

MICROBIOTA VAGINAL NORMAL: LOS LACTOBACILOS

Q.B.P. Marcos Daniel Martínez Peña*, Dra. Graciela Castro Escarpulli**, Dra. Ma. Guadalupe Aguilera Arreola**.

Laboratorio de Bacteriología Médica
Departamento de Microbiología
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Instituto Politécnico Nacional

Prol. de Carpio y Plan de Ayala s/n Col. Casco de Santo Tomás
Del. Miguel Hidalgo México D.F. CP. 11340

Tel. 57 29 63 00 ext. 62374 / Fax. 57 29 62 07

Autor para correspondencia:

Dra. Ma. Guadalupe Aguilera Arreola.
e-mail: lupita_aguilera@hotmail.com

*Estudiante de posgrado del programa de Maestría en Ciencias en Biomedicina y Biotecnología Molecular, ENCB-IPN. Becario del CONACyT y de PIFI.

**Becaria de la COFAA, del EDI y Miembro del SNI, Financiamiento SIP-IPN 201102462.

Recibido 23 de septiembre de 2011. Aceptado 20 de noviembre de 2011.

INTRODUCCIÓN

El ecosistema vaginal es dinámico y alberga un gran número de microorganismos; de éstos, los lactobacilos se reconocen como uno de los principales agentes protectores de la vagina contra patógenos invasores. De hecho, estas bacterias se han empleado como un grupo indicador de la microbiota vaginal normal y su desplazamiento influye tanto en la adquisición y/o desarrollo de microorganismos causantes de infecciones de las vías urinarias, en el de infecciones endógenas del aparato genital (ITG), y en la adquisición de infección de transmisión sexual (ITS). Esta revisión pretende destacar el papel de la microbiota autóctona de la cavidad vaginal en el mantenimiento de un ambiente saludable para la función sexual y reproductiva femenina. También se enumeran los mecanismos que impiden el desarrollo de microorganismos patógenos en esta cavidad y su utilidad en el diagnóstico de la vaginosis bacteriana.

Palabras clave: Lactobacilos, microbiota vaginal, cultivo, identificación.



LA MICROBIOTA VAGINAL

La microbiota vaginal está constituida por distintos géneros bacterianos, cuya prevalencia depende de la edad de la mujer y de su situación hormonal. La microbiota vaginal se establece en esta cavidad desde el nacimiento. Cuando el producto pasa a través del canal de parto, la biota de la madre es transferida a la hija. Otra vía de colonización es la cercanía entre el ano y la vagina, que permite el paso de la biota del aparato gastrointestinal a la cavidad vaginal.

Los cambios en la microbiota están estrechamente relacionados con la influencia de las hormonas sexuales (principalmente los estrógenos) en los epitelios del tracto genital femenino. En el epitelio de la cavidad vaginal se acumula glucógeno, el cual sirve como fuente de energía y carbono a los microorganismos allí presentes. El glucógeno, además, es empleado por la microbiota lactobacilar para la producción de ácidos orgánicos que mantienen ácido el ambiente vaginal y evitan la implantación de microorganismos patógenos. En el cuadro 1 se muestran los géneros bacterianos de mayor prevalencia en la cavidad vaginal, de acuerdo con las diferentes etapas de la vida de una mujer.

spp., *Bacteroides* spp. y micoplasmas genitales. Los microorganismos dominantes de la cavidad vaginal, en la etapa reproductiva de una mujer (menarca), son los lactobacilos, habiendo sido Döderlein el primero en describir su presencia en este sitio. Los lactobacilos se encuentran en concentraciones que van de 10^7 a 10^8 UFC/mL de fluido vaginal.

En México son muy pocos los trabajos que abordan de forma integral el estudio de la conformación de la microbiota vaginal, las infecciones del aparato genital femenino (ITGF) y las infecciones de transmisión sexual (ITS); sin embargo, el Dr. Pérez-Miravete y colaboradores (1958-1967), realizaron una serie de trabajos sobre microbiota vaginal en población Mexicana, en donde reportan que *L. acidophilus* fue la especie predominante en condiciones normales. Además de ésta, describen otras especies de lactobacilos, como *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. fermenti*, *L. brevis* y *L. casei*. Estos autores reportan también la presencia de miembros del grupo differoides (*Corynebacterium diphtheriae* avirulento) como miembros de la microbiota normal vaginal.

Cuadro 1. Microbiota normal y transitoria en cavidad vaginal

Etapa		Microbiota		
Recién nacida pH vaginal de 7		Ninguna (Estéril)*		
Premenarca pH vaginal de 7		Micrococos, estreptococos α y β hemolítico, enterobacterias, differoides.		
		Aeróbica	Anaeróbica	
Menarca pH vaginal de 4.0 a 4.5	Gram (+)	Cocos	<i>Staphylococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp.	<i>Peptostreptococcus</i> spp.
		Bacilos	<i>Lactobacillus</i> spp. Corinebacterias	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Clostridium</i> spp.
	Gram (-)	Cocos	-----	<i>Veillonella</i> spp.
		Bacilos	Enterobacterias <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Bacteroides</i> spp. <i>Mobiluncus</i> spp.
Embarazo pH vaginal de 4.0 a 4.5		Estafilococos coagulasa negativos, lactobacilos, levaduras.		
Postmenarca pH vaginal de 7		Biota semejante a la biota presente en la premenarca.		

