

Microbiota Vaginal y Vaginosis Bacteriana

Resumen objetivo elaborado

por el Comité de Redacción Científica de SIIC sobre la base del artículo

Vaginal Microbiota Molecular Profiling in Women with Bacterial Vaginosis: A Novel Diagnostic Tool

de

Savicheva A, Krysanova A, Kogan I y colaboradores

integrantes de

D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine,
San Petersburgo, Rusia

El artículo original, compuesto por 13 páginas, fue editado por

International Journal of Molecular Sciences

24(21):1-13, Nov 2023



La secuenciación múltiple de nueva generación o las pruebas moleculares permiten un perfil completo y preciso de la microbiota vaginal para determinar el agente causal primario; sin embargo, la reacción en cadena de la polimerasa múltiple en tiempo real surge como un nuevo instrumento diagnóstico altamente prometedor.

Introducción

La disbiosis polimicrobiana no inflamatoria o vaginosis bacteriana (VB), frecuente en mujeres en edad reproductiva, se asocia con aumento de la susceptibilidad a virus y enfermedades de transmisión sexual (ETS), y con diversos trastornos ginecológicos y complicaciones obstétricas. La prevalencia de VB en mujeres con flujo vaginal es de entre 40% y 50%, con una frecuencia de entre 5.8% y 19.3% en embarazadas.

La mayor colonización por *Gardnerella* spp. se vincula con la formación de una biopelícula en la superficie del epitelio vaginal, con colonización adicional por otros microorganismos anaeróbicos asociados con la VB, por medio de interacciones sinérgicas. Mediante análisis de secuenciación genética, las comunidades microbianas vaginales se suelen dividir en categorías separadas, determinadas por su composición (*community state type* [CST]). La predominancia de *Lactobacillus crispatus* (CST I) se considera el estado óptimo, ya que reduce la susceptibilidad a las ETS. En el CST III predomina la colonización por *Lactobacillus iners*; este estado se suele considerar un fenotipo de transición a CST IV, que se caracteriza por la presencia de microorganismos anaeróbicos mixtos, similares a los que se encuentran en la VB; además, se relaciona con mayor riesgo de trastornos reproductivos y de ETS. El CST II, con predominio de *Lactobacillus gasseri*, y el CST V, con abundancia de *Lactobacillus jensenii*, son menos comunes que el CST I y el CST III y se consideran microbiota vaginal oportunista.

Para el diagnóstico de VB se utilizan métodos clínicos y de laboratorio, pero la herramienta de evaluación más conocida se basa en la determinación de los criterios clínicos de Amsel (secreción con olor desagradable, prueba positiva con KOH al 10%, pH > 4.5 y presencia de células empanada [*clue cells*] en la microscopia húmeda). Sin embargo, la tinción de Gram en frotis vaginales es más específica para

el diagnóstico de VB que los criterios de Amsel. El sistema estandarizado más comúnmente utilizado para diagnosticar VB es la puntuación de Nugent, basado en los morfotipos más confiables del frotis vaginal. No obstante, estos procedimientos diagnósticos presentan limitaciones importantes; los resultados a menudo varían ya que la evaluación de los criterios de diagnóstico depende de las habilidades y la experiencia del investigador. Los métodos moleculares para el diagnóstico de VB tienen numerosas ventajas en este sentido, ya que son confiables, determinan el número de bacterias y son óptimos para el análisis de muestras vaginales tomadas por las pacientes. Estas pruebas, basadas en la detección y amplificación de ácidos nucleicos bacterianos específicos, ofrecen mayor rendimiento. Actualmente, para el diagnóstico de la VB se utiliza amplificación múltiple de ácidos nucleicos, con reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR, por su sigla en inglés [Femoflor®]), con la cual es posible detectar un número amplio de microorganismos. La capacidad de amplificar más de una secuencia al mismo tiempo es una de las principales ventajas, en relación con la naturaleza polimicrobiana de la VB. En este contexto, este estudio tuvo por objetivo evaluar la composición microbiana y las especies de lactobacilos dominantes en no embarazadas con VB, mediante análisis molecular múltiple, y determinar la importancia diagnóstica del procedimiento.

