vaginal epithelial cells, McCoy cells and human red blood cells. *Journal of General Microbiology*, 475-480.
- Schillinger, U., & Lucke, F. K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 1901-1906.
- Schleifer, K. H., & Ludwig, W. (1995). Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. En B. y. Wood, *The Genera of Lactic Acid Bacteria* (págs. 7-15). London: Blackie Academic & Professional.
- Sengupta, R., Altermann, E., Anderson, R. C., McNabb, W. C., Moughan, P. J., & Roy, N. C. (2013). The role of cell surface architecture of lactobacilli in host microbe interactions in the gastrointestinal tract. *Mediators of Inflammation*, 1-16.
- Servicio Departamental de Salud La Paz. (19 de Octubre de 2016). *SEDES LA PAZ*. Recuperado el 19 de Octubre de 2016, de <http://www.sedeslapaz.gob.bo/mapasitio>

- Shipitsyna, E., Roos, A., Datcu, R., Hallén, A., Fredlund, H., J.S., J., . . . Unemo, M. (2013). Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age--sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible? *PLoS ONE*, 1-10.
- Sobel, J. (1996). Candida vulvovaginitis. *Seminars in Dermatology*, 17-28.
- Sobel, J. (1997). Vaginitis. *The New England Journal of Medicine*, 1986-1903.
- Sobel, J., Schmitt, C., & Meriweather, C. (1993). Long term follow-up of patients with bacterial vaginosis treated with oral metronidazole and topical clindamycin. *J Infect Dis.*, 783-784.
- Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos. (22 de Noviembre de 2016). Obtenido de sepy.es: <http://www.sepy.es/es/wiki>
- Soleimani, N., Kermanshah, R., Yakhchali, B., & Sattari, T. (2010). Antagonistic activity of probiotic lactobacilli against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *African Journal of Microbiology Research*, 2169-2173.
- Spiegel, C. A., Amsel, R., & Holmes, K. K. (1983). Diagnosis of bacterial vaginosis by direct Gram stain of vaginal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, 170-177.
- Spiegel, C. A., Amsel, R., Eschenbach, D., Schoenknecht, F., & Holmes, K. K. (1980). Anaerobic bacteria in nonspecific vaginitis. *The New England Journal of Medicine*, 601-607.
- Suárez, J. E. (2015). Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. *Nutrición Hospitalaria*, 3-9.
- Sung-Mee, L., & Dong-Soon, I. (2008). Screening and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from Korean fermented foods. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 178-186.
- Swidsinski, A., Mendling, W., Loening-Baucke, V., Ladhoff, A., Swidsinski, S., Hale, L. P., & Lochs, H. (2005). Adherent biofilms in bacterial vaginosis. *The American College of Obstetricians and Gynecologists*, 1013-1023.
- Teixeira, G. S., Soares-Brandão, K. L., Branco, K. M., Sampaio, J. L., Nardi, R. M., Mendonça, M., . . . Nicoli, J. R. (2010). Antagonism and synergism in *Gardnerella vaginalis* strains isolated from women with bacterial vaginosis. *Journal of Medical Microbiology*, 891-897.
- Thomason, J., Gelbart, S., Anderson, R., Walt, A., Osypowski, P., & Broekhuizen, F. (1990). Statistical evaluation of diagnostic criteria for bacterial vaginosis. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 155-160.

- Tomusiak, A., Strus, M., & Heczko, B. (2011). Antibiotic resistance of *Gardnerella vaginalis* isolated from cases of bacterial vaginosis. *Ginekologia Polska*, 900-904.
- Totten, P. A., Amsel, R., Hale, J., Piot, P., & Holmes, K. K. (1982). Selective differential human blood bilayer media for isolation of *Gardnerella (haemophilus) vaginalis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 141-147.
- Turpin, W., Humblot, C., Thomas, M., & Guyot, J. P. (2010). Lactobacilli as multifaceted bifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 87-102.
- Turroni, F., Ventura, M., Butto, L. F., Duranti, S., O'Toole, P. W., Motherway, M. O., & van Sinderen, D. (2014). Molecular dialogue between the human gut microbiota and the host: a *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 183-203.
- Van Esbroeck, M., Vandamme, P., Falsen, E., Vancanneyt, M., Moore, E., Pot, B., . . . Goossens, H. (1996). Polyphasic approach to the classification and identification of *Gardnerella vaginalis* and unidentified *Gardnerella vaginalis*-like coryneforms present in bacterial vaginosis. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 675-682.
- Vázquez-Rodríguez, S., Bouchan-Valencia, P., González-Jiménez, M. A., Paredes-Vivas, L. Y., Calixto-González, R., & Cébulo-Vázquez, A. (2011). Mecanismos de tolerancia inmunológica en el embarazo. *Perinatol Reprod Hum*, 39-45.
- Vicente, D., & Pérez-Trallero, E. (2009). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 122-130.
- Wang, M., Gao, Z., Zhang, Y., & Pan, L. (2016). Lactic acid bacteria as mucosal delivery vehicles: a realistic therapeutic option. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 5691-5701.
- White, B. A., Creedon, D. J., Nelson, K. E., & Wilson, B. A. (2011). The vaginal microbiome in health and disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 389-393.
- Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., & Schreckenberger, P. W. (2013). *Koneman Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas en color*. Mexico D.F.: Panamericana S.A.
- Yoda, K., Miyazawa, K., Hosoda, M., Hiramatsu, M., Yan, F., & He, F. (2014). *Lactobacillus* GG-fermented milk prevents DSS-induced colitis and regulates intestinal epithelial homeostasis through activation of epidermal growth factor receptor. *European Journal of Nutrition*, 105-115.

