



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Medicina

Departamento de Estudios Avanzados

Maestría en Ciencias de la Salud

Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental

**“COMPARACIÓN DEL PERFIL FENOTÍPICO DE LA
MICROBIOTA VAGINAL DE MUJERES CON Y SIN CÁNCER
CERVICOUTERINO.”**

TESIS

Que para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias de la Salud

Presenta:

Lic. en Biol. Hilda Angeline Quintos Meneses

Comité Tutorial:

Tutor Académico: Dra. Ninfa Ramírez Durán

Tutor Interno: Dr. Martín Pablo Antonio Moreno Pérez

Tutor Externo: Dr. Ángel Horacio Sandoval Trujillo.

Toluca, Estado de México.

2018.

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT.	5
1. ANTECEDENTES.	6
1.1. CÁNCER CERVICOUTERINO.	6
1.1.1. Cofactores de riesgo para desarrollar CaCu.	7
1.1.2. Clasificación de lesiones cervicales.....	8
1.1.3. Clasificación histopatológica del cáncer cervicouterino.	8
1.1.4. Estadificación del cáncer cervicouterino.	9
1.2. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.	10
1.3. MICROBIOTA.	11
1.4. MICROBIOTA PRESENTE EN EL CUERPO HUMANO.	12
1.4.1. Microbiota en piel.....	12
1.4.2. Microbiota en tracto respiratorio y cavidad oral.....	13
1.4.3. Microbiota gastrointestinal	14
1.4.4. Microbiota vaginal.....	15
1.5. MICROBIOTA VAGINAL EN DISTINTAS ETAPAS DE VIDA DE LA MUJER.	18
1.5.1. Pubertad.	18
1.5.2. Ciclo menstrual.....	19
1.5.3. Embarazo.	19
1.5.4. Postmenopausia.	19
1.6. ALTERACIONES EN LA MICROBIOTA VAGINAL: MICROBIOTA ANORMAL. ..	20
1.7. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA Y PERFIL FENOTÍPICO.	20
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	24
2.1. Pregunta de Investigación.....	25
3. HIPÓTESIS	25
3.1. Hipótesis de trabajo.	25
3.2. Hipótesis nula.	25
4. OBJETIVOS.	25
4.1. Objetivo general.	25
4.2. Objetivos específicos.	25
5. JUSTIFICACIÓN.	26
6. MATERIAL Y MÉTODOS	26

6.3. Muestreo.....	27
6.4. Tamaño de muestra.....	27
6.5. Criterios para mujeres.....	27
6.5.1. Criterios de inclusión:.....	27
6.5.2. Criterios de exclusión:.....	27
6.5.3. Criterios de eliminación:.....	28
6.6. Criterios para bacterias y colonias bacterianas.....	28
6.6.1. Criterios de inclusión:.....	28
6.6.2. Criterios de exclusión:.....	28
6.6.3. Criterios de eliminación:.....	28
6.7. Procedimientos.....	28
6.7.1. Fase de reclutamiento.....	28
6.6.2. Obtención de muestras.....	29
6.6.3. Procesamiento de muestras y aislamiento de cepas.....	29
6.6.4. Caracterización morfológica.....	30
6.6.4.1. Morfología macroscópica.....	30
6.6.4.2. Morfología microscópica.....	30
6.6.4.3. Caracterización enzimática para elección de Galería API.....	30
6.6.5. Obtención de Biomasa.....	32
6.6.6. Pruebas bioquímicas para perfil fenotípico.....	32
6.8. Variables de estudio.....	34
6.9. Implicaciones Bioéticas.....	34
7. RESULTADOS.....	35
7.1. Título del artículo enviado:.....	35
7.1.1. Página frontal del manuscrito.....	35
7.1.2. Carta de envío del manuscrito.....	36
7.1.3. RESUMEN.....	37
7.1.4. ABSTRACT.....	37
7.1.5. INTRODUCCIÓN.....	38
7.1.6. METODOLOGÍA.....	42
7.1.6.1. Obtención de muestras y aislamiento de cepas.....	42
7.1.6.2. Caracterización morfológica.....	42
7.1.6.3. Obtención de Biomasa.....	43

7.1.6.4. Pruebas bioquímicas para perfil fenotípico.	43
7.1.7. RESULTADOS	44
7.1.8. DISCUSIÓN.....	49
7.1.9. Conflicto de Intereses.	51
7.1.10. Agradecimientos.....	51
7.1.11. Referencias	52
7.2. RESULTADOS ADICIONALES	54
7.3. Caracterización enzimática y elección de galerías API.....	54
7.4. Identificación fenotípica y pruebas bioquímicas por galería API.	55
7.5. Aislamiento, purificación, ubicación en grupo morfológico e identificación de cepas mediante análisis API.....	59
7.6. DISCUSIÓN.....	66
8. CONCLUSIONES GENERALES	68
8.1. Conclusiones.....	68
8.2. Limitaciones del estudio.....	69
8.3. Recomendaciones.....	69
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
10. ANEXOS	77
10.1. Consentimiento informado para pacientes o grupo de Estudio	77
11.2. Consentimiento informado para grupo Control.....	80
10.2. Cuestionario de datos sociodemográficos y gineco-obstétricos	83

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una de las enfermedades neoplásicas con mayor mortalidad entre la población femenina de 25 a 64 años de edad; por lo que es importante la relación de esta patología con otros factores biológicos como los microorganismos. La microbiota vaginal autóctona actúa como primera línea de defensa contra infecciones vaginales; cualquier alteración favorece la proliferación de patógenos oportunistas que producen síntomas y enfermedades. El objetivo de este estudio consistió en el uso de sistemas miniaturizados de galerías API para determinar y comparar el perfil fenotípico de la microbiota vaginal de mujeres con y sin cáncer cervicouterino.