Tomado y adaptado de: Neira, 1998. *Pueden colonizarse durante el parto con *Lactobacillus* spp., pero éstos son eliminados en cuestión de semanas.

La microbiota transitoria de la cavidad vaginal se encuentra dominada por lactobacilos y formas differoides (que incluyen a *Gardnerella vaginalis*), aunque en ocasiones sólo puede estar colonizada por microorganismos anaerobios, incluyendo a los géneros *Peptostreptococcus* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas*

En años recientes, otros trabajos han analizado la conformación de la microbiota lactobacilar en cavidad vaginal (ver cuadro 2). Ángeles-López, en 2001, reportó que, mediante métodos de identificación bioquímica y por API 50 CHL, las especies de lactobacilos de mayor prevalencia, en la población mexicana, fueron *L. acidophilus* y *L. crispatus*; además, encontró que 62 de

86 cepas de lactobacilos analizadas fueron productoras de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), siendo el único trabajo en México, hasta donde sabemos, donde se analizaron las especies de lactobacilos productoras de H₂O₂ en la microbiota vaginal. Otro trabajo, realizado con base en métodos de biología molecular, es el de Martínez-Peña, en 2009, quien reporta las especies de la microbiota lactobacilar encontradas en cepas aisladas de mujeres entre 18 y 65 años de edad, mientras que Hernández-Rodríguez y colaboradores (2011), describen a las principales especies de lactobacilos en una población de mujeres embarazadas (ver cuadro 2).

Elie Metchnikoff (1845–1916) fue de los primeros en describir las cualidades benéficas de algunos microorganismos (*Bulgarian bacillus*), difundiéndose así rápidamente por todo el este de Europa el uso del primer probiótico. Este término fue subsecuentemente acuñado para referirse a organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal (homeostasis de comunidades bacterianas).

Cuadro 2. Estudios en México sobre la microbiota lactobacilar.

Autores	Especies reportadas en cada estudio	Método de identificación empleado
Ángeles-López, 2001	<i>L. acidophilus</i> <i>L. crispatus</i> <i>L. brevis</i> <i>L. fermentii</i> <i>L. jensenii</i>	Aislamiento e identificación bioquímica convencional y con API 50 CHL.
Martínez-Peña, 2009	<i>L. fermentum</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. hammensii</i> <i>L. gasseri</i>	Aislamiento e identificación por PCR y secuenciación del gen 16S rRNA.
Hernández-Rodríguez, 2011	<i>L. acidophilus</i> <i>L. iners</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. delbrueckii</i>	PCR-DGGE e identificación por secuenciación del gen 16S rRNA.

LA MICROBIOTA LACTOBACILAR Y SUS MECANISMOS DE PROTECCIÓN

Se sabe que los lactobacilos interfieren en la implantación de los patógenos por diferentes mecanismos. La adherencia de los lactobacilos a las células epiteliales ha demostrado ser un factor importante en la colonización de las membranas de las mucosas. Los lactobacilos pueden proteger el epitelio vaginal mediante una serie de estrategias: por exclusión competitiva de patógenos hacia los receptores de superficie presentes en las células epiteliales, por la coagregación de los lactobacilos con algunas bacterias uropatógenas o por la producción de compuestos antimicrobianos (ácido láctico, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y biosurfactantes). Todas las estrategias pueden llevar a una inhibición del crecimiento del patógeno. Las fases hormonales luteínica y estrogénica influyen en las células epiteliales de la mucosa vaginal generando la producción y acumulación de glucógeno en el interior de éstas. La liberación de glucógeno por la citólisis interviene en los mecanismos de acidificación vaginal, de acuerdo con la edad, fase del ciclo menstrual, estadio del embarazo, dieta, presencia de biota transitoria, etc. Los lactobacilos metabolizan el glucógeno hasta la producción y liberación de distintos ácidos orgánicos, siendo el de mayor relevancia el ácido láctico. Estos ácidos producirán la acidificación del medio, lo que lleva a una acción bactericida, salvo para los propios lactobacilos que son resistentes a la acidez.

En términos generales, una serie de requerimientos tienen que ser identificados como propiedades de las cepas de lactobacilos para ser considerados como organismos probióticos efectivos, entre los que se incluyen la habilidad de: 1) adherirse a células, 2) excluir o reducir la adherencia de patógenos, 3) persistir y multiplicarse, 4) producir ácidos orgánicos, H₂O₂, y bacteriocinas antagónicas al crecimiento patógeno, 5) resistir a microbicidas vaginales y espermicidas, 6) ser inocuo y por consiguiente no invasivo, no carcinogénico y no patógeno, 7) coagregación a los patógenos, y 8) mantener en un estado estable la microbiota vaginal. Con base en las propiedades descritas anteriormente, algunas de las especies que forman parte de la microbiota vaginal se han empleado en una serie de productos comerciales de consumo humano que las utilizan como probióticos, con el propósito de mantener la homeostasis de la microbiota presente en diversos sitios anatómicos. Algunos de estos productos son: Lacteol Fort (antidiarreico), Lactovagil (restaurador de biota vaginal), Yakult (restaurador de biota intestinal) y Activia (restaurador de biota intestinal y vaginal). Los lactobacilos como probióticos son usados terapéuticamente como inmunomoduladores, hipocolesterolemiantes en tratamientos de artritis reumatoide, en prevención de cáncer, en intolerancia a la lactosa, en prevenir o reducir los efectos de la dermatitis atópica, en la enfermedad de Crohn, en diarrea y en estreñimiento, así como en candidosis e infecciones del tracto urinario.

