



VirtuaLAB

3er Congreso Virtual
de Bioquímica Clínica 2019





VirtuaLAB

3er Congreso Virtual
de Bioquímica Clínica **2019**

NUEVAS HERRAMIENTAS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA DISFUNCIÓN VAGINAL: APORTES DE LA METAGENÓMICA, PROTEÓMICA Y METABOLÓMICA

Prof. Dra. Beatriz Perazzi

Vicedirectora del Departamento de Bioquímica Clínica.

Profesora Adjunta Microbiología Clínica.

Directora de PROSAR (FBA).

Jefa del Laboratorio de Química Clínica.

Departamento de Bioquímica Clínica. Hospital de Clínicas.

Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

Infecciones del tracto genital femenino

Endógenas

- Vaginosis bacteriana Complejo GAMm
- Candidiasis vulvovaginal: *Candida* spp.
- Vaginitis microbiana inespecífica (microorganismos del tubo digestivo y orofaringe)
- Portación por *S. agalactiae*
- Infección por *Mycoplasma* spp y/o *Ureaplasma urealyticum*

Exógenas

- Gonorrea: *Neisseria gonorrhoeae*
- Sífilis: *Treponema pallidum*
- Tricomonosis: *Trichomonas vaginalis*
- *Chlamydia trachomatis*
- Virales

Infecciones del tracto genital femenino

Vaginitis

(Inflamación de

Mucosa vaginal)

***Candida* spp. (20 - 35%)**

***Trichomonas vaginalis* (< 5%)**

Otros

Vaginosis bacteriana

(Microbiota alterada)

Complejo GAMm (20 - 30%)

Cervicitis

(Inflamación del

Cuello uterino)

Neisseria gonorrhoeae

Chlamydia trachomatis

Otros



VirtuaLAB 2019

3er Congreso Virtual de Bioquímica Clínica

Porcentajes del microorganismos aislados del TGI según grupo etario y en embarazadas (2010)

Microorganismo	niñas (≤ 10 años) n = 30	Adolescentes (11-18 años) n = 55	Adultos n = 235	Embarazo n = 421
<i>Candida</i> spp.	10 ⁽¹⁾	16,4 ⁽¹⁾	15,3 ⁽¹⁾	23,7 ⁽¹⁾
VB	0 ⁽²⁾	20 ⁽²⁾	19,1 ⁽²⁾	18,5 ⁽²⁾
<i>T. vaginalis</i>	0 ⁽³⁾	0 ⁽³⁾	2,6 ⁽³⁾	2,1 ⁽³⁾
<i>Lactobacillus</i> spp.	0	52	48,9	52
<i>Corynebacterium</i> spp	63	8	11,1	2
<i>S. agalactiae</i>	0	0	1,3	0,4
Microbiota enterica	17	1,8	1,3	0,4
<i>Shigella</i> spp.	3,3	0	0	0
<i>S. pneumoniae</i>	6,7	0	0	0
Microbiota anaerobia / <i>Actinomyces</i> spp.	0	1,8	0,4	0,9

(1) $\chi^2=9,267$; GL=3; p=0,026

Diferencia significativa

(2) $\chi^2=6,995$; GL=3; p=0,0721

Diferencia no significativa

(3) $\chi^2=2,115$; GL=3; p=0,5489

Diferencia no significativa

Microorganismos del TGI según la edad de la paciente

Recién nacido

Lactobacillus spp.

Pocas semanas después

Corynebacterium spp.-ECN-

Hasta pubertad

Peptostreptococcus

Anaerobios-enterobacterias-

Candida spp.

Pubertad hasta menopausia

Lactobacillus spp.

Postmenopausia

Alta prevalencia de BGN

Postmenopausia

Lactobacillus spp.

(con tratamiento estrogénico)

Microorganismos presentes en la vagina

Varia de acuerdo a la edad y
condición fisiológica de la mujer



Lactobacillus spp. ↑ ↑ (bacilos de Doderlein):
producción de ácido láctico

Establecimiento y mantenimiento de la microbiota vaginal normal

pH 3.8 - 4.5

Lactobacillus spp.

~~*Enterobacterias*~~

Producción de H_2O_2

~~(anaerobios *G. vaginalis*,
Molibuncus, *Streptococcus* spp.)~~

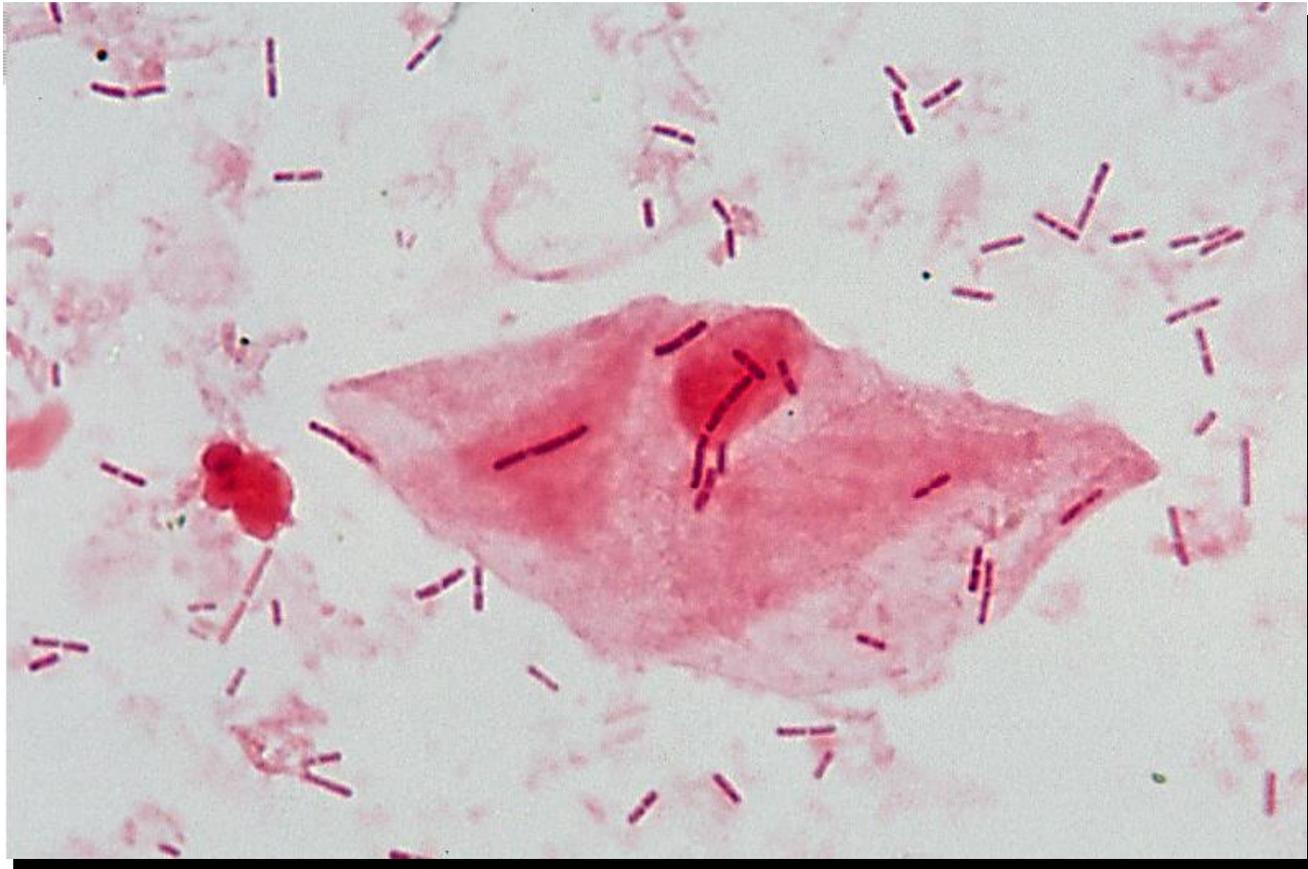


Microorganismos predominantes en el TGI de mujeres adultas normales

Microorganismo	Incidencia (%)
<i>Lactobacillus</i> spp.	68
<i>Staphylococcus</i> coag. Neg.	66
<i>Prevotella</i> spp	62
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	42
<i>Streptococcus</i> spp.	38
Micoplasmas	78
BGN anaerobios pigm.	25
<i>Enterococcus</i> spp.	25
<i>Gardnerella vaginalis</i>	45
<i>Escherichia coli</i>	21
<i>Corynebacterium</i> spp.	19
<i>Fusobacterium</i> spp.	18
<i>Veillonella</i> spp.	15
<i>Candida</i> spp.	12
<i>Bacteroides</i> grupo <i>fragilis</i>	11