Se analizaron muestras cervicovaginales de 80 mujeres donde, 40 muestras provenían de mujeres recién diagnosticadas con CaCu localmente avanzado, grupo al que se denominó como pacientes y 40 muestras provenían de mujeres sin CaCu, grupo al que se denominó como controles.

Por caracterización micro y macroscópica, se aislaron 70 cepas bacterianas para ambos grupos de estudio: 40 cepas se purificaron para el grupo de las pacientes y 30 cepas para el grupo de las controles. El perfil fenotípico e identificación bacteriana se realizó mediante el uso de sistemas miniaturizados de galerías API bioMérieux® empleando API STAPH, API 20STREP, API 20E, API CORYNE y API 50CHL/B. Derivado a esto, se identificaron fenotípicamente 20 fenotipos en total, donde para el grupo de las pacientes se identificaron 12 fenotipos con 7 fenotipos exclusivos y para el grupo de las controles se identificaron 13 fenotipos con 8 fenotipos exclusivos del mismo. Además, se encontraron 5 fenotipos que fueron coincidentes para ambos grupos de estudio.

El desarrollo de un perfil fenotípico con respecto a la microbiota vaginal de mujeres con diagnóstico de CaCu y su comparación respecto a mujeres sin dicha enfermedad, permitirá generar los primeros conocimientos acerca de la temática. El uso de sistemas miniaturizados de galerías API se muestran como una excelente opción de identificación rápida y sencilla para ser empleada por laboratorios que no cuentan con la tecnología e infraestructura para realizar pruebas de identificación molecular, especialmente si se trata de detectar de manera oportuna bacterias que pueden influir en el desarrollo o progresión de alguna patología como puede ser el cáncer cervicouterino.

ABSTRACT.

Cervical cancer (CC) is one of the neoplastic diseases with higher mortality among the female population of 25 to 64 years of age; so it is important the relationship of this pathology with other biological factors such as microorganisms. The autochthonous vaginal microbiota acts as the first line of defense against vaginal infections; any alteration favors the proliferation of opportunistic pathogens that produce symptoms and diseases. The objective of this study was to use miniaturized systems of API galleries to determine and compare the phenotypic profile of the vaginal microbiota of women with and without cervical cancer.

Cervicovaginal samples from 80 women were analyzed, where 40 samples came from women newly diagnosed with locally advanced CC, a group referred to as patients, and 40 samples came from women without CC, a group referred to as controls.

By micro and macroscopic characterization, 70 bacterial strains were isolated for both study groups: 40 strains were purified for the group of patients and 30 strains for the group of controls. The phenotypic profile and bacterial identification was made with miniaturized systems of API bioMérieux® galleries using API STAPH, API 20STREP, API 20E, API CORYNE and API 50CHL/B. Derived from this, 20 ribotypes were phenotypically identified in total, where for the group of patients were identified 12 ribotypes with 7 exclusive ribotypes and for the control group were identified 13 ribotypes with 8 exclusive ribotypes. In addition, 5 ribotypes were coincidental for both study groups. The development of a phenotypic profile with respect to the vaginal microbiota of women diagnosed with CC and its comparison with women without this disease, will generate the first knowledge about the subject.

The use of miniaturized API gallery systems is an excellent option for quick and easy identification to be used by laboratories that do not have the technology and infrastructure to perform molecular identification tests, especially if it is to detect in a timely way bacterias that can influence the development or progression of some pathology such as cervical cancer.

1. ANTECEDENTES.

1.1. CÁNCER CERVICOUTERINO.

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero. Se manifiesta por etapas, inicialmente a través de lesiones precursoras que en grado variable evolucionan a cáncer *in situ* cuando se compromete sólo a la superficie epitelial y posteriormente a cáncer invasor cuando el compromiso traspasa la membrana basal ⁽¹⁾.

Se considera como una de las enfermedades neoplásicas más frecuentes y mortales entre la población femenina, especialmente en el grupo de 25 a 64 años de edad, reflejándose por lo tanto como un grave problema de salud pública mundial al ocupar el cuarto lugar entre los cánceres diagnosticados con casi 528,000 casos anuales y más de 266,000 muertes anuales siendo que cerca del 85% de estas muertes son registradas en países en vías de desarrollo e incluso se espera que para el año 2030, la mortalidad alcance 474,000 casos anuales ^(1,2).

La población femenina en Latinoamérica se considera de alto riesgo para desarrollar CaCu; presenta aproximadamente 68,818 casos anuales, es decir, una incidencia de 21.2 casos por 100,000 mujeres entre 40 y 50 años de edad, sin embargo, este padecimiento se detecta cada vez más en mujeres jóvenes de entre 20 y 30 años ⁽¹⁾.

Tovar y colaboradores ⁽³⁾ realizaron un estudio epidemiológico acerca de la mortalidad por cáncer cervicouterino en México realizado durante los años 1980 al 2004, donde se revelaron las posibles causas, edades prevalentes, año de defunción y entidad federativa; de acuerdo con esto, se determinó que los estados con mayor mortalidad por esta patología fueron Colima, Nayarit y Yucatán, siendo principalmente mujeres mayores de 25 años.

A partir del año 2012, el CaCu en México se reportó como la segunda causa de muerte entre la población femenina de 25 a 64 años de edad y anualmente se estimó una ocurrencia de 13,960 casos⁽⁴⁾.