Materiales y métodos

Se evaluaron 331 no embarazadas en edad reproductiva. El grupo principal estuvo integrado por 301 mujeres que referían flujo vaginal, malestar vaginal y ardor. Se utilizó el método de puntuación de Nugent para el examen microscópico del flujo vaginal. La evaluación microscópica de los frotis teñidos con Gram permitió determinar los siguientes morfotipos de bacterias: bacilos grampositivos grandes (*Lactobacillus*), bacilos curvos gramnegativos pequeños o

gramvariables (*Gardnerella* y *Bacteroides*) y bacilos curvos gramnegativos o gramvariables (*Mobiluncus*). A cada uno de estos parámetros se le asignó una puntuación basada en el recuento de bacterias y el posterior cálculo de la puntuación total.

Según el puntaje, las muestras se clasificaron en aquellas sin VB (0 a 3), intermedias (4 a 6) y con VB (7 a 10). Según la clasificación de Nugent de muestras vaginales, 232 (70%) muestras fueron negativas, 33 (10%) fueron intermedias y 66 (20%) muestras correspondieron a VB. Mediante la prueba de RT-PCR se analizaron un total de 329 muestras de frotis vaginales. Los datos nominales (positividad y negatividad de bacterias o virus) se evaluaron con la prueba exacta de Fisher; en caso de necesidad se utilizó la aproximación de Monte Carlo, seguida de una comparación intergrupala.

El análisis de los datos cuantitativos (logaritmo decimal de concentración) se realizó mediante prueba *post hoc* de Kruskal-Wallis. Las comparaciones múltiples se corrigieron con el método de Benjamini y Hochberg. Para todas las pruebas, un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

La RT-PCR múltiple reveló una amplia gama de microorganismos, cuyo índice de detección se vinculó con los criterios de Nugent. Los lactobacilos son los microorganismos más importantes para el mantenimiento de la salud vaginal. Como regla general, en una misma mujer están presentes dos o más especies vaginales, principalmente *L. crispatus* y *L. iners*. Se encontraron lactobacilos en todos los controles y en el 99% de las mujeres con microbiota vaginal normal (Nugent 0 a 3). *Lactobacillus crispatus* fue más común en mujeres sanas y con microbiota vaginal normal, mientras que *L. iners* fue más abundante en mujeres con microbiota vaginal normal (64.5%) y en aquellas con VB (56.1%). La detección de bifidobacterias fue tres veces más alta en mujeres con VB. En relación con los microorganismos anaerobios facultativos, las diferencias más significativas se observaron en la tasa de detección de *Haemophilus* spp., en mujeres con VB, en comparación con los controles. Los anaerobios fueron los microorganismos predominantes en mujeres con VB, con una incidencia particularmente alta de *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* y *Megasphaera* spp./*Veilonella* spp./*Dialister* spp., en comparación con mujeres sanas. *Candida albicans* se encontró con mayor frecuencia en mujeres con VB, mientras que *Candida non albicans* se detectó únicamente en aquellas con microbiota vaginal normal.

En todos los grupos se determinaron patógenos comensales como *Ureaplasma parvum*; *Ureaplasma urealyticum* se detectó solo en el grupo principal, mientras que *Mycoplasma hominis* solo se observó en pacientes con VB. *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* solo se observaron en pacientes con VB. Se detectó virus del papiloma humano (HPV) en ambos grupos, y virus del herpes simple (VHS) en mujeres con microbiota vaginal normal y puntuación intermedia, mientras que el citomegalovirus (CMV) estuvo presente en el grupo control, así como en mujeres con microbiota vaginal normal y puntuación intermedia.

Se realizó una evaluación cuantitativa de las especies detectadas en los diferentes tipos de microbiota vaginal de acuerdo con los criterios de Nugent, sobre la base del recuento bacteriano total y el número de anaerobios obligados, anaerobios facultativos (aerobios) y lactobacilos. En la