Zariffard, M., Saifuddin, M., Sha, B., & Spear, G. (2002). Detection of bacterial vaginosis-related organisms by real-time PCR for Lactobacilli, *Gardnerella vaginalis* and *Mycoplasma hominis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 277-281.

Zinnemann, K., & Turner, G. C. (1963). The taxonomic position of “*Haemophilus vaginalis*” (*Corynebacterium vaginale*). *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 213-219.

## Anexos

### Anexo1

#### Relación entre la viabilidad de LCR35, *G. vaginalis* y su medida turbidimetría.

Datos obtenidos para obtener la correlación entre la densidad óptica en función a las ufc/mL de la cepa 11307 de *G. vaginalis* y LCR35

Escala de McFarland	Densidad óptica escala de McFarland	ufc/mL teórico	Densidad óptica de <i>G. vaginalis</i>	ufc/mL de <i>G. vaginalis</i>
0.5	0.1779	1,5x10 <sup>8</sup>	0,17	1,61x10 <sup>7</sup>
1	0.3684	3 x10 <sup>8</sup>	0,3237	3,13 x10 <sup>7</sup>
2	0.5663	6 x10 <sup>8</sup>	0,5284	8,80 x10 <sup>7</sup>
3	0.9764	9 x10 <sup>8</sup>	0,9311	1,08 x10 <sup>8</sup>
4	12.659	12 x10 <sup>8</sup>	1,2254	1,71 x10 <sup>8</sup>
5	15.522	15 x10 <sup>8</sup>	1,5264	2,17 x10 <sup>8</sup>
6	16.822	18 x10 <sup>8</sup>	1,6805	2,31 x10 <sup>8</sup>

**Nota.** Las ufc/mL teóricos se reportan en Pérez (2003)

Escala de McFarland	Densidad óptica escala de McFarland	ufc/ml teórico	Densidad óptica LCR35	ufc/mL de LCR35
0.5	0,1779	1,5x10 <sup>8</sup>	0,17	1,54 x10 <sup>8</sup>
1	0,3684	3x10 <sup>8</sup>	0,3237	3,19 x10 <sup>8</sup>
2	0,5663	6x10 <sup>8</sup>	0,5284	5,68 x10 <sup>8</sup>
3	0,9764	9x10 <sup>8</sup>	0,9311	8,31 x10 <sup>8</sup>
4	1,2659	1,2x10 <sup>9</sup>	1,2254	1,26 x10 <sup>9</sup>
5	1,5522	1,5x10 <sup>9</sup>	1,5264	1,66 x10 <sup>9</sup>
6	1,6822	1,8x10 <sup>9</sup>	1,6805	1,95 x10 <sup>9</sup>

**Nota.** Las ufc/mL teóricos se reportan en Pérez (2003)

## Anexo 2

### Efecto antagónico de LCR35 contra *G. vaginalis* sobreviviente a metronidazol

Para este ensayo se procedió según las condiciones descritas en la sección 5.5.2.; con la diferencia de poblaciones bacterianas de  $3 \times 10^6$  ufc/mL de *G. vaginalis* y  $6 \times 10^6$  ufc/mL de LCR35 en co-cultivo. La razón para utilizar dichas concentraciones se explica de la siguiente manera, se expuso una población de  $3 \times 10^8$  ufc/mL de *G. vaginalis* (ensayo 1) a metronidazol ( $50 \mu\text{g/mL}$ ) durante 48 horas. Por efecto del metronidazol la población de *G. vaginalis* se redujo hasta  $2,09 \times 10^6$  ufc/mL (existiendo una población de *G. vaginalis* sobreviviente a la exposición de metronidazol). Por consiguiente, se disminuyó los ciclos logarítmicos para realizar el co-cultivo con LCR35 ( $6 \times 10^6$  ufc/mL). Según estos resultados a las 24 horas la población de *G. vaginalis*, mantuvo su concentración, por lo que se supuso que la previa exposición a metronidazol confirió una resistencia a *G. vaginalis*, cuando se expuso posteriormente a LCR35. Lo que fue descartado al realizar el ensayo 2 de la presente investigación (sección 6.7.2), donde logra evidenciar la completa eliminación de *G. vaginalis* a las 12 horas. Por lo que se concluye que la dosis probiótica influye en la reducción de *G. vaginalis*.