En el año 2015 se registraron 4,005 casos con una tasa de incidencia de 5.98 por 100,000 mujeres. De acuerdo con un análisis por grupos de edad, para el grupo de 25 años y más, la mortalidad fue de 3,994 defunciones, con una tasa de incidencia de 11.5 por cada 100,000 mujeres. Para este mismo año, el cáncer cervicouterino mostró un incremento en mujeres mayores de 35 años, sin embargo, fue el grupo de 50 a 59 años de edad quienes registraron el mayor porcentaje de incidencia con alrededor del 30% de los casos, siendo Colima, Guerrero, Oaxaca, Veracruz, Morelos, Chihuahua, Yucatán y Chiapas las entidades con mayor mortalidad ⁽⁵⁾. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el CaCu localmente avanzado (etapas IB2 -IVA) representa hasta 80% de los casos en México ⁽⁶⁾.

Para el año 2015 en México y con respecto a la clasificación por etapas clínicas del CaCu, 26.5% correspondieron a carcinoma *in situ*, 25.5% a etapas tempranas, 17.18% a etapas intermedias y un 31.19% a etapas tardías ⁽⁵⁾.

1.1.1. Cofactores de riesgo para desarrollar CaCu.

El CaCu es multicausal y obedece a la asociación de diferentes cofactores de riesgo ⁽⁶⁾, los cuales se enlistan a continuación en la Tabla 1:

Tabla 1. Cofactores de riesgo para desarrollar CaCu.

-
- Edad entre 25 y 64 años
 - Consumo de alcohol
 - Tabaquismo
 - Inicio temprano de vida sexual
 - Uso de anticonceptivos
 - Múltiples parejas sexuales
 - Antecedentes de enfermedades de transmisión sexual
 - Edad del primer embarazo
 - Factores genéticos
 - Deficiencias nutricionales
 - Deficiencia de antioxidantes
 - Condiciones socioeconómicas
 - Analfabetismo
 - Infección cervicovaginal por virus del papiloma humano (VPH)
 - Ausencia de antecedentes en la citología vaginal
-

Modificado de Organización Mundial de la Salud (OMS), 1995-2015.

1.1.2. Clasificación de lesiones cervicales.

El CaCu tiene una evolución a partir de lesiones premalignas no invasivas que se definen como neoplasias cervicales intraepiteliales (NICs) o lesiones intraepiteliales escamosas (LIEs), que son anormalidades del cuello uterino confinadas en el espesor de este; histológicamente se clasifican de la siguiente manera, según la alteración del epitelio ^(6,7):

- NIC I: Displasia leve; lesión con compromiso de 1/3 inferior del espesor del epitelio.
- NIC II: Displasia moderada; lesión con compromiso de 2/3 inferiores del espesor del epitelio.
- NIC III: Displasia grave y carcinoma *in situ*; la lesión compromete todo el espesor del epitelio del cuello de cérvix.

1.1.3. Clasificación histopatológica del cáncer cervicouterino.

La OMS clasifica los carcinomas cervicouterinos en tres grupos: 1) Carcinomas epidermoides, 2) Glandulares o adenocarcinomas y 3) Otros tumores. A su vez, cada uno de estos tres grupos se compone de diversos subtipos histológicos ⁽⁶⁾ (**Tabla 2**):

Tabla 2. Clasificación histopatológica de tumores epiteliales malignos del cérvix uterino

Carcinomas epidermoides	Glandulares	Otros
• Carcinoma epidermoide (CE), de tipo usual	• Adenocarcinoma	• Tumores neuroendocrinos
• Carcinoma epidermoide queratinizante	• Adenocarcinoma mucinoso	- Carcinoide
• Carcinoma epidermoide no queratinizante	- Endocervical	- Carcinoide atípico
• Carcinoma basaloide	- Intestinal	- Carcinoma de células pequeñas
• Carcinoma verrucoso	- Células de anillo sello	- Carcinoma neuroendocrino de células grandes
• Carcinoma condilomatoso	- Desviación mínima	
• Carcinoma papilar	- Vello glandular	
• Carcinoma de tipo linfoepitelioma	• Adenocarcinoma endometriode	• Carcinoma adenoescamoso
• Epidermoide transcisional	• Adenocarcinoma de células claras	• Carcinoma de células vidriosas
• Carcinoma de células fusiformes (sarcomatoso)	• Adenocarcinoma seroso	• Carcinoma adenoideo quístico
	• Adenocarcinoma mesonéfrico	• Carcinoma adenoideo basal
		• Carcinoma indiferenciado

Modificado de Organización Mundial de la Salud (OMS), 1995-2015.

1.1.4. Estadificación del cáncer cervicouterino.

La estadificación se refiere al grado de diseminación de la enfermedad en el cuerpo y se utiliza principalmente para evaluar los riesgos y el pronóstico asociados con la extensión del cáncer, a fin de determinar el tratamiento apropiado para el paciente ⁽⁷⁾.

La Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) ha integrado el sistema TNM (sistema que se usa para describir tanto la cantidad de cáncer como su diseminación. T: Tamaño del tumor y la diseminación del cáncer hacia el tejido cercano; N: Diseminación del cáncer hasta los ganglios linfáticos cercanos; y M: Metástasis) del Comité Unido Americano del Cáncer (AJCC, por sus siglas en inglés) para realizar una estadificación para el CaCu ⁽⁸⁾.

En la actualización del 2010, esta estadificación caracteriza principalmente el tamaño tumoral, extensión de la invasión miocervical, invasión parametrial, extensión de la pared pelviana, afectación de los ganglios linfáticos y presencia de metástasis a distancia ⁽⁸⁾; en México, la Secretaría de Salud determinó el uso de este sistema de estadificación para cáncer cervicouterino ⁽⁹⁾.