LOS LACTOBACILOS SON IMPORTANTES EN LA MODULACIÓN DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO

De acuerdo con el apartado anterior, los lactobacilos son empleados comercialmente para el restablecimiento de la microbiota vaginal debido a su acción como probiótico y a su papel como moduladores de la respuesta innata del sistema inmunológico. Dentro de este último aspecto, cabe señalar que, la respuesta innata consta de dos fases: en la primera se lleva a cabo el reconocimiento de moléculas comunes a los microorganismos, denominados patrones moleculares asociados a los microorganismos (PMAM); en la segunda fase, se lleva a cabo la respuesta efectora que es inmediata al reconocimiento de los PMAM. En ésta intervienen factores humorales con poca especificidad y una respuesta celular sin memoria inmunológica. La microbiota lactobacilar presente en la cavidad vaginal participa en la estimulación del sistema inmunológico ya que es capaz de inducir la producción de citocinas, moléculas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias para el mantenimiento de la homeostasis de la mucosa vaginal, que regulan las vías de señalización desencadenadas por la unión de los PMAM (LPS, flagelo, etc.) (Figura 1) a los receptores tipo Toll.

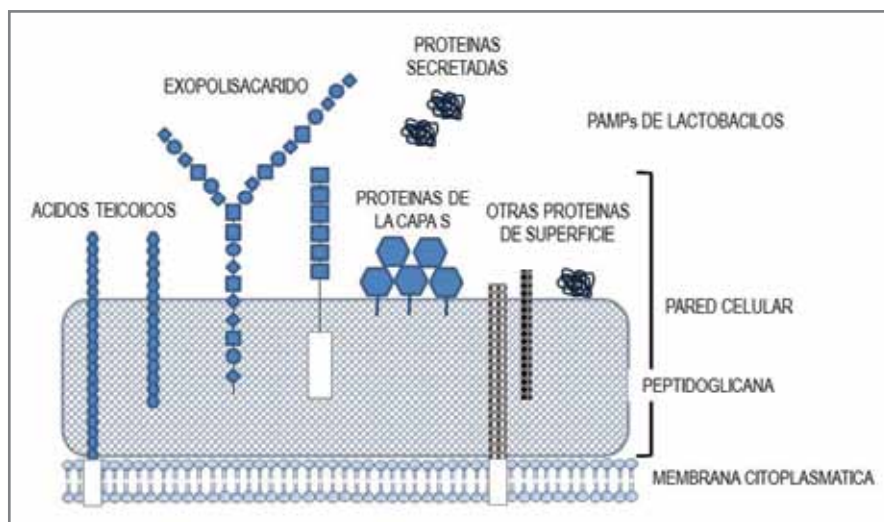


Figura 1. Arquitectura de la superficie celular de lactobacilos. La pared celular de los lactobacilos está compuesta por diferentes macromoléculas que se reconocen como los patrones moleculares asociados a microorganismos (PAMPs), los cuales son reconocidos por el sistema inmune mediante los receptores de patrones de reconocimiento (PRR) como los TLRs. Modificado de: Lebber, et al., 2008.

ENFERMEDADES QUE PUEDEN DESPLAZAR LA MICROBIOTA VAGINAL

En ocasiones el equilibrio dinámico vaginal es quebrantado por una serie de factores químicos, físicos y mecánicos. La vaginitis es la enfermedad ginecológica más común encontrada en la atención médica primaria; es causada por microorganismos tales como *Candida albicans* (candidosis) y *Trichomonas vaginalis*

(tricomonosis). Al mirar una laminilla de la secreción teñida por Gram de pacientes con alguno de los cuadros clínicos antes mencionados, se observa que no hay un desplazamiento de los lactobacilos. Por el contrario, es posible observar a los lactobacilos interactuando con los trofozoitos o las levaduras, con un incremento en el número de polimorfonucleares (PMN) en la secreción (ver figura 2).

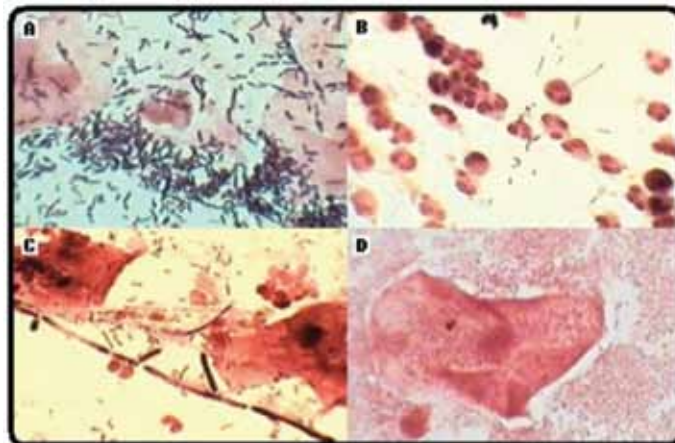


Figura 2. Imágenes de secreción vaginal teñidas por Gram (100x). A) secreción vaginal en la que se observan los morfotipos bacterianos compatibles con lactobacilos y células epiteliales de descamación en una mujer sana; B) secreción vaginal de una mujer con vaginitis, en la que se pueden observar abundantes PMN y algunos morfotipos compatibles con lactobacilos; C) secreción vaginal de una mujer con candidosis, en la que se puede observar pseudomicelio, algunos PMN, células epiteliales de descamación y morfotipos bacterianos compatibles con lactobacilos; D) secreción vaginal de una mujer con VB, en la que se observa una célula clave y morfotipos compatibles con *G. vaginalis*. Imágenes tomadas para propósitos de este trabajo