Microbiota lactobacilar



Indicaciones para la paciente

- ✓ Preferentemente período ovulatorio (BACOVA no tiene VP 3 días previos y 5 posteriores a la menstruación).
- ✓ No relaciones sexuales 48-72 hs. antes.
- ✓ No tratamiento ATB local ni oral 48-72 hs. antes.
- ✓ No duchas vaginales / tampones o cosméticos íntimos 4 a 5 días antes.
- ✓ Tamizaje 1° trimestre y en semanas 35-37 en embarazadas sintomáticas con vulvovaginitis, o pacientes asintomáticas con factores de riesgo (antecedentes de partos prematuros o recién nacido previo con bajo peso al nacer). (Guía de prevención y tratamiento de Infecciones congénitas y perinatales. MSAL de la Nación, 2010.)

Diagnóstico de laboratorio en infecciones del TGI

Fondo de saco de la cavidad vaginal

B
A
C
O
V
A

✓ Examen microscópico

Gram → bacterias (vaginosis bacteriana)

MGG → *Trichomonas vaginalis*

✓ 1 ml de solución fisiológica → Fresco

Trichomonas vaginalis

levaduras, bacterias móviles

✓ 1 ml SAF/azul de metileno (TV)

✓ 1 Stuart → cultivo agar sangre humana

VN y RIV (leucocito/celula) 37°C 48 hs 5% CO₂

✓ Cultivo medio líquido *T. vaginalis*

Para casos de desbalance del contenido vaginal (VMI) y candidiasis recurrente (agar cromogénico)

Determinaciones accesorias

✓ pH

✓ 1 ml KOH 10%

Fresco → *Candida* spp.

Test de aminas → vaginosis bacteriana



VirtuaLAB 2019

3er Congreso Virtual de Bioquímica Clínica

Balance del Contenido Vaginal (BACOVA)

- ✓ Utilidad
 - Detección infecciones del TGI en MEF y menopausia (no validado en prepúberes)
 - Prevención en embarazadas asintomáticas
 - ⇒ evitar complicaciones maternas y perinataológicas
 - ✓ Diagnóstico de VAGINOSIS y VAGINITIS
 - ✓ Alto VPP y VPN → Diagnóstico de VB.
 - ✓ Alto VPP (muy bajo VPN) → Diagnóstico de *T. vaginalis*
 - ✓ Adecuada detección de levaduras.
 - ✓ Alto VP → respuesta inflamatoria (RIV: infección vaginal o no vaginal).
 - ✓ Presencia células anormales (virocitos/ coilocitos/ otras) (cel. redondas)
- ALERTA → estudios confirmatorios

Estados Vaginales Básicos (EVB)

✓ **Aplicable en la mujer en edad fértil y adaptación en menopausia (no validado en prepuber)**

✓ **Valor numérico:** indicador del estado hormonal

- **0-3: equilibrio normal**

- **4-6: microbiota intermedia**

- **7-10: microbiota francamente alterada**

✓ **RIV:** 5-10 campos no adyacentes, promedio, valor entero

> **10 leucocitos/campo 400X (Giemsa)**

> **5 leucocitos/campo 1000X (Gram)**

> **1 leucocito/ célula (400X) (Giemsa) (confirmatorio, embarazo, mayor sensibilidad)**

ESTADOS VAGINALES BASICOS EN MEF

ESTADO VAGINAL BASICO	SIGLA	VALOR NUMERICO (VN)	REACCION INFLAMATORIA (RIV)
I. MICROBIOTA NORMAL	MN	0 a 3	NO
II. MICROVIOTA NORMAL MAS RIV	MN + RIV	0 a 3	SI
III. MICROBIOTA INTERMEDIA	MI	4 a 6	NO
IV. VAGINOSIS BACTERIANA	VB	7 a 10	NO
V. VAGINITIS MICROBIANA INESPECIFICA	VMI	4 a 10	SI

ESTADOS VAGINALES BASICOS EN MM

ESTADO VAGINAL BASICO	SIGLA	VALOR NUMERICO (VN)	REACCION INFLAMATORIA (RIV)
I. MICROBIOTA NORMAL	MN	0 a 5	NO
II. MICROVIOTA NORMAL MAS RIV	MN + RIV	0 a 5	SI
III. MICROBIOTA INTERMEDIA	MI	6	NO
IV. VAGINOSIS BACTERIANA	VB	7 a 10	NO
V. VAGINITIS MICROBIANA INESPECIFICA	VMI	6 a 10	SI

Aportes del microbioma en la disfunción vaginal

- Se estudia la **totalidad de las especies bacterianas** del contenido vaginal por **Secuenciación de nueva Generación (NGS)** y se establece **proporción relativa**: secuenciación masiva del gen bacteriano **ARNr 16S** determinando proporción según abundancia del gen
- Existen 5 tipos de diversidades diferentes, llamados *clusters* bacterianos: **Community States Types (CST)**
- **Correlación directa del VN de Nugent con los CST**
- **CST I: VN Nugent 0-3: predominio de *Lactobacillus (L. crispatus)***
CST IV: VN Nugent 7-10: predominio de anaerobios (VB)
CST II, III y V: VN Nugent 4-6: variables intermedias de diversidad bacteriana

L. gasseri *L. iners* *L. jensenii*

Elovitz MA et al. [Nat Commun](#). 2019; 10: 1305.

ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09285-9> OPEN

Cervicovaginal microbiota and local immune response modulate the risk of spontaneous preterm delivery

Michal A. Elovitz¹, Pawel Gajer², Valerie Riis¹, Amy G. Brown¹, Michael S. Humphrys², Johanna B. Holm² & Jacques Ravel [Nat Commun.](#) 2019; 10: 1305.

- Alteración de la **diversidad bacteriana vaginal** → **RPM y PP**

- **7 bacterias significativamente aumentadas en PP (ausencia de *Lactobacillus* spp.):**
 - *Mobiluncus curtisii/mulieris*
 - *Megasphaera*
 - *Atopobium*
 - *Magnebacillus indolicus*
 - *Sneathia sanguinogens*
 - *Porphyromonas asaccharolytica*
 - *Prevotella buccalis*

- Alto nivel de β -defensina-2 vaginal → disminuye riesgo de PP (**PROTEOMICA**)

Aportes de la metabolómica en la disfunción vaginal

- **Identificación y concentración relativa de moléculas del CV**
- **Nivel de investigación, escasa comparabilidad**
- **Método utilizado actualmente: *Proton Nuclear Magnetic Resonance (H-NMR) spectroscopy***
- **Aumento de concentración relativa de *dodecanoylcarnitine/dodecenoylcarnitine* (C12 / C12:1) y *phosphatidylcholine acyl-alkyl* C 38:1 (PC ae C38:1) predice significativamente el riesgo del desprendimiento placentario**
- **Alteraciones asociadas al desprendimiento placentario ocurren simultáneamente con disbiosis vaginal**
- **Parto sin alteraciones: equilibrio normal de lactato**
- **PP: aumento de acetato**

Aportes de la metabolómica en la disfunción vaginal

➤ VB: Mayor diversidad bacteriana → diversidad de metabolitos CV



nicotinato, malonato, acetato

Prevotella, Atopobium, Mycoplasma hominis

➤ VB y PP: - aumento de 2-hidroxi-isovalerato y γ -hidroxi-butilato

↳ *G. vaginalis*

- predominio de catabolitos de aminoácidos y poliaminas

(↑ 62% de 279 moléculas)

- disminución de succinato (*L. crispatus*), aminoácidos y dipéptidos

➤ **Correlación directa criterio de Amsel de VB con metabolómica**

McMillan A et al. Sci Rep 2015; 5: 14174 Srinivasan S et al. mBio 2015; 6(2): e00204-15.