VB predominaron microorganismos anaeróbicos obligados, aunque en condiciones normales también se detectaron estos microorganismos. Se realizó un análisis comparativo entre muestras positivas y negativas para lactobacilos en pacientes de los grupos con el objetivo de evaluar el efecto de estas especies sobre la microbiota vaginal y la salud de las mujeres. Para ello, las muestras se dividieron en 4 grupos: control, negativo, intermedio y de BV. En las muestras con 2 o más especies de lactobacilos se identificaron los miembros dominantes. Como resultado, todas las muestras del grupo control reflejaron la microbiota vaginal normal, y se diferencian del subgrupo "negativo" por la ausencia de síntomas. Se efectuó también un análisis comparativo de los miembros dominantes con todas las muestras, clasificadas en dos grupos según la presencia o ausencia de VB. Los patógenos de las ETS (*Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Trichomonas vaginalis*) se identificaron solo en mujeres con VB. Se detectaron agentes virales (VHS1, VHS2, CMV y HPV) en unos pocos casos en todos los grupos. En total, la RT-PCR detectó 14 subtipos de HPV de alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68. La incidencia de HPV en mujeres con secreción estuvo entre 13.3% y 26.5% y fue comparable en pacientes con diferentes tipos de microbiota vaginal (VB y tipo intermedio: 21.2%; microbiota normal: 26.5%), con valor ligeramente más bajo, de 13.3%, en mujeres sanas. Se determinó la precisión de la RT-PCR para la predicción de VB con análisis de curva ROC.

En relación con el abordaje de predicción, el logaritmo decimal de la relación lactobacilos/recuento de bacterias totales inferior al 20% y el logaritmo decimal de la relación anaerobios/recuento de bacterias totales superior al 90% confirmaron VB. El diagnóstico no se confirma cuando al menos un criterio no se cumple. Los resultados obtenidos indican la importancia diagnóstica notoria de la prueba de amplificación genética. La RT-PCR permite identificar la microbiota vaginal en mujeres con VB o sin VB y en aquellas que se encuentran sanas (en relación con los criterios de Nugent, sensibilidad del 84.8% y especificidad del 96.2%). El perfil molecular de la microbiota vaginal sugirió una tasa de detección de lactobacilos más baja en mujeres con VB, en comparación con aquellas sin VB. La tasa de detección de *L. crispatus* se redujo significativamente, mientras que la tasa de *L. iners* se mantuvo elevada. La composición de lactobacilos, bifidobacterias y microorganismos anaeróbicos facultativos en el tipo biológico vaginal no difirió entre mujeres sanas y pacientes con VB, mientras que, en presencia de microorganismos anaeróbicos obligados, la situación difirió completamente. Por ejemplo, se encontró *Gardnerella vaginalis* en el 99.5% de las mujeres con VB, con superioridad absoluta.

La misma tendencia se observó para otros miembros anaeróbicos. Por su alta sensibilidad y especificidad, la RT-PCR sería particularmente útil como herramienta diagnóstica alternativa a los métodos de Amsel y Nugent para el diagnóstico de la VB. La confirmación de infección vaginal en mujeres con microbiota vaginal intermedia y la identificación de patógenos de ETS y de virus representan ventajas adicionales de la prueba.

Conclusión

La secuenciación múltiple de próxima generación (SMNG) o las pruebas moleculares permiten un conocer el perfil completo y preciso de la microbiota vaginal para determinar el agente causal primario. Debido a los altos costos y la disponibilidad limitada de la SMNG, la RT-PCR es de interés

especial. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la composición microbiana y las especies de lactobacilos dominantes en no embarazadas con VB, y determinar su importancia diagnóstica. Se comprobó una reducción significativa de la tasa de lactobacilos en pacientes con VB, en comparación con mujeres sanas. Asimismo, la tasa de *L. crispatus* disminuyó significativamente, mientras que la tasa de *L. iners* se mantuvo alta.

Entre las bacterias anaeróbicas obligadas, *Gardnerella vaginalis* fue la más prevalente en mujeres con VB. La RT-PCR

tuvo alta sensibilidad y especificidad para diagnosticar VB. Además, la prueba permite identificar infecciones en mujeres con microbiota vaginal intermedia, patógenos de ETS y virus. Por tanto, la RT-PCR puede utilizarse eficazmente en la evaluación de la microbiota vaginal en mujeres con VB, microbiota vaginal intermedia y mujeres sanas. Asimismo, esta prueba se puede utilizar como alternativa a los criterios de Amsel y al método de puntuación de Nugent para diagnosticar la VB. La RT-PCR presentó elevada sensibilidad y especificidad para diagnosticar VB.