En la **Tabla 3**, se muestran los cuatro estadios del CaCu y su definición; también se presenta la etapa clínica o estadio precanceroso 0, que por la FIGO es considerada actualmente como lesión ⁽⁸⁾:

Tabla 3. Estadificación del CaCu.

Estadio	Definición
0	Estadio precanceroso. Se presentan lesiones pequeñas confinadas a la superficie del epitelio del cuello uterino (NICs).
	Presenta crecimiento en profundidad en el estroma. En su anchura, la lesión no se extiende más allá del cuello uterino. Se distinguen varios subestadios con relación a las dimensiones de la lesión y de su visibilidad macroscópica.
	Cáncer invasivo. No es macroscópicamente visible. Invasión del estroma con una profundidad máxima de 5 mm y una extensión horizontal \leq a 7 mm.
I	IA
	IA1 Invasión estromal \leq 3 mm en profundidad y \leq 7 mm de extensión horizontal
	IA2 Invasión estromal $>$ 3 mm y \leq 5 mm en profundidad, con una extensión horizontal \leq a 7 mm.
	Cáncer invasivo. Macroscópicamente visible.
	IB
	IB1 Lesión con diámetro máximo inferior \leq 4 cm
	IB2 Lesión con diámetro máximo superior $>$ 4 cm

	Cáncer visible a nivel macroscópico. Se extiende en los tejidos más allá del útero, pero no llega a los huesos de la pelvis ni al tercio inferior de la vagina.	
II	Tumor sin invasión de parametrios	
	IIA	IIA1 Lesión clínicamente visible ≤ 4 cm en su mayor diámetro
		IIA2 Lesión clínicamente visible > 4 cm en su mayor diámetro
	IIB Tumor con invasión de parametrios, sin llegar a la pared pelviana	
	El cáncer se extiende a la pared pélvica, los huesos y/o el tercio inferior de la vagina y comprime uno o ambos uréteres causando alteración de la función renal.	
III	IIIA	El tumor compromete el tercio inferior de la vagina, sin extensión a la pared pélvica
	IIIB	El tumor se extiende a la pared pélvica y/o causa hidronefrosis o alteración de la función renal
	Cáncer avanzado y metastásico	
IV	IVA	Invade los órganos pélvicos adyacentes (vejiga, recto) y/o se extiende más allá de la pelvis en sí misma, es decir, al abdomen o la ingle.
	IVB	Con metástasis distante a pulmón, hígado o hueso.

American Joint Committee on Cancer (AJCC), 2012.

1.2. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.

La infección cervicovaginal por el virus del papiloma humano (VPH), es considerada como una de las infecciones de transmisión sexual más frecuentes entre la población mundial, con afectación principal en las mujeres jóvenes ⁽¹⁰⁾. Más del 98% de los casos de CaCu invasor están asociados con algún tipo de VPH; esta es la razón principal por la que se ha establecido que la infección por VPH es una causa necesaria pero no suficiente para desarrollar cáncer cervicouterino ^(11,12).

En lesiones precursoras y malignas de CaCu, los genotipos de VPH que son responsables de casi el 70% de los casos de esta patología, particularmente en mujeres menores de 45 años de edad, son VPH16 y VPH18; seguido de otros genotipos altamente oncológicos como son VPH31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 ⁽¹³⁾.

Un estudio de meta-análisis realizado en México ⁽¹⁴⁾, reportó de acuerdo al tipo de lesión, las siguientes frecuencias de VPH: a) Para cáncer invasor: VPH 16 (63.1%), VPH 18 (8.6%), VPH 58 y VPH 31 (5%); b) Para lesiones intraepiteliales de alto grado: VPH 16 (28.3%), VPH 58 (12.6%), VPH 18 (7.4%) y VPH 33 (6.5%); c) Para para lesiones intraepiteliales de bajo grado: VPH 16

(13.1%), VPH 33 (7.4%), VPH 18 (4.2%) y VPH 58 (2.6%); mientras que en mujeres sin lesiones: VPH 16 (3.4%), VPH 33 (2.1%), 18 y 58 (1.2%) .

Existen diversos estudios que intentan buscar la relación existente entre el CaCu y otros factores biológicos como los microorganismos. Destacan entre ellos la investigación de Zur Hausen en el año 2009, por sus trabajos sobre el VPH y su implicación en el CaCu ⁽¹⁵⁾. Recientemente, Godoy y colaboradores en 2015, indicaron la posibilidad de emplear exudados cervicovaginales de mujeres puertorriqueñas entre 20 y 50 años de edad con VPH, como posible biomarcador asociado al CaCu, mediante el análisis de la composición y diversidad metabólica y funcional de su microbiota, a fin de desarrollar herramientas diagnósticas y terapéuticas en la salud y enfermedad de dichas mujeres ⁽¹⁶⁾.

1.3. MICROBIOTA.

La microbiota del cuerpo humano se define como el conjunto de comunidades microbianas que habitan de forma estable e interactúan entre sí en un sitio anatómico específico, autorregulando su concentración numérica, dinámica metabólica ⁽¹⁷⁾ y su material genético colectivo, al cual se denomina microbioma ⁽¹⁸⁾.