Aportes de la proteómica en la disfunción vaginal y parto pretérmino

- Identificación y concentración relativa de proteínas del CV
- Nivel de investigación
- Método utilizado actualmente: cromatografía líquida y espectrometría de masa en tandem
- Estudio de 1211 proteínas (236 identificadas):
PP:

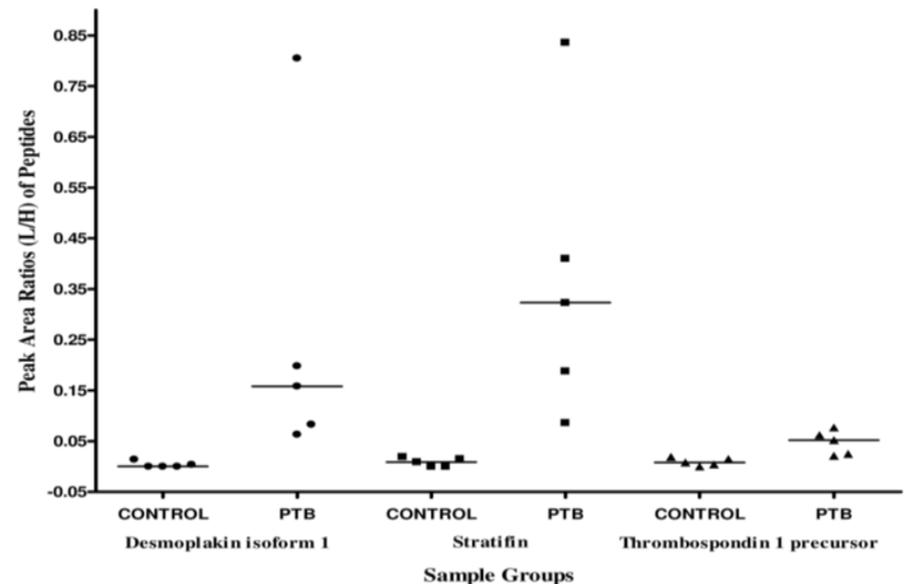
-desmoplakina isoforma 1

-stratifina

-precursor trombospodina 1

Identification and Quantification of Preterm Birth Biomarkers in Human Cervicovaginal Fluid by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry

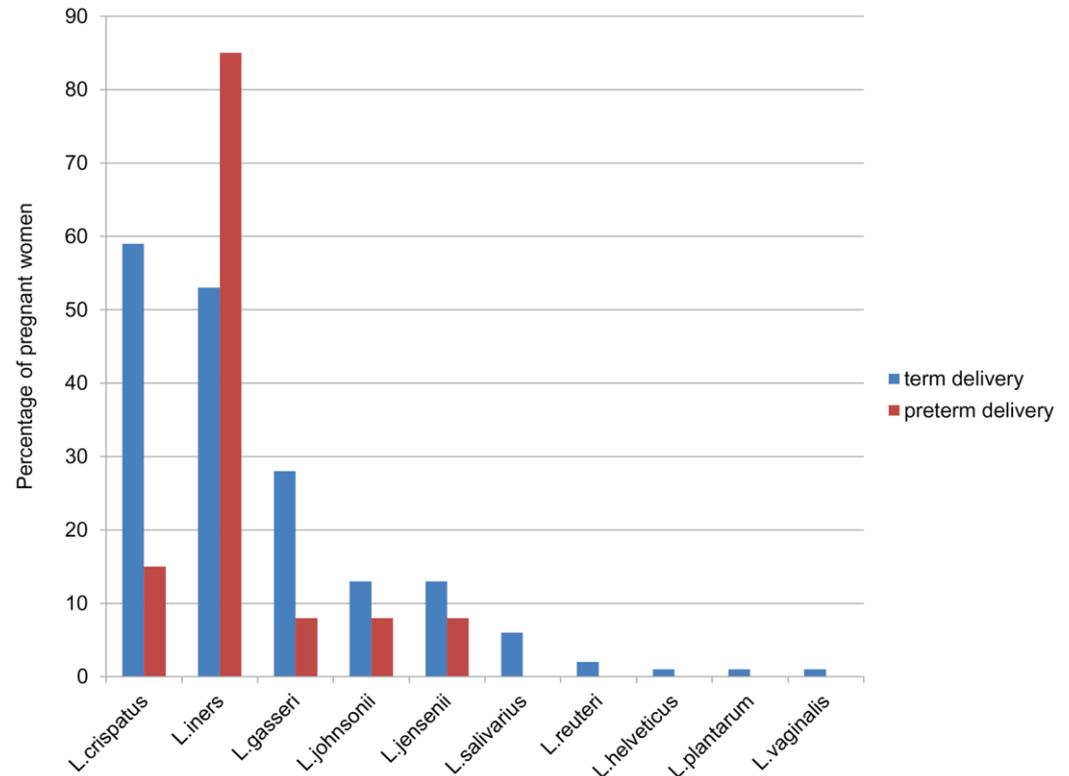
Sumit J. Shah, Kenneth H. Yu, Vineet Sangar, Samuel I. Parry, Ian A. Blair
J Proteome Res. 2009 May ; 8(5): 2407–2417. doi:10.1021/pr8010342.



Aportes de la proteómica en la disfunción vaginal y parto pretérmino

Characterization of the vaginal *Lactobacillus* microbiota associated with preterm delivery. Ljubomir Petricevic, Konrad J. Domig, Franz Josef Nierscher, Michael J. Sandhofer, Maria Fidesser, Iris Krondorfer, Peter Husslein, Wolfgang Kneifel & Herbert Kiss. SCIENTIFIC REPORTS 2014; | 4 : 5136 | DOI: 10.1038/srep05136

Espectrometría de masa:
MALDI TOF: caracterización de
diferentes especies
bacterianas de un mismo
género: ej. *Lactobacillus*



Vaginosis bacteriana (VB)

➤ **Desplazamiento microbiota normal** (desequilibrio de microbiota endógena: requiere desequilibrio estrogénico previo)

- *Lactobacillus* (productores de H_2O_2)

➤ **Reemplazada por el Complejo GAMm**

- *Gardnerella vaginalis*

- **Anaerobios** (*Prevotella, Porphyromonas, Peptostreptococcus*)

- *Mobiluncus* (b - curvos)

- *Mycoplasma hominis*

➤ **Ausencia de RIV**

Factores de riesgo

- **Actividad sexual**
- **Hábitos sexuales**
- **Duchas vaginales**
- **DIU**
- **Raza negra**
- **Tabaquismo**
- **Estado socioeconómico**
- **HPV**
- **Stress psicológico**
- **Falta de lactobacilos productores de agua oxigenada (ausencia de *L. crispatus*, predominio de *L. gasseri*)**

Cherpes TL et al. [Sex Transm Dis.](#) 2008 Jan;35(1):78-83

Significado clínico

- EPI, abortos tardíos (2º trimestre)
- Partos prematuros (22%): - presencia de sialidasas (VB del LA)
 - ↑ IL_{1β} estimula secreción de PG → parto
 - disbiosis correlaciona con PP y bajo peso
- Polimorfismo de genes que regula la RIV, modificada por la VB → PP
- RPM, corioamnionitis, bajo peso
- Endometritis postparto
- Fiebre puerperal
- Sepsis neonatal
- Infertilidad ovárica y tubárica
- Transmisión y adquisición de HIV y otras ITS

Diagnóstico de vaginosis bacteriana

- **Criterio clínico (Amsel):** presencia de 3 ó mas de los siguientes criterios:
 - Flujo laxo y homogéneo
 - pH \geq 4.5
 - Test de aminas positivo
 - “Clue – cells”
- **Criterio de Nugent:** evaluación microscópica en la coloración de Gram, asignándose un score \geq 7 cuando existe un predominio de microbiota cocobacilar y ausencia de microbiota lactobacilar
- **Corrección de Lanzafame:** Presencia de clue cells agrega 2 puntos al VN