Otro tipo de alteración es la vaginosis bacteriana (VB). En ésta, por definición, no se desarrolla un proceso inflamatorio, sin embargo en algunas ocasiones se llega a observar un incremento de PMN en la secreción vaginal, sobre todo cuando se trata de una infección mixta. En este síndrome polimicrobiano se presenta una disminución o desplazamiento de la microbiota autóctona vaginal de lactobacilos, por un sobrecrecimiento de microbiota comensal como: *G. vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Mobiluncus* spp., *Micoplasmas* vaginales, *Bacteroides* spp. y *Peptostreptococcus* spp. Uno de los métodos empleados para el diagnóstico de la VB es el criterio de Nugent (ver figura 2), en el cual se observa, mediante un frote de la secreción vaginal teñido por Gram, tanto la disminución de la microbiota autóctona

lactobacilar como el sobrecrecimiento de la microbiota comensal. El criterio de Nugent es útil únicamente en mujeres con ciclo menstrual (menarcas), ya que ellas mantienen las condiciones apropiadas para el desarrollo de los lactobacilos (producción de glucógeno en el epitelio vaginal). En el caso de mujeres premenarcas y posmenarcas, la baja producción de glucógeno evita la implantación de lactobacilos, lo cual implica que con frecuencia la cavidad vaginal (de mujeres que atraviesan por estas etapas de la vida) no esté colonizada con lactobacilos, bacterias que tienen un peso importante en el criterio de Nugent: la ausencia de éstas invalida la aplicación del criterio.

En estudios recientes se ha reportado que en algunos grupos poblacionales (etnias de países como Estados Unidos y Europa), la microbiota vaginal está conformada principalmente por bacterias diferentes al género *Lactobacillus* spp., como *Leptotrichia* spp. y *Megasphaera* spp., los cuales, por presentar una morfología microscópica similar a la de los lactobacilos, pueden ser confundidos con éstos. El estudiar la conformación microbiana de la vagina permite tener un panorama más claro sobre las interacciones entre la biota autóctona y la relación con el hospedero, y así poder usar estos conocimientos para

establecer criterios de diagnóstico en infecciones del tracto genital femenino.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS LACTOBACILOS

Los lactobacilos se encuentran clasificados como bacilos Gram positivos pleomórficos no esporulados, en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey. Pertenecen al orden II "*Lactobacillales*", Familia I "*Lactobacillaceae*", Género I "*Lactobacillus*", que actualmente incluye 102 especies. Sin embargo, en 2009, Ljungh y Wadström publicaron, apoyándose en su estudio de métodos genéticos, un total de 113 especies del género *Lactobacillus*, basándose en una recopilación de estudios fenotípicos y genotípicos.

Los lactobacilos pueden ser diferenciados de otros géneros afines por características fisiológicas y bioquímicas sugeridos por los criterios de Cowan y Steel (1979), con la definición mínima de que son: no móviles, catalasa y oxidasa negativos, anaerobios facultativos y microaerofílicos; la mayoría crece mejor en atmósferas de anaerobiosis o que contengan hasta el 10% de CO₂ (ver cuadro 3).

Cuadro 3. Criterio de Cowan y Steel para la identificación de *Lactobacillus* y otros géneros relacionados.

	<i>Brochothrix</i> spp.	<i>Listeria</i> spp.	<i>Erysipelothrix</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> gpo. I Terrobacteria	<i>Lactobacillus</i> gpo. II Streptobacteria	<i>Lactobacillus</i> gpo. III. betabacteria	<i>Actinomyces</i> spp.
Requerimiento de oxígeno							
• Aerobio estricto	-	-	-	-	-	-	-
• Anaerobio estricto	-	-	-	-	-	-	-
• Anaerobio facultativo o microaerofílico	+	+	+	+	+	+	+
Movilidad	-	+ ^a	-	-	- ^b	-	-
Catalasa	+ ^c	+	-	-	- ^d	-	J
Crecimiento a 5°C	+	+	+	-	- ^e	- ^e	-
Crecimiento a 15°C	+	+	+	- ^f	D	D	?
Gas de glucosa	-	-	-	-	-	+	-
Producción de ácido de:							
• Arabinosa	+	-	-	-	D	D	D
• Maltosa	+	+	+	+	+	+	D
• Melecitosa	+	+ ^g	-	-	D	-	D
• Salicina	+	+	-	+	+	-	D
Vogues Proskauer	+	+	-	-	-	-	-
Reducción de nitratos	-	- ^h	-	-	-	-	D
Producción de H ₂ S ⁱ	-	-	+	-	-	-	D

a. La movilidad debe realizarse entre los 20 y 25°C; b. La movilidad (por flagelos peritricos) ocurre en unas cuantas especies pero ésta se pierde con los subcultivos; c. produce catalasa cuando se incubaba a 20-25°C, d. unas pocas especies producen pseudocatalasa sobre medios con bajo contenido de glucosa; e. algunas especies crecen pobremente a 5°C; f. pocas especies crecen a 15°C; g. *L. grayi* y *L. murrayi* no producen ácido; h. *L. murrayi* reduce nitratos; i. produce H₂S en el medio TSI; j. *A. viscosus* es catalasa positivo (Barrow y Feltham, 2004).