La microbiota difiere ampliamente tanto entre individuos como entre sitios anatómicos. Se ha demostrado su importancia y efecto sobre el metabolismo y la susceptibilidad del huésped en el desarrollo de algunas enfermedades ^(19, 20). Su prosperidad depende de factores fisiológicos como humedad, temperatura y nutrientes ⁽²¹⁾; así como de aquellos factores propios del sitio anatómico en donde se desarrolle como son, tracto gastrointestinal, cavidad oral, nasofaringe, tracto respiratorio, piel, vagina, entre otros ⁽²²⁾.

Bajo este precepto, es posible clasificar a la microbiota en dos tipos: 1) Microbiota autóctona o residente, que consta de tipos relativamente fijos de microorganismos presentes con regularidad en cierta región a una edad determinada; cuando se altera se restablece por si misma prontamente. 2) Microbiota transitoria, consiste en microorganismos no patógenos o parcialmente patógenos, que

habitan la piel o la mucosa durante horas, días o semanas; se derivan del ambiente y no producen enfermedad ⁽²³⁾.

1.4. MICROBIOTA PRESENTE EN EL CUERPO HUMANO.

El interés por estudiar una microbiota asociada al cuerpo humano y sus funciones involucradas, han generado diversas investigaciones a lo largo del tiempo; por ejemplo, en el año 1880, Theodor Escherich realizó los primeros estudios acerca de la relación de la fisiología de la digestión y la microbiota de las heces; por otra parte, Albert Döderlein en 1892 y Henry Tissier en el año 1900, enfocaron sus investigaciones al estudio de los lactobacilos vaginales y las bifidobacterias del intestino de los lactantes respectivamente, habiendo postulado el rol de estos microorganismos, principalmente en la protección de las cavidades del organismo frente a las infecciones ^(18, 24).

De esta manera, se indica que el cuerpo humano actúa como sede para albergar a millones de microorganismos; incluso desde el nacimiento existe una relación simbiótica entre la microbiota y las células humanas, la cual es imprescindible para mantener una homeostasis que condiciona el correcto funcionamiento del sistema inmune y por lo tanto para el mantener la salud ⁽²⁵⁾. De ahí la importancia por el estudio de la microbiota a diferentes niveles de colonización en el cuerpo humano ⁽²⁶⁾.

1.4.1. Microbiota en piel.

La piel se considera el órgano humano de mayor tamaño, y actúa como barrera física e inmunológica debido a que se muestran numerosos microhábitats que dependen de variaciones anatómicas como surcos, vello corporal, glándulas sudoríparas y sebáceas ⁽²⁷⁾.

De forma general, en la piel se ha descrito una densidad bacteriana formada por al menos 150 especies, siendo *Corynebacterium*, *Propionibacterium* y *Staphylococcus* los géneros con mayor predominancia ⁽²⁵⁾.

En el cuero cabelludo, la cara, detrás de las orejas, la espalda, regiones sebáceas, entre otras zonas, predominan las propionibacterias y *Malassezia*, las cuales se han descrito como degradantes de los

lípidos presentes en el *sebum* y liberadores de ácidos grasos, factores que influyen directamente en el pH ácido de la piel y en su protección frente al establecimiento de organismos patógenos ⁽²⁸⁾.

Estudios realizados por Patiño y colaboradores en 2013, indican que, la microbiota normal de la piel generalmente engloba bacterias Gram positivas del género *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* y *Bacillus*, que son, además, más resistentes a agentes antisépticos; en menor proporción se encuentran bacterias Gram negativas tales como *Pseudomonas* y bacterias entéricas, así como algunas levaduras y hongos productores de tiña ⁽²⁹⁾.

1.4.2. Microbiota en tracto respiratorio y cavidad oral.

Recientemente se ha demostrado que el pulmón, aunque se consideraba como un órgano estéril, también presenta una microbiota funcional y estable, sin embargo, no existen suficientes estudios que analicen la variación de la microbiota pulmonar en relación con factores ambientales externos y del propio hospedador, esto por requerir procedimientos bastante invasivos ⁽²⁹⁾.

Existen trabajos que han determinado la semejanza en composición de la microbiota del tracto respiratorio inferior con la microbiota de la vía respiratoria superior, pero con menor densidad y diversidad, por lo cual, se han descrito hasta 314 especies diferentes pertenecientes a los filos *Bacteroidetes* (*Prevotella* y *Bacteroides*), *Firmicutes* (*Veillonella*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*), y *Proteobacteria* (*Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Moraxella*, *Neisseria* y *Acinetobacter*) ⁽³⁰⁾.

Por otro lado, la microbiota presente en la cavidad oral es bastante diversa y abundante; esto debido a los múltiples microambientes que se encuentran condicionados por factores anatómicos (dientes, encías o cavidades), factores físicos (fricción con los alimentos o existencia de caries) y los factores químicos (pH o saliva) ^(25,30).

Debido a esto, se han descrito hasta 600 especies bacterianas, entre las que destacan los filos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Chloroflexi*, *Euryarchaeota*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Synergistetes*, *Tenericutes*, y *Candidae*. Existen estudios que demuestran la predominancia del género *Streptococcus*, pero también se han descrito otros como

Actinomyces, Veillonella, Fusobacterium, Porphyromonas, Prevotella, Treponema, Neisseria, Haemophilus, Eubacteria, Lactobacterium, Capnocytophaga, Eikenella, Leptotrichia, Peptostreptococcus, Staphylococcus, y Propionibacterium ⁽³¹⁾.

Para el año 1994, Joklik y colaboradores indicaron que en la placa dentaria se encuentran bacterias como *Streptococcus mutans, Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mitis*; estas se adhieren tanto a los dientes como a la mucosa; *Streptococcus salivarius* predomina en la mucosa lingual ⁽³²⁾. Además, Iwase y colaboradores en 2010, señalan que la adherencia bacteriana es realizada por medio de diferentes polímeros tales como dextranos y levanos, sintetizados por dichas bacterias a partir de hidratos de carbono de la dieta ⁽³³⁾.