Diagnóstico de vaginosis bacteriana

Redefinición: 3 situaciones

- **Disbiosis extrema (Nugent: 7-10), sin RIV , sin alteración funcional**

Sin signos, ni síntomas. No es patología (correlación con **MICROBIOMA: asignación de etiologías, no resuelto**)

- **Disbiosis extrema (Nugent: 7-10), sin RIV , con alteración funcional que define Amsel: Vaginosis bacteriana**

Definición del Grupo del National Institute of Health (2008)

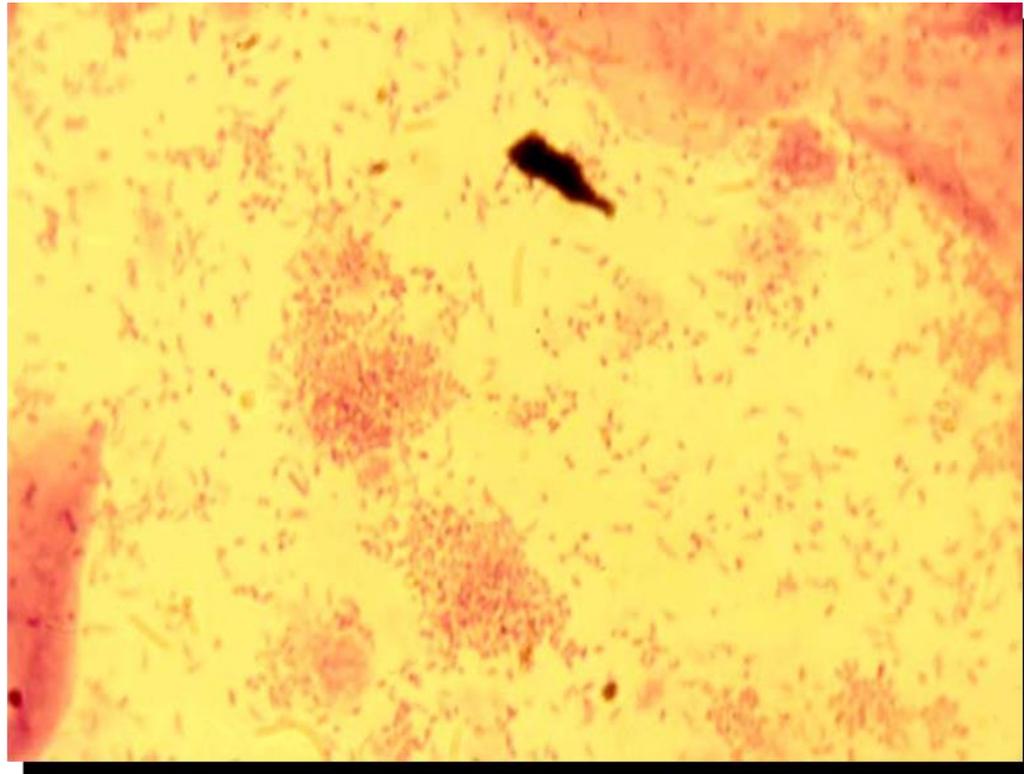
(correlación con **METABOLÓMICA**) Marrazzo et al. Sex Transm Dis 2010;37:732-744.

- **Disbiosis extrema (Nugent: 7-10), con RIV (algunas situaciones)**

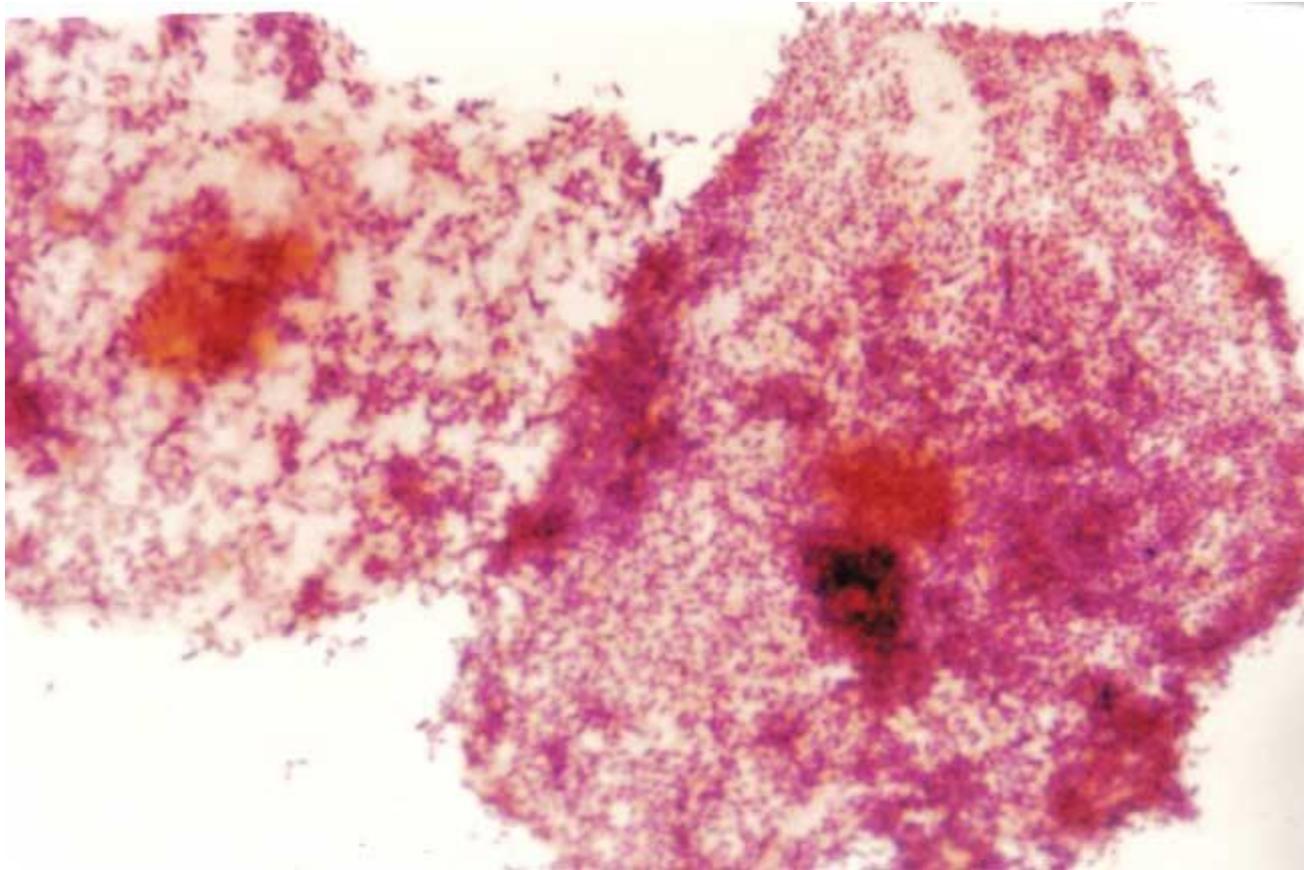
Aumento de IL-6, IL-8, IL-1 α , IL-1 β , eicosanoide 12-hidroxi- ácido eicosatetraenoico (12-HETE)

Alcade ML et al. AIDS Research and Hyman Retrovirus 20187; 33:309-17 McMillan A et al. Sci Rep 2015; 5: 14174