La clasificación fenotípica del género *Lactobacillus* fue propuesta por Rogosa y Sharpe en 1960, la cual se basa en el trabajo de Ørta-Jensen de 1921. Dicha clasificación se fundamenta en la ruta metabólica que emplean los lactobacilos para fermentar los azúcares y los productos de este proceso sobre la glucosa. Posteriormente, los autores subdividieron al género en tres grupos basándose en las temperaturas de crecimiento y la capacidad de fermentación de pentosas.

El género *Lactobacillus* pertenece al grupo de las bacterias ácido-lácticas (LAB), un grupo muy heterogéneo desde el punto de vista taxonómico. Sus miembros tienen como característica común la de producir ácido láctico como catabólico único o mayoritario en la fermentación de los azúcares; sin embargo, también pueden llegar a producir algo de acetato, etanol y CO_2 . En la literatura existen reportes del aislamiento de lactobacilos de fuentes tan variadas como son las plantas, los animales y las cavidades de éstos.

TOMA DE MUESTRA PARA SU AISLAMIENTO

La toma de muestra de un exudado vaginal la debe realizar personal capacitado y además debe llevarse a cabo con el empleo de un espéculo bivalvo estéril, desechable y sin el uso de lubricantes. La muestra debe ser recolectada con hisopos de alginato, los cuales se rotan en las paredes internas de la cavidad vaginal y, una vez que se tiene la muestra de exudado vaginal, se realiza la siembra inmediata de ésta. Si lo anterior no es posible, puede colocarse en medios de transporte adecuados, siendo el medio Stuart el más recomendable para los lactobacilos facultativos y el medio tioglicolato para las especies anaerobias estrictas.

CULTIVO

Los miembros del género *Lactobacillus* spp., presentan requerimientos nutricionales complejos para su desarrollo, como son cierto tipo de ácidos orgánicos, aminoácidos, vitaminas y derivados de ácidos nucleicos. En el primoaislamiento, además de cumplir con los requerimientos nutricionales, es necesario considerar su naturaleza acidúrica y acidofílica (pH óptimo de 5.5–6.2). El crecimiento de los lactobacilos se puede realizar en diferentes medios bacteriológicos especiales, como el medio MRS (De Man, Rogosa, Sharpe), el cual además de ser empleado para el crecimiento puede ser el medio basal para diferentes pruebas bioquímicas. Se ha reportado que algunas especies de lactobacilos no crecen en el medio MRS, como *L. iners*, que requiere para su desarrollo el medio de cultivo gelosa sangre. Otro medio empleado para el cultivo y aislamiento selectivo de los lactobacilos es el SL (Rogosa, Mitchell y Wiseman), cuyo fundamento radica en la presencia de Tween 80, iones acetato y pH bajo. Este medio es recomendado para el aislamiento selectivo a partir de muestras de cavidad oral y del tracto gastrointestinal. Otro medio empleado es el APT (All Purpose Tween), el cual fue diseñado para determinar los requerimientos de tiamina de los lactobacilos de tipo heterofermentativos. Además, el Tween 80 es utilizado como fuente de ácidos grasos.

Los cultivos de lactobacilos se deben incubar a una temperatura de $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, dado que su intervalo de crecimiento óptimo se encuentra entre los 30°C y 40°C . Se deben colocar, para obtener un buen desarrollo, en atmósferas de anaerobiosis o parciales de CO_2 , que van del 5% al 10%.

En el diagnóstico de algunos cuadros clínicos, como la vaginosis bacteriana y la vaginitis, se emplean medios bacteriológicos como la gelosa sangre (Figura 3), el Casman o la gelosa chocolate, que están enriquecidos para que puedan crecer algunas especies de lactobacilos y, de los cuales, se puede hacer el aislamiento de los microorganismos.



Figura 3. Imagen de un cultivo de secreción vaginal en medio gelosa sangre adicionado con 5% de sangre de cordero. En la imagen se pueden observar diferentes morfotipos coloniales; el área ampliada muestra la capacidad de inhibición de crecimiento de algunos morfotipos coloniales sobre otros. Fotografía tomada para propósitos de este trabajo.

MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA Y COLONIAL

La morfología microscópica (morfotipo) característica del género se observa mediante un frote teñido por la tinción de Gram. Mediante esta técnica es posible identificar los diferentes morfotipos bacterianos compatibles con los lactobacilos, que van desde bacilos Gram positivos largos curvos hasta bacilos Gram positivos cortos (figura 4).

El morfotipo colonial característico del género es muy diverso, ya que se han descrito colonias que van de los 2 a los 5 mm de diámetro, algunas con bordes enteros y otras, con bordes irregulares. También pueden ser convexas, lisas, brillantes u opacas, rugosas, traslúcidas y no pigmentadas (figura 5).