1.4.3. Microbiota gastrointestinal

La microbiota intestinal se considera como la más abundante y diversa en el cuerpo humano ^(34,35). Sus funciones principales son, prevenir la colonización por microorganismos que puedan resultar patógenos, la digestión de alimentos, producción de vitaminas B y K que el organismo humano no es capaz de sintetizar y estimular al sistema inmune ⁽³⁶⁾.

El tracto gastrointestinal de una persona adulta puede albergar entre 500 y 1000 especies bacterianas, con una densidad creciente desde el estómago hasta el colón distal, siendo las bacterias de los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* las que muestran predominancia y las que son señaladas como parámetro para evaluar el equilibrio y funcionalidad de la microbiota intestinal ⁽³⁷⁾.

En menor proporción se ha señalado la presencia de *Proteobacteria, Verrucomicrobia, Fusobacteria, Cyanobacteria, Actinobacteria* y *Spirochaetes* ⁽³⁵⁾.

Dado que la microbiota intestinal tiene grandes variaciones en las distintas etapas de vida del ser humano, se generan particularidades individuales y temporales en este ecosistema que dificultan establecer un parámetro de normalidad, pero en general cuanto mayor sea su diversidad y equilibrio entre las especies predominantes, mayor será el estado de salud del ser humano ⁽³⁸⁾.

Arumugam y colaboradores en 2011, enunciaron recientemente el concepto de los enterotipos, y perfiles fenotípicos con la idea de clasificar la microbiota del intestino humano, con base en la composición de sus comunidades bacterianas y de acuerdo con la abundancia de los diversos géneros bacterianos ⁽³⁴⁾.

1.4.4. Microbiota vaginal

La superficie vaginal presenta un epitelio plano multiestratificado carente de glándulas, cuyo grosor varía en función de la secreción estrogénica de la mujer; por ejemplo, durante la edad fértil se ha observado el desarrollo de hasta 40 capas de células, y un grosor mucho más fino cuando la mujer se encuentra fuera de ese periodo ⁽³⁹⁾.

A pesar de no poseer glándulas, la superficie vaginal está recubierta por una secreción (moco vaginal), que es producto de la exudación del propio epitelio y del cuello del útero; este líquido es muy rico en nutrientes como la glucosa y otros aminoácidos que facilitan la colonización de la cavidad por comunidades bacterianas que constituyen la microbiota autóctona ^(40, 41, 42).

De este modo, una microbiota autóctona o residente, está caracterizada por aquellos microorganismos que colonizan la vagina durante un tiempo prolongado y pueden participar en las funciones fisiológicas del órgano, y una microbiota transitoria, presenta fluctuaciones continuas en su población relacionada con la propia fisiología ⁽⁴³⁾.

Expuesto lo anterior, se define como microbiota vaginal al conjunto de microorganismos que viven de manera natural y sin causar daño en la región vaginal. En las mujeres representa la concentración de bacterias más alta del cuerpo humano, con excepción del colon ⁽⁴⁰⁾.

La microbiota vaginal evoluciona y cambia de acuerdo con la edad y actividad endocrina de la mujer. Los estudios más representativos, se refieren clásicamente a los de la microbiota en edad reproductiva; en la **Tabla 4**, se presenta la prevalencia de los microorganismos detectados con regularidad en la zona vaginal de mujeres sanas ^(40, 44).

Tabla 4. Caracterización y prevalencia de microorganismos que constituyen la microbiota normal en mujeres en edad reproductiva.

Grupo	Microorganismo	Prevalencia
Aerobios facultativos		
Bacilos Grampositivos	<i>Lactobacillus</i> spp.	45-88%
	<i>Corynebacterium</i> spp.	14-72%
	<i>Gardnerella vaginalis</i>	2-58%
Cocos Grampositivos	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	34-92%
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1-32%
	<i>Staphylococcus</i> grupo B	6-22%
	<i>Enterococcus</i> spp.	32-36%
	<i>Streptococcus</i> no hemolítico	14-33%
	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	17-36%
Bacilos Gramnegativos	<i>Escherichia coli</i>	20-28%
	Otras: <i>Proteus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i>	2-10%
	Mollicutes	<i>Mycoplasma hominis</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i>
Levaduras		15-30%
Anaerobios		
Bacilos Grampositivos	<i>Lactobacillus</i> spp.	10-43%
	<i>Eubacterium</i> spp.	0-7%
	<i>Bifidobacterium</i> spp.	8-10%
	<i>Propionibacterium</i> spp.	2-5%
	<i>Clostridium</i> spp.	4-17%
Cocos Grampositivos	<i>Peptococcus</i>	76%
	<i>Peptostreptococcus</i>	56%
Bacilos Gramnegativos	<i>Prevotella bivia</i>	14%
	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	18%
	<i>Bacteroides</i> grupo <i>fragilis</i>	0-13%
	<i>Fusobacterium</i> spp.	7-19%
	Cocos Gramnegativos	

Modificado de Martínez-Peña, 2012 y Martín *et al.*, 2016.

Los primeros datos sobre la microbiota vaginal datan de finales del siglo XIX cuando el científico alemán Albert Döderlein describió en el exudado vaginal, la presencia de bacilos Gram positivos, largos y finos, que podrían inhibir el crecimiento de patógenos debido a la producción de ácido láctico; a partir de entonces, se ha avanzado de manera notable en el conocimiento de la microbiota vaginal, formada por especies que cohabitan en un delicado equilibrio en la mujer sana ⁽⁴⁵⁾.