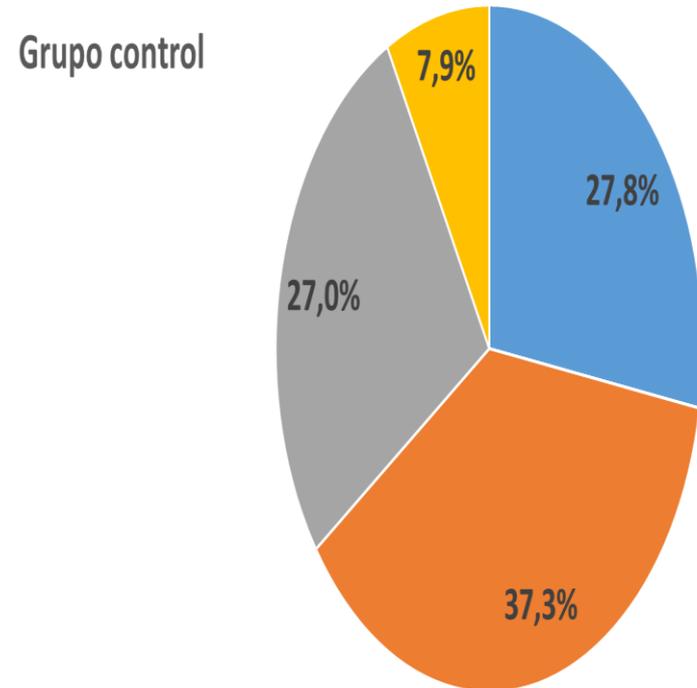
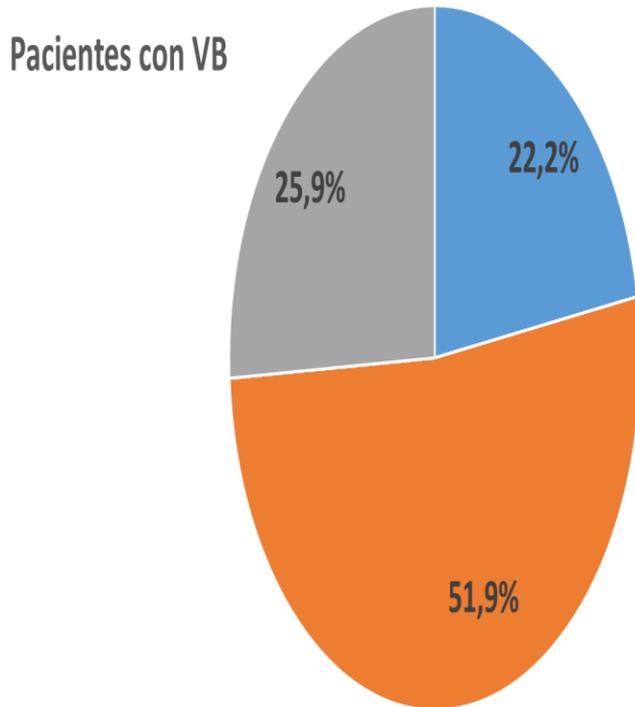
Estados Vaginales Básicos IV: Vaginosis bacteriana



Estados Vaginales Básicos IV: Vaginosis bacteriana (clue cells)



ESPECIES DE *Lactobacillus* ASOCIADAS CON VAGINOSIS BACTERIANA IMPORTANCIA DE SU CARACTERIZACION



■ *L. crispatus* ■ *L. gasseri* ■ *L. jensenii*

■ *L. crispatus* ■ *L. gasseri* ■ *L. jensenii* ■ Otros

Ana Paula Reyes, Losada, Mirta; Payalef, Sandra, Gomez Cherey, Facundo; Guridi, Lucía; Cora Eliseht, Martha; Suzuki, Verónica; Tinirello, María de los Angeles; Maldonado, Verónica; Fleider, Laura; Vay, Carlos; Famiglietti, Angela; Tatti, Silvio; Perazzi, Beatriz

CUBRA XV 2019

Vaginitis microbiana inespecífica

- **Donders (2002) "vaginitis aeróbica"**
 - **Clínica:** descarga vaginal amarillenta, dispareunia, ulceración e inflamación vaginal
 - **Características:**
 - ↓ n° lactobacilos
 - ↑ pH
 - ausencia clue-cells
 - abundantes neutrófilos (RIV)
 - microorganismos múltiple: cocos / bacilos
- (microbiota endógena: intestino, boca, piel ambiente)
- (MBE)
- Estado previo de vaginosis favorece la colonización
 - Requiere **cultivo**
 - Presencia de células parabasales
 - Complicaciones: PP, RPM, corioamnionitis, abortos

Estados Vaginales Básicos V:

Vaginitis microbiana inespecífica

- Lactobacilos ausentes y predominio de **microbiota habitual endógena con RIV** (Desbalance con RIV)
- Etiologías múltiples: agentes de intestino, boca, piel, ambiente (morfotipos bacterianos extraños)
- Estado previo de vaginosis: favorece la colonización
- Requiere **cultivo (VN: 4-6)**: CGP o BGN (**VV con levaduras**)
- RIV puede ser de origen vaginal, cervical o ITU.
- **V con VN:7-10: investigar ITU o cervicitis, Origen vaginal: TV y en menor frecuencia VB) (no levaduras o no VV)**
- Frecuentemente se observan células parabasales
- Desbalance de microbiota con mayor riesgo de ITS
- pH elevado. Se asocia a **trichomonas** en sintomáticas.

Estados Vaginales Básicos V: Vaginitis microbiana inespecífica

➤ Microorganismos involucrados

- *E. coli* / *Klebsiella* spp. / *H. Influenzae* (5 veces mas riesgo de PP)
- *S. agalactiae*
- *S. aureus*
- *Enterococcus* spp.
- Bacterias corineformes
- *Actinomyces* spp.
- *T. vaginalis* asociada (riesgo de ITS) (VPP BACOVA: 75%)

• Morfotipos Bacterianos Extraños → BACOVA: ALERTA

Estados Vaginales Básicos V: Vaginitis microbiana inespecífica

Citoquinas

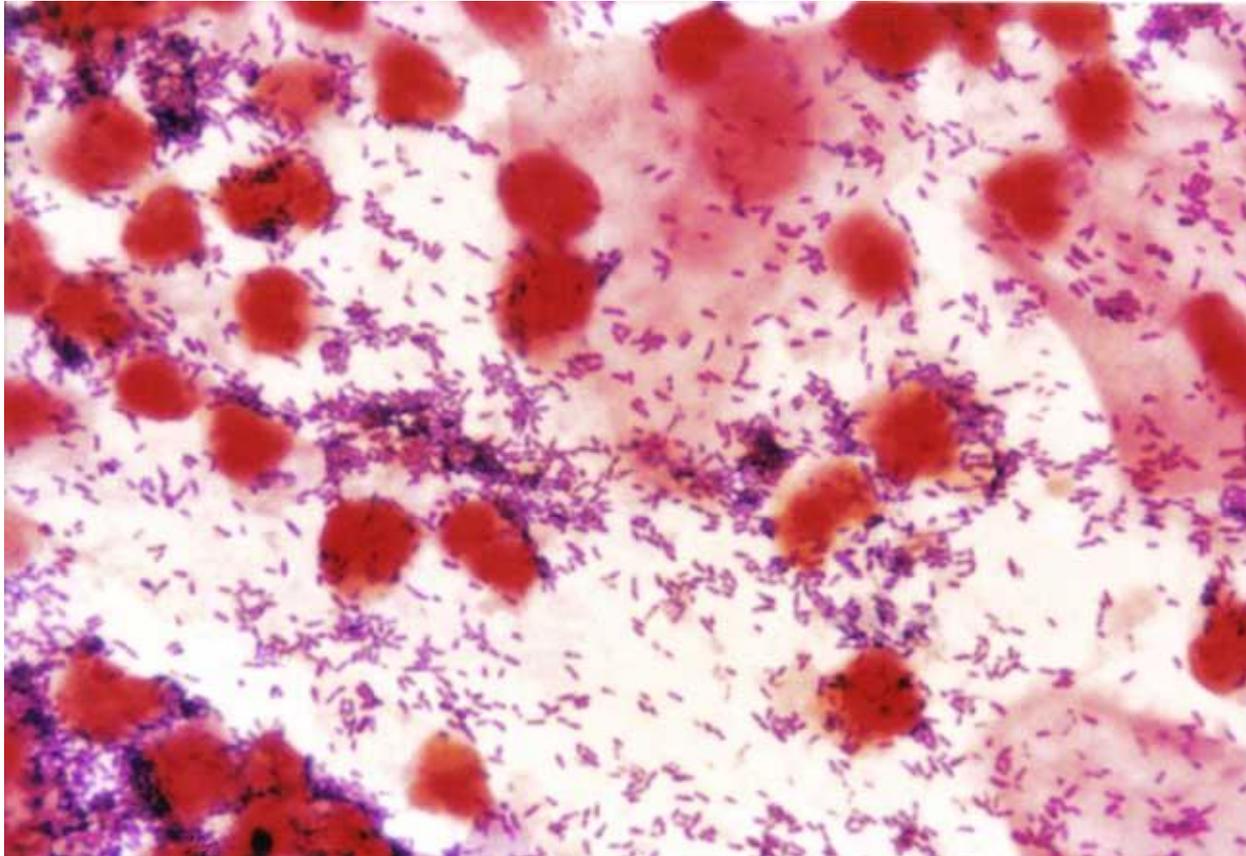
- - \uparrow IL-1 β en fluido vaginal \cong VB
- - \uparrow IL-8 proinflamatorias \neq VB \longrightarrow Producción PG \longrightarrow PP/RPM
- - \uparrow IL- (reclutan neutrófilos) \longrightarrow potencia efecto proinflam
- - \uparrow IL-8 + reducción del tamaño cervical: especificidad 93% PP