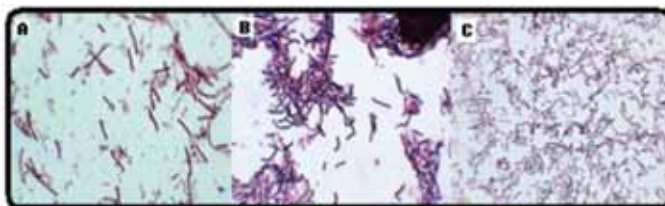


Figura 4. Morfotipo microscópico del género *Lactobacillus*. A), B) y C): Morfotipo microscópico de lactobacilos de primoaislamiento. Tinción de Gram (100x). Fotografías tomadas para propósitos de este trabajo.

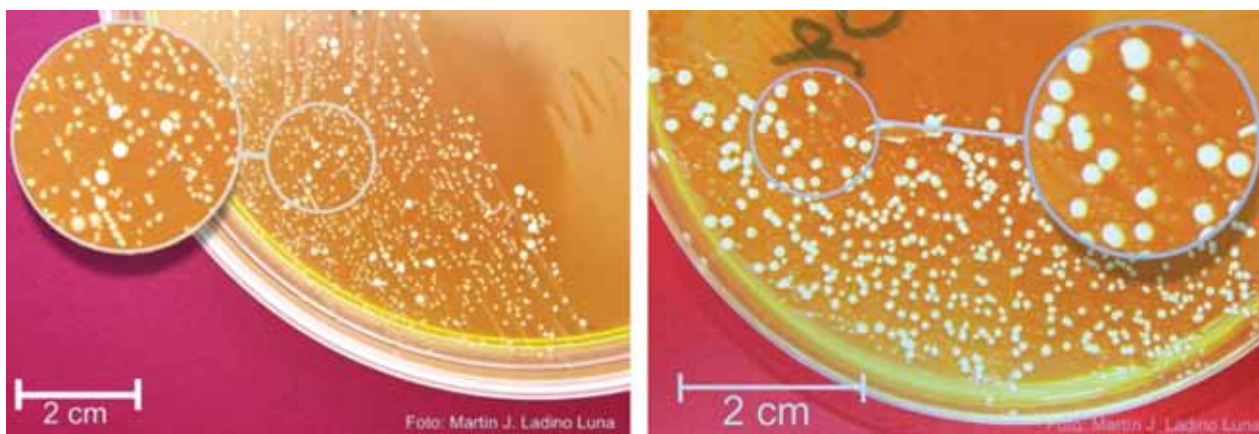


Figura 5. Morfotipos coloniales de lactobacilos en medio MRS obtenidos de primoaislamiento de secreción vaginal. Fotografías tomadas para propósitos de este trabajo.

IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO *Lactobacillus* spp.

Las pruebas fenotípicas son comúnmente empleadas como primer método para la identificación y la clasificación de especies de muchos géneros bacterianos, incluido el género *Lactobacillus*. Sin embargo, se ha reportado que ninguno de los sistemas fenotípicos identifica correctamente algunas especies de este género, debido al alto nivel de variabilidad fenotípica que presenta este grupo bacteriano. Esta circunstancia pone en debate la utilidad de estos métodos para la identificación confiable de cepas de lactobacilos.

Los métodos fenotípicos convencionales más comúnmente empleados se basan en pruebas de fermentación de carbohidratos, con el empleo del medio líquido MRS adicionado con el carbohidrato a estudiar. También pueden ser empleadas las pruebas de hidrólisis de la esculina, la desaminación de la arginina, las pruebas de catalasa y oxidasa, que deben ser, todas ellas, negativas; además, debe ser considerada la capacidad, por parte de la bacteria, de crecer a las temperaturas de 15°C y 45°C. Con base en las pruebas antes mencionadas, se han diseñado sistemas miniaturizados de identificación, como son el API 50 CH y el API 50 CHL, los cuales constan de galerías para analizar la fermentación de 49 carbohidratos. Así, una vez que se tiene el perfil de fermentación de los carbohidratos, se realiza una comparación con los perfiles descritos en la base de datos de la casa comercial. Nigatu, en el 2000, reporta las diferencias entre el método conocido como polimorfismo del DNA amplificado al azar (RAPD) y el sistema semiautomatizado API 50 CH (@bioMerieux Inc., Francia), y concluye que la técnica de RAPD muestra un mayor poder discriminativo al identificar y diferenciar las especies de lactobacilos estrechamente relacionadas, en comparación con el resultado encontrado con el método fenotípico basado en la fermentación de carbohidratos. Estos resultados genotípicos suscitaron la creación de complejos o grupos que constan de especies de lactobacilos estrechamente relacionadas, las cuales presentan características metabólicas muy semejantes entre ellas, como lo es el grupo *Lactobacillus acidophilus* al cual

pertencen las especies más frecuentemente aisladas de cavidad vaginal: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, y *Lactobacillus johnsonii*. Recientemente se sumaron a este grupo: *Lactobacillus amyolyticus* y *Lactobacillus iners*. Otros autores realizaron un análisis filogenético detallado del género, con base en el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA. Los resultados proponen una subclasificación en 9 grupos, cada uno de ellos conformado por diferente número de especies. Los grupos propuestos son: *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. buchneri*, *L. perolens*, *L. salivarius*, *L. vitulinus-cateniformis* y *Pediococcus*.