Estudios recientes han descrito que la cavidad vaginal está colonizada por más de 280 especies bacterianas, en su mayoría por especies de *Lactobacillus* y escasamente también por bacterias aeróbicas potencialmente patógenas tales como *Staphylococcus aureus*, *Streptococci* grupo B y *Escherichia coli*, así como micoplasmas ⁽⁴⁶⁾.

De esta manera, una pieza clave en la salud vaginal y el mantenimiento de una microbiota normal, son los lactobacilos; estos utilizan la glucosa, generada por la degradación del glucógeno del exudado, para obtener energía y dejan un desecho de ácido láctico y de agua oxigenada (H₂O₂), bacteriocininas (radicales hidroxilados tóxicos) y probióticos ^(44,46). La acumulación de estos compuestos provoca un ambiente ácido el cual hace que la mucosa vaginal sea inhóspita para los microorganismos intestinales y muchas otras bacterias que pudieran resultar patógenos potenciales^(46,47).

Ravel y colaboradores en 2011, determinan que la microbiota vaginal de mujeres adultas sanas, se podía dividir en cinco grandes comunidades microbianas (vaginotipos I, II, III IV y V) a partir de muestras de cuatro grupos étnicos (caucásico, negro, hispano, asiático). Las comunidades microbianas pertenecientes al grupo I, II, III y V estaban dominadas por *Lactobacillus* como *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii*, respectivamente, mientras que el grupo IV se caracterizó por las bacterias estrictamente anaerobias, incluyendo *Prevotella*, *Dialister*, *Atopobium*, *Gardnerella*, *Megasphaera* y *Peptoniphilus* ⁽⁴³⁾.

En México son muy pocos los trabajos que abordan de forma integral el estudio de la conformación de la microbiota vaginal. Pérez-Miravete y colaboradores desde el año 1963, han realizado una serie de trabajos sobre microbiota vaginal en población mexicana, en donde reportan que *Lactobacillus acidophilus* es la especie predominante en condiciones normales de salud. Además de ésta, describen otras especies de lactobacilos, como *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. fermenti*, *L. brevis* y *L. casei* ⁽⁴⁸⁾.

Ángeles-López en 2001, centró su investigación en la población mexicana al analizar la conformación de la microbiota lactobacilar en cavidad vaginal. Indicó que las especies de lactobacilos *L. acidophilus* y *L. crispatus* fueron las de mayor prevalencia ⁽⁴⁹⁾.

Hernández Rodríguez y colaboradores en el año 2011, describen a las principales especies de lactobacilos en una población de mujeres embarazadas, mientras que, Martínez-Peña y colaboradores en el año 2012, señalan que la microbiota transitoria de la cavidad vaginal de mujeres entre 18 y 65 años de edad se encuentra dominada por lactobacilos, aunque en ocasiones sólo puede estar colonizada por microorganismos anaerobios, incluyendo a los géneros *Peptostreptococcus* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Bacteroides* spp. y micoplasmas genitales. Los microorganismos dominantes de la cavidad vaginal, en la etapa reproductiva de una mujer (menarca), son los lactobacilos que se encuentran en concentraciones que van de 10^7 a 10^8 UFC/ml en el fluido vaginal ⁽⁴⁰⁾.

En ambos estudios anteriormente mencionados, se destaca la prevalencia de *Lactobacillus acidophilus*, *L. amylolyticus*, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. gallinarium*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. jensenii* y *L. johnsonii* ^(46, 49).

1.5. MICROBIOTA VAGINAL EN DISTINTAS ETAPAS DE VIDA DE LA MUJER.

Las variaciones en la composición de la microbiota vaginal de acuerdo con la edad, dependen principalmente de los niveles de estrógeno que se producen en el en el epitelio vaginal, factor importante para una colonización normal. Dicho de otro modo, la actividad endócrina provoca una sucesión de las microbiotas predominantes, que se irán adaptando a las condiciones concretas de cada periodo durante la vida de la mujer ⁽⁵⁰⁾.

1.5.1. Pubertad.

La etapa de la pubertad está determinada principalmente por el inicio en la producción de estrógenos y la entrada en el ciclo menstrual. Como consecuencia, el espesor del epitelio vaginal se ve aumentado y se segrega un exudado que humedece la cavidad y vehicula glucógeno, así como otros muchos nutrientes a su superficie. Estos cambios, hacen que la vagina sea potencialmente colonizable por microorganismos que anteriormente no podían proliferar en dicha zona, especialmente los lactobacilos, pero también puede ser colonizable por patógenos oportunistas si estos proliferan en exceso, tales como *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* y otros ⁽⁵¹⁾.

A pesar de todo lo anterior, existe una clara adaptación entre los lactobacilos y las condiciones imperantes en la cavidad vaginal, que hace que estos cambios sean, en general, asumibles y que se vuelva rápidamente a las condiciones de homeostasis responsables de la salud genital ⁽⁵²⁾.

1.5.2. Ciclo menstrual.

Un análisis de la microbiota vaginal en el curso del ciclo menstrual ha mostrado que el 22% de las mujeres mantienen una microbiota bacteriana estable en la que predominan los lactobacilos, mientras que el 78% restante sufren una alteración de la microbiota. La receptividad de las células epiteliales a la adherencia de los lactobacilos aumenta en el pico de estrógenos a mitad del ciclo, aunque no es claro qué factores causan tal alteración ⁽⁵³⁾.