Origen de RIV

- Vaginal: **vaginitis convencionales** (VN:4-6), **TV** con VN 7-10
o **VB** con VN 7-10 en menor frecuencia
- Infección de otro nivel del TGI (cervicitis)
- ITU

Cultivo de endocervix y de orina: sugerir por BACOVA

Estados Vaginales Básicos V: Vaginitis microbiana inespecífica





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

Beatriz Perazzi, Verónica Maldonado, Mirta Losada, María del Verónica Suzuki, Carmen Diaz Altuzarra, Silvina Cocucci, Ana Paula Rodriguez, Eduardo Montalvo; Pamela Ocampo, Martha Cora Eliseht, Sergio Provenzano, Carlos Vay, Silvio Tatti, Famiglietti, Angela

Revista Bioquímica y Patología Clínica 2018 Vol 82 N° 1: 57-70

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

Grupo de estudio

EVB	18 - 24 años (n=65)			25 - 50 años (n=186)			> 50 años (n=118)			Control (n=79)	
	n	%	p	n	%	p	n	%	P	n	%
I	27	41,6	0,20	79	42,5	0,98	72	61	0,08	41	51,9
II	8	12,3		45	24,2		20	16,9		11	13,9
III	3	4,6		6	3,2		2	1,7		5	6,3
IV	13	20,0		29	15,6		14	11,9		14	17,7
V	14	21,5		27	14,5		10	8,5		8	10,2
Total	65	100		186	100		118	100		79	100

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

EVB	Levaduras								Vaginosis bacteriana								<i>T. vaginalis</i>							
	18-24 años (n:65)		25-50 años (n:186)		>50 Años (n: 118)		C (n:79)		18-24 años (n:65)		25-50 años (n:186)		>50 años (n:118)		C (n:79)		18-24 años (n:65)		25-50 años (n:186)		>50 años (n:118)		C (n:79)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%
I	5	7,7	7	3,8	7	5,9	8	10,1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1,6	0	0	1	0,9	0	0
II	3	4,6	5	2,7	2	1,7	3	3,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	0	0	2	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1,3
IV	1	1,5	4	2,1	0	0	3	3,8	13	20,0	28	15,1	15	12,7	15	19,0	1	1,6	0	0	0	0	0	0
V	3	4,6	8	4,3	0	0	3	5,1	14	21,5	20	10,7	8	6,8	7	8,8	2	3,1	1	0,5	0	0	0	0
Total	12	18,4	26	14,0	9	7,6	157	21,5	27	41,5	48	25,8	23	19,5	22	27,8	4	6,3	1	0,5	1	0,9	1	1,3

$p: 0,01$

$p: 0,01$

$p: 0,01$

Frecuencia de los estados vaginales básicos (EVB) de desbalance del contenido vaginal en pacientes con VPH según cada grupo etario

Grupo de estudio

	18 - 24 años (n=20)			25 - 50 años (n=45)			> 50 años (n=15)			Control (n=79)	
EVB	n	%	<i>P</i>	n	%	<i>p</i>	N	%	<i>p</i>	n	%
Desbalance del contenido vaginal (III - IV - V)	9	45,0	0,55	13	28,9	0,65	3	20,0	0,21	27	34,2
Microbiota normal (I - II)	11	55,0		32	71,1		12	80,0		52	65,8
Total	20	100		45	100		15	100		79	100

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

Grupo de estudio

EVB	18 - 24 años (n=23)			25 - 50 años (n=38)			Control (n=79)	
	n	%	<i>p</i>	N	%	<i>p</i>	n	%
Desbalance del contenido vaginal (III - IV - V)	8	34,8	0,81	12	32,4	0,94	27	34,2
Microbiota normal (I - II)	15	65,2		26	67,6		52	65,8
Total	23	100		38	100		79	100

Frecuencia de los estados vaginales básicos (EVV) de desbalance del contenido vaginal en pacientes que utilizan preservativo según cada grupo etario

EVV	Grupo de estudio							
	18 - 24 años (n=21)			25 - 50 años (n=73)			Control (n=79)	
	n	%	<i>p</i>	n	%	<i>p</i>	n	%
Desbalance del contenido vaginal (III - IV - V)	13	61,9	0,06	28	38,4	0,81	27	34,2
Microbiota normal (I - II)	8	38,1		45	61,6		52	65,8
Total	21	100		73	100		79	100

Reacción inflamatoria: 18-24 años: 41,7%; 25-50 años: 40,4%

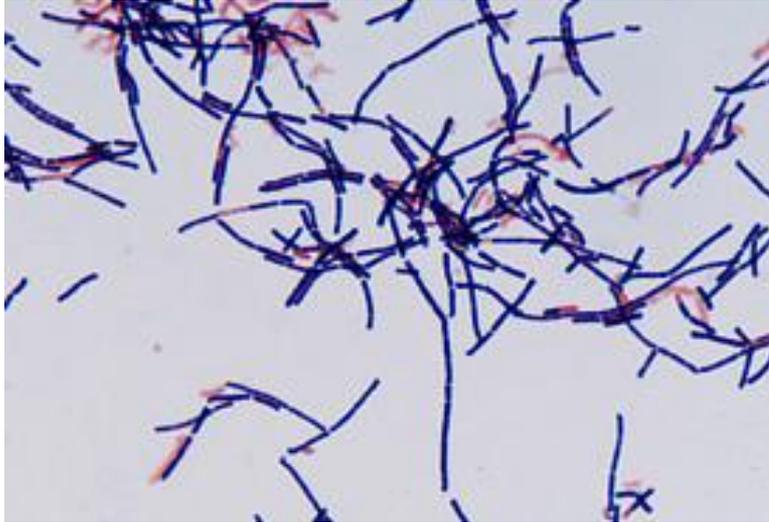
Frecuencia de los estados vaginales básicos (EVB) de desbalance del contenido vaginal en pacientes con DIU según cada grupo etario

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

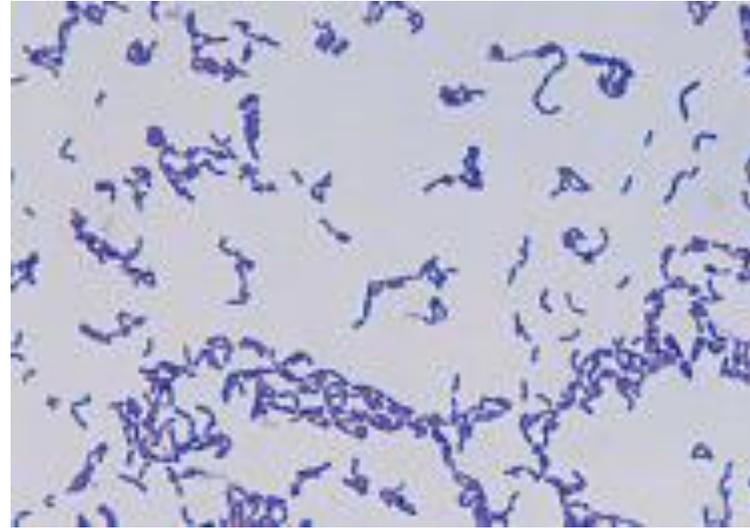
Frecuencia de los estados vaginales básicos (EVB) de desbalance del contenido vaginal en pacientes menopáusicas