Las técnicas basadas en PCR se enfocan principalmente en la amplificación de secuencias conservadas (blancos) de los cuales, los genes ribosomales (16S rRNA) son los más comúnmente empleados para fines de identificación, así como las regiones intergénicas de éstos. Éstas técnicas se han empleado con propósitos de identificación, tipificación o monitoreo de cambios en las poblaciones microbianas. Actualmente existen muchas variantes de la técnica de PCR; en el cuadro 4 se muestran algunas de las empleadas en la investigación y el diagnóstico clínico de microorganismos relevantes para la salud humana. (ver cuadro 4; página siguiente).

Otras técnicas moleculares empleadas para determinar de manera más confiable la identidad de los miembros del género *Lactobacillus*, son las que se basan en el análisis de ácidos grasos y fosfolípidos (PFLA), estos últimos considerados como indicadores importantes de la biomasa microbiana activa, además de que existen lípidos característicos de grupos específicos de microorganismos.

Los análisis bioinformáticos (in silico) de las secuencias de ácidos nucleicos permiten conocer de forma más confiable la identidad de los microorganismos a nivel de especie y subespecie, así como saber si existe alguna relación filogenética entre éstas. Lo anterior, ha tenido como resultado el que se genere una nueva clasificación de las especies que conforman al género *Lactobacillus*, con respecto a la clasificación basada en métodos fenotípicos.

Cuadro 4. Técnicas moleculares empleadas para la identificación y tipificación de lactobacilos.

Técnica	Usos	Reproducibilidad	Automatización	Gastos de funcionamiento
RFLP	I/T/D	ALTA	BAJA	ALTO
AFLP	T	ALTA	MEDIA/ALTA	MEDIO
RAPD	T/D	BAJA	MEDIA	BAJO
ERIC	T	MEDIA	MEDIA	MEDIO
REP	T	MEDIA	MEDIA	MEDIO
DGGE	T/D	ALTA	MEDIA	MEDIO

RFLP: polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción; AFLP: polimorfismos en la longitud de los fragmentos de amplificación; RAPD: amplificación al azar de fragmentos polimórficos de DNA; ERIC: secuencias intergénicas consenso repetidas en enterobacterias; REP: secuencias palindrómicas repetitivas; DGGE: electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante; I: identificación; T: tipificación; D: estudios de diversidad bacteriana. Construido con información de: Sambrook, *et al*, 1989; Lewin, 1994; Coolen, *et al*, 2005; Settanni, *et al*, 2006; Ljungh, *et al*, 2009.

La tendencia actual es la utilización de técnicas (metagenómica) que permiten caracterizar a las comunidades microbianas presentes en una muestra clínica (por ejemplo la secreción vaginal) más que a la búsqueda dirigida de un género en particular. En los estudios de diversidad bacteriana para describir a las comunidades microbianas, se emplean métodos moleculares como son aquellos basados en la DGGE-PCR (reacción en cadena de la polimerasa y electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante), con la que se pueden conocer los microorganismos presentes en una muestra y, en años recientes, la secuenciación masiva de DNA metagenómico, ha permitido conocer de forma más completa los microorganismos que conforman la comunidad microbiana, incluyendo a aquellos microorganismos no cultivables aún.

LOS LACTOBACILOS COMO AGENTES PATÓGENOS

Las cualidades benéficas de los lactobacilos y su localización en distintos hábitat, como son la piel, el tracto intestinal, la vagina humana y de otros animales, se ha reportado ampliamente en la bibliografía; no obstante, en ocasiones se les reporta también como agentes patógenos, encontrándose en la literatura informes de cepas de lactobacilos como agentes etiológicos de endocarditis, meningitis neonatal, infecciones pleuropulmonares y bacteriemias. Por lo general, en estas circunstancias surgen como agente causal debido a un inmunocompromiso del hospedero. Adicionalmente, los lactobacilos pueden jugar un papel importante en el desarrollo de las caries dentales en infantes, debido a la interacción con algunos microorganismos como *Actinomyces* spp. Fajardo *et al*. (2002), reporta un caso donde *Lactobacillus acidophilus/jensenii* actúa como agente causal único de un absceso submentoniano en un paciente inmunocompetente. A nivel vaginal se debe tener presente que el aumento significativo de lactobacilos, puede provocar un cuadro clínico conocido como lactobacilosis. Si esta condición se mantiene en el tiempo, puede conducir a un grado de acidez anormal en la vagina, que a su vez puede llevar a una lisis de las células epiteliales que se conoce como vaginosis citolítica.

Se debe sospechar en aquellas mujeres que relatan tener múltiples consultas por candidiasis vaginal, con escasa o nula respuesta frente a la terapia antimicótica. Las pacientes suelen cursar con una descarga vaginal blanca, espesa y cremosa, síntomas cíclicos de prurito vaginal.