EVB	Grupo de estudio		n	%	p
	> 50 años (n=99)	Control (n= 79)			
Desbalance del contenido vaginal (III - IV - V) / Microbiota no lactobacilar	20 / 56	20,2 / 57,6	27	34,2	0,05/ 0,005
Microbiota normal (I - II) / Microbiota lactobacilar	79 / 43	79,8 / 43,4	52	65,8	
Total	99	100	79	100	

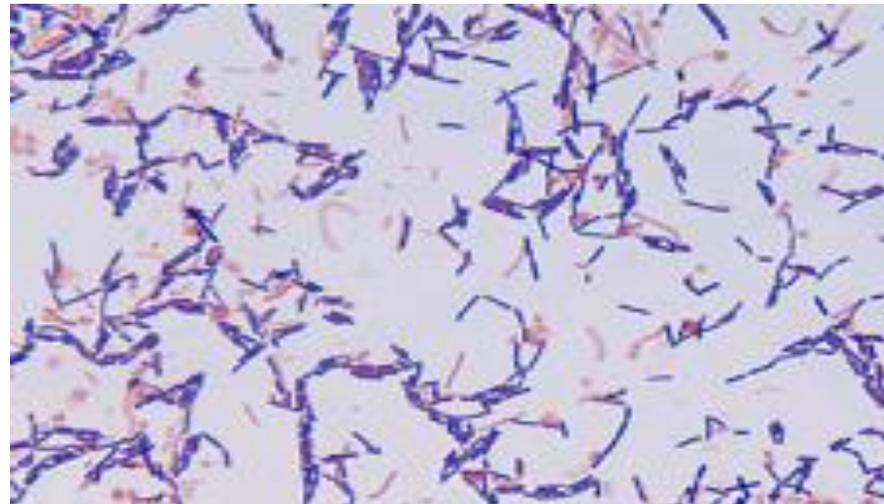
L. crispatus



L. jensenii



L. gasseri



Distribución de las especies de *Lactobacillus* en los distintos grupos de riesgo

	Preservativo (n:44)	ACO (n: 32)	VPH (n:36)	DIU (n:10)	Menopáusica (n:33)	Control (n:40)	<i>p</i>	<i>p</i>
<i>L. crispatus</i> (n=68)	19	12	9	2	4	22	<0,01	0,01
<i>L. gasseri</i> (n=56)	5*1	4*2	12	3	22	10	<0,01	*1 0,02 *2 0,04
<i>L. jensenii</i> (n=54)	12	14	11	5	6	6		
<i>L. iners</i> (n=9)	5	1	2	0	0	1		
<i>L. salivarius</i> (n=3)	1	1	0	0	1	0		
<i>L. vaginalis</i> (n=3)	0	0	2	0	0	1		
<i>L. paracasei</i> (n=1)	1	0	0	0	0	0		
<i>L. rhamnosus</i> (n=1)	1	0	0	0	0	0		
Total (n=195)	44	32	36	10	33	40		

Distribución de las especies de *Lactobacillus* de pacientes embarazadas según la colonización

	<i>Candida</i> spp (n=37)	EGB (n=25)	<i>Candida</i> spp + EGB (n=15)	CONTROL EMBARAZO (n=133)	<i>p</i>	CONTROL NO EMBARAZO (n=40)	<i>p</i>
<i>L. crispatus</i> (n=59)	14	6	0	39	0,01	22	0,002
<i>L. gasseri</i> (n=61)	14* ¹	10* ¹	10* ²	27	<10,03 <10,0004		
<i>L. jensenii</i> (n=56)	7	6	2	41	0,05	6	0,08
<i>L. iners</i> (n=22)	0	2	1	19		1	
<i>L. johnsonii</i> (n=2)	0	0	1	1		0	
<i>L. vaginalis</i> (n=5)	1	1	1	2		1	
<i>L. paracasei</i> (n=1)	0	0	0	1		0	
<i>L. acidophilus</i> (n=1)	0	0	0	1		0	
<i>L. mucosae</i> (n=2)	0	0	0	2		0	
<i>L. murinus</i> (n=1)	1	0	0	0		0	
Total (n=210)	37	25	15	133		40	

***L. crispatus*: embarazadas: 28,1% vs no embarazadas: 55,0%**

***L. jensenii*: embarazadas: 26,7% vs no embarazadas:**

***L. gasseri*: embarazada colonizada: 44,1% vs no colonizada: 20,3%**

Producción de agua oxigenada por las diferentes especies de *Lactobacillus*

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

Identificación de las especies de *Lactobacillus* mediante metodología MALDI-TOF MS y 16S RNAr

ESPECIES	MALDI-TOF-MS (n)	16S RNAr (n)	Concordancia (%)
<i>L. crispatus</i>	92	92	100
<i>L. gasseri</i>	95	95	100
<i>L. jensenii</i>	89	89	100
<i>L. iners</i>	31	31	100
<i>L. salivarius</i>	3	3	100
<i>L. vaginalis</i>	8	8	100
<i>L. johnsonii</i>	2	2	100
<i>L. paracasei</i>	2	2	100
<i>L. mucosae</i>	2	2	100
<i>L. murinus</i>	1	1	100
<i>L. rhamnosus</i>	1	1	100
<i>L. acidophilus</i>	1	1	100
TOTAL	327	327	

CONCLUSIONES

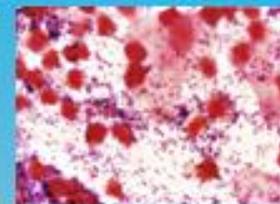
- La **VB** fue la patología más prevalente en todos los grupos etarios.
- Pacientes con **VPH de 18-24 años**: alrededor de la mitad presentaron algún grado de **DV. Asociación positiva con VB.**
- En aquellas que utilizaron **ACO** predominó la **microbiota lactobacilar.**
El equilibrio de la microbiota del contenido vaginal en edad fértil está establecido por mecanismos hormonales, “efecto estrógeno”
- En las mujeres que utilizaron **preservativo** presentaron **EVB** con **reacción inflamatoria.** Influencia del latex y espermicidas
- En el grupo con **DIU** de 25-50 años un alto porcentaje de pacientes presentaron **DV.**
- Las pacientes **menopáusicas** presentaron **bajo grado de DV**, en correlación con el elevado porcentaje de **microbiota lactobacilar**

CONCLUSIONES

- Se destacó el efecto protector ejercido por *L. crispatus* en ACO y preservativo (este último con reacción inflamatoria) (mayor capacidad de disminuir el pH y de producir H₂O₂: mayor rol protector)
- Las pacientes con VPH y con DIU mostraron una tendencia a desarrollar DV, en coincidencia con la disminución de *L. crispatus* y el aumento de *L. gasseri*
- En la menopausia predominó *L. gasseri*, especie relacionada con la predisposición a DV (menor capacidad de disminuir el pH y de producir H₂O₂: escaso rol protector).
- En las pacientes embarazadas no colonizadas predominó *L. crispatus* y *L. jensenii* (especies protectoras), mientras que en las colonizadas por EGB y/o con candidiasis predominó *L. gasseri* (especie con escaso rol protector), asociada a estos microorganismos de origen intestinal.



ESTUDIO DE LA MICROBIOTA VAGINAL EN MUJERES CON LESIONES POR VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO



Montalvo, Eduardo¹; Losada, Mirta¹; Maldonado, Verónica²; Altuzarra, María del Carmen¹; Susuki, Verónica²; Rodríguez, Ana Paula¹; Ocampo, Pamela¹; Cora Eliseht, Martha²; Provenzano, Sergio²; Vay, Carlos¹; Tatti, Silvio²; Famiglietti, Angela¹; Perazzi, Beatriz Elizabeth¹.

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Hospital de Clínicas, Departamento de Bioquímica Clínica, Cátedra de Microbiología Clínica, Área Bacteriología Clínica, Grupo Bacteriología y Parasitología Clínica, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

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

Primera Jornada de INFIBIOC. Noviembre 2017.

Frecuencia de los estados vaginales básicos (EVB) de desbalance del contenido vaginal en pacientes con VPH según cada grupo etario

EVB	Grupo de estudio										
	18 – 24 años (n=20)			25 – 50 años (n=42)			> 50 años (n=13)			Control (n=101)	
	n	%	P	n	%	p	N	%	p	n	%
Desbalance del contenido vaginal (III - IIV – V)	10	50,0	0,11	13	30,9	0,50	2	15,4	0,17	33	32,7
Microbiota normal (I - II)	10	50,0		29	69,1		11	84,6		68	67,3
Total	20	100		42	100		13	100		101	100

Distribución de levaduras y vaginosis bacteriana en cada grupo etario, en pacientes con VPH

Grupo de estudio							
	18 – 24 años (n=20)		25 – 50 años (n=42)		> 50 años (n=13)		p
EVB	n	%	n	%	N	%	0,01
Vaginosis bacteriana	10	50,0	11	26,2	2	15,4	
Levaduras	4	20,0	28	7,1	0	0,0	

Frecuencia de las especies de *Lactobacillus* en pacientes con VPH

MICROORGANISMO	VPH (n; 42)		CONTROL (n: 75)		p
	n	%	n	%	
<i>L. crispatus</i>	10	23,8	45	60,0	0,004
<i>L. gasseri</i>	15	35,7	14	18,6	0,03
<i>L. jensenii</i>	12	28,6	12	16,0	0,09
<i>L. iners</i>	3	7,1	2	2,7	-
<i>L. vaginalis</i>	2	4,8	2	2,7	-
TOTAL	42	100	75	100	

pH	VPH	CONTROL
		4,8±0,9

Producción de agua oxigenada por las diferentes especies de *Lactobacillus* en pacientes con VPH

MICROORGANISMO	N de especies que producen la siguiente cantidad de H2O2 (mg/L)			
	NEGATIVO	1-3	3-10	10-30
<i>L. crispatus</i> (n=55)	0	2	18	35
<i>L. gasseri</i> (n=29)	15	14	0	0
<i>L. jensenii</i> (n=24)	2	7	15	0
<i>L. iners</i> (n=5)	0	3	2	0
<i>L. vaginalis</i> (n=4)	1	0	1	2

CONCLUSIONES

- La **mitad de las pacientes con VPH** del grupo de 18 a 24 años, presentaron algún grado de **desbalance del contenido vaginal**
- La **VB** fue la patología **más prevalente** en todos los grupos etarios de las pacientes con VPH
- Esta tendencia a desarrollar DV, fue concordante con la disminución de *L. crispatus* y el **aumento de *L. gasseri***
- *L. gasseri* resultó una especie con **escaso rol protector**, dada su nula a escasa producción de H₂O₂ y menor capacidad de disminución del pH vaginal



CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA VAGINAL EN MUJERES CON LESIONES POR VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

3° PREMIO ASOCIACION BIOQUIMICA ARGENTINA 2019

Perazzi, Beatriz Elizabeth^{1*}; Payalef, Sandra Noemi¹; Gomez Cherey, Facundo²; Reyes, Ana Paula¹; Guridi, Lucia²; Losada, Mirta¹; Blanco, Analía²; Caruso, Ricardo²; Cora Eliseht, Martha²; Susuki, Verónica²; Tinirello, María de los Ángeles²; Cardinal, Lucía³; Maldonado, Verónica²; Fleider, Laura²; Vay, Carlos¹; Diaz, Lili³; Famiglietti, Angela¹; Tatti, Silvio²

1. Laboratorio de Bacteriología Clínica. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Hospital de Clínicas "José de San Martín" Universidad de Buenos Aires
2. Programa de Prevención, diagnóstico, terapéutica y Vacunación del TGI, División Ginecología. Hospital de Clínicas "José de San Martín" Universidad de Buenos Aires
3. División Patología Ginecológica, Departamento de Anatomía Patológica, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires.

Prevalencia de los Estados Vaginales Básicos (EVV) de desbalance del contenido vaginal en pacientes entre 18-24 años según cada tipo de lesión

EVV	LSIL (n=30)		HSIL (n=12)		Carcinoma (n=1)		Control (n=132)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Desbalance del contenido vaginal (III - IV - V)	17	56,7	8	66,7	1	100,0	50	37,9
Microbiota normal (I - II)	13	43,3	4	33,3	0	0	82	62,1
Total	30	100	12	100	1	100	132	100

LSIL: p: 0,047; HSIL: p: 0,05

Prevalencia de los Estados Vaginales Básicos (EVV) de desbalance del contenido vaginal en pacientes entre 25-50 años según cada tipo de lesión

EVV	LSIL (n=46)		HSIL (n=37)		Carcinoma (n=4)		Control (n=498)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Desbalance del contenido vaginal (III - IV - V)	23	50,0	18	48,6	2	50,0	196	39,4
Microbiota normal (I - II)	23	50,0	19	51,4	2	50,0	302	60,6
Total	46	100	37	100	4	100	498	100

LSIL: p: 0,21; HSIL: p: 0,17

Prevalencia de levaduras, vaginosis bacteriana y trichomonas en pacientes entre 18-24 años según tipo de lesión.

Grupo de 18-24 años								
	LSIL (n=30)		HSIL (n=12)		Carcinoma (n=1)		Control (n=132)	
Patógeno	n	%	n	%	n	%	n	%
Levaduras	5	16,7	0	0,0	0	0,0	34	25,8
VB ^a	14	46,7	7	58,3	1	100,0	47	35,6
Trichomonas	1	3,3	1	8,3	0	0,0	4	3,0

Prevalencia de levaduras, vaginosis bacteriana y trichomonas en pacientes entre 25-50 años según tipo de lesión.

Grupo de 25-50 años								
Patógeno	LSIL (n=46)		HSIL (n=37)		Carcinoma (n=4)		Control (n=498)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Levaduras	9	19,6	5	13,5	0	0,0	121	24,3
VB ^a	22	47,8	16	43,2	2	50,0	162	32,5
Trichomonas	4	8,7	0	0,0	0	0,0	15	3,0

Distribución de las diferentes especies de *Lactobacillus* en las pacientes del estudio según tipo de lesión VPH relacionada

Especies	LSIL (n=23)	HSIL (n=13)	Carcinoma (n=1)	Control (n=233)
<i>L. crispatus</i> (n=87)	12	3	0	72
<i>L. gasseri</i> (n=88)	6	1	1	80
<i>L. jensenii</i> (n=74)	4	6	0	64
<i>L. iners</i> (n=11)	0	2	0	9
<i>L. vaginalis</i> (n=5)	0	1	0	4
<i>L. salivarius</i> (n=2)	0	0	0	2
<i>L. fermentum</i> (n=1)	1	0	0	0
<i>L. acidophilus</i> (n=1)	0	0	0	1
<i>L. paracasei</i> (n=1)	0	0	0	1
Total	23	13	1	233

CONCLUSIONES

- **Mayor desbalance de la microbiota vaginal** en las pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas que en los controles en ambos grupos etarios, especialmente en **HSIL**
- Grupo **HSIL** **baja prevalencia de *L. crispatus*** (especie protectora) y un **incremento de *L. jensenii***, especie que posee un menor rol protector de la disfunción vaginal.
- **Caracterizar las especies de *Lactobacillus* (ROL COMO BIOMARCADOR)**, ya que el incremento de **especies no protectoras** en concordancia con el incremento de VB en estas pacientes, alteran el microambiente vaginal y actúan como **potenciales cofactores** en la **persistencia** de una infección por **VPH** e incrementan el **riesgo de adquirir otras infecciones de transmisión sexual**.

**MUCHAS GRACIAS
POR SU ATENCIÓN**



VirtuaLAB

3er Congreso Virtual
de Bioquímica Clínica **2019**

NUEVAS HERRAMIENTAS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA DISFUNCIÓN VAGINAL: APORTES DE LA METAGENÓMICA, PROTEÓMICA Y METABOLÓMICA

Prof. Dra. Beatriz Perazzi

Vicedirectora del Departamento de Bioquímica Clínica.

Profesora Adjunta Microbiología Clínica.

Directora de PROSAR (FBA).

Jefa del Laboratorio de Química Clínica.

Departamento de Bioquímica Clínica. Hospital de Clínicas.

Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.