COMENTARIO FINAL

La descripción de los diferentes microorganismos que conforman la microbiota vaginal ha sido fundamental para conocer cuál es papel que desempeña cada uno de estos para mantener un estado estable de salud vaginal. El empleo de diferentes técnicas de identificación genotípicas juega un papel crucial para elucidar como está conformada la microbiota vaginal pero poco se sabe aún, por ejemplo, de la composición de población lactobacilar en la cavidad vaginal de mujeres mexicanas. A la luz del conocimiento actual a nivel mundial, se puede decir que no es suficiente que la vagina de una mujer esté colonizada por lactobacilos, si no que éstos sean el grupo bacteriano predominante y que se trate de cepas con características benéficas, fundamentalmente que sean productoras de peróxido de hidrógeno (que evite o impida el desarrollo de bacterias anaerobias estrictas catalasa negativas) y que estimulen al sistema inmunológico de la mucosa vaginal. Actualmente, en el laboratorio, los lactobacilos son referencia de un estado normal de la microbiota vaginal; éstos son valorados tanto en la determinación de "grado de limpieza vaginal" como en el "criterio de Nugent" y su ausencia o desplazamiento por otros morfotipos bacterianos son para el analista un indicativo de alteraciones de la microbiota normal que se ve desplazada por la patógena. Si bien esto apoya al diagnóstico, es un hecho que es necesario seguir generando conocimiento sobre la composición de la microbiota normal podría incidir en la mejora de los métodos de diagnóstico, del tratamiento y de la prevención de algunas de las infecciones del tracto genital femenino.

REFERENCIAS

1. Ángeles-López M 2000. Caracterización de *Lactobacillus* spp. aislados de cavidad vaginal. Tesis profesional licenciatura, México DF, ENCB-IPN.
2. Ángeles-López M *et al.* Hydrogen peroxide production and resistance to nonoxinol-9 in *Lactobacillus* spp. Isolated from the vagina of reproductive age women. *Rev Latinoam Microbiol* 2001; 43(4):171-176.
3. Barrow GI, *et al.* 2004. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. Third Edition. Cambridge University Press.
4. Boyd MA, *et al.* Comparison of API 50 CH Strips to Whole-Chromosomal DNA Probes for Identification of *Lactobacillus* Species. *J Clin Microbiol* 2005; 43 (10): 5309–5311.
5. Coolen MJL, *et al.* Characterization of Microbial Communities Found in the Human Vagina by Analysis of Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of 16S rRNA Genes. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(12):8729–8737.
6. Fajardo M, *et al.* Absceso submentoniano por *Lactobacillus acidophilus/jensenii*. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2002; 53(10):791-3.
7. Fernández-Cid A, *et al.* El pH vaginal y su importancia clínica. *Ginecol Obstet Clín* 2004; 5(2):75-80.
8. Fichorova RN, *et al.* Maternal Microbe-Specific Modulation of Inflammatory Response in Extremely Low-Gestational-Age Newborns. *mBio* 2011; 2(1): e00280-10. Published online.
9. Hernández-Rodríguez C, *et al.* Vaginal microbiota of healthy pregnant mexican women is constituted by four lactobacillus species and several vaginosis-associated bacteria. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2011; 1-9. Article ID 851485.
10. Ljungh A, *et al.* 2009. *Lactobacillus* Molecular Biology: From Genomics to Probiotics. Caister Academic Press. Norfolk, UK. Pp. 25-32.
11. Lebeer S, *et al.* Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008; 72(4):728–764.
12. Linhares IM, *et al.* New findings about vaginal bacterial flora. *Rev Assoc Med Bras* 2010; 56(3):370-4.
13. Martínez-Peña MD. 2009. Aislamiento e identificación de cepas de lactobacilos de exudados cervicovaginales. Tesis Profesional Licenciatura, México DF, ENCB-IPN.
14. Murray PR, *et al* 2003. *Manual of Clinical Microbiology*, 8Th, vol. I, USA, Washington DC. Pp. 857–879.
15. Neira MJ, Infecciones Vulvovaginales [en línea], 1998 [citado 01-12-07, 12:56]. Disponible en: <http://escuela.med.puc.cl/paginas/Departamentos/Obstetricia/clases/infvag.html>.
16. Nigatu A. Evaluation of numerical analyses of RAPD and API 50 CH patterns to differentiate *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. sake*, *L. parabuchneri*, *L. gallinarum*, *L. casei*, *Weissella minor* and related taxa isolated from *kocho* and *tef*. *J Appl Microbiol* 2000; 89(6):969-978
17. NOM-039-SSA2-2002. Norma Oficial Mexicana para la prevención y control de las infecciones de transmisión sexual.
18. Nugent RP, *et al.* Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 1991; 29(2):297–301.
19. Pérez-Miravete A. Estudios Sobre Flora Vaginal X.- Microorganismos de la Flora Vaginal y Cervical de Exudados Estudiados en la Ciudad de México. *Rev Latinoam Microbiol* 1963; 6(1-2):50-62.
20. Pérez-Miravete A. Estudios Sobre Flora Vaginal IX.- Clasificación de Lactobacilli de origen vaginal. *Rev Latinoam Microbiol* 1967; 9:50-62.
21. Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press 1989, Cold Spring Harbor.
22. Settanni L, *et al.* Combination of Multiplex PCR and PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis for Monitoring Common Sourdough-Associated *Lactobacillus* Species. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(5):3793–3796.
23. Slover CM, *et al.* Lactobacillus: a Review. *Clin Microbiol Newsle* 2008; 30(4):23-27.
24. Wilson M. 2008. *Bacteriology of Humans, an ecological perspective*. Blackwell Publishing. University College London, Australia. Chapter 6, 170-206.