1.5.3. Embarazo.

Para la etapa de embarazo, se produce un aumento de la vascularización en el epitelio vaginal, una mayor distensibilidad y un aumento del flujo vaginal, provocado especialmente por el aumento de las hormonas, cambios muy similares al que muchas mujeres tienen en el periodo premenstrual. Estos cambios favorecen un incremento en la concentración de lactobacilos y de la acidez que producen (el pH vaginal se torna más ácido), sobre todo durante el tercer trimestre del embarazo⁽⁵⁴⁾.

A esto habría que añadir que la ausencia de flujo menstrual evita la elevación periódica del pH y el barrido de la microbiota residente, lo cual genera, por un lado la protección de la mucosa vaginal frente al desarrollo de microorganismos indeseables y, por otro, eliminar posibles agentes nocivos que pudieran inducir patología en la madre (fiebres puerperales) o en el recién nacido (por ejemplo, meningitis por *Streptococcusagalactiae*), derivadas de la infección en el momento del parto ^(51, 52).

1.5.4. Postmenopausia.

En la etapa postmenopáusica, la interrupción del ciclo estrogénico se acompaña de una gran disminución en el volumen del exudado que baña la superficie vaginal y consiguientemente, de los nutrientes aprovechables por la microbiota presente. En consecuencia, la densidad de microorganismos residentes disminuye (lactobacilos vaginales) y se produce un cambio por bacterias intestinales y de la piel, como ocurría durante la infancia. Esto anterior conlleva a la

disminución de las infecciones causadas por los patógenos vaginales típicos y se tornan más susceptibles a la colonización por bacterias entéricas ^(55, 56).

1.6. ALTERACIONES EN LA MICROBIOTA VAGINAL: MICROBIOTA ANORMAL.

Independientemente de la edad y actividad endócrina de la mujer, existen otros factores que pueden alterar el equilibrio dinámico de la microbiota vaginal dando como resultado el desarrollo de una microbiota anormal que puede conducir al desarrollo de infecciones y sus complicaciones ⁽⁵⁷⁾.

Los cuadros derivados por una microbiota anormal, causan generalmente la disminución o desaparición de los lactobacilos vaginales, que resulta en la inducción de complicaciones importantes en la salud ^(58, 59).

Esto anterior se ha asociado con infecciones posquirúrgicas y como factor predisponente para la adquisición de diversas enfermedades causadas por agentes patógenos oportunistas, por ejemplo, el VPH, que podría actuar de manera importante para el desarrollo del cáncer cervicouterino ^(60, 61).

Derivado a esto, 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 a enfermedades del tracto genital femenino o infecciones sobre agregadas ^(16, 59).

1.7. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA Y PERFIL FENOTÍPICO.

En la actualidad, la citología cervical es el método preventivo más empleado para la detección de alteraciones celulares, empleando a su vez el uso de técnicas complementarias que permitan la evaluación de factores influyentes en el desarrollo, prevalencia o intervención oportuna para enfermedades tales como el cáncer cervicouterino ⁽⁶²⁾.

En microbiología clínica, es importante una correcta identificación bacteriana, cuyo objetivo principal radica en la asignación de especie a un aislamiento, y de este modo, conocer las

implicaciones patogénicas o patológicas que pudiera generar en el huésped, así como la aplicación de un tratamiento eficaz ⁽⁶³⁾.

En el proceso de identificación bacteriana tradicional se establecen tres niveles de procesamiento:

1) Primer nivel o pruebas primarias: son rápidas y sencillas de realizar. Barrow y colaboradores en 2004 indican que, según el manual médico de identificación bacteriana de Cowan y Steel (1979), estas pruebas determinan el género, grupo de géneros o en algún caso familia a la que pertenece un aislamiento. Estas pruebas incluyen morfologías micro y macroscópicas, tinciones de Gram, pruebas de catalasa, oxidasa, óxido fermentación, esporas, crecimiento en aerobiosis, anaerobiosis y movilidad ^(64, 65).

2) Segundo nivel o pruebas secundarias: se apoya en las características del cultivo y en pruebas primarias; también deben tenerse en cuenta los datos clínicos. Esto dependerá, en gran medida, de un patrón estable de características fenotípicas ⁽⁶⁵⁾.

3) Tercer nivel o pruebas terciarias: permiten identificar con un alto grado de precisión la mayoría de las bacterias clínicamente significativas; en general se refiere a la combinación de los primeros dos niveles fenotípicos y el apoyo de técnicas genéticas que puedan auxiliar a la determinación de especie bacteriana ^(64, 66).

De manera general entonces, la identificación bacteriana se apoya de técnicas moleculares y fenotípicas; las primeras se relacionan con aquellas características que determinan el genotipo de la bacteria, haciendo uso principalmente del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal. Las técnicas fenotípicas intentan recrear las condiciones de vida natural de la bacteria para que esta pueda crecer *in vitro* y así poder estudiar su fenotipo ⁽⁶⁷⁾.

La identificación fenotípica bacteriana según lo establece el manual de Bergey, se basa en la determinación de las características observables de las bacterias, tales como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas ⁽⁶³⁾.

Se basa fundamentalmente en la comparación de las características fenotípicas de bacterias desconocidas con aquellas de cultivos tipo. La fiabilidad de la identificación está en proporción directa al número de características similares ⁽⁶⁶⁾.

A pesar de que las técnicas moleculares en la identificación bacteriana actualmente tienen mayor auge, muchos laboratorios clínicos no cuentan con la tecnología e infraestructura necesaria para aplicarlas ⁽⁶⁸⁾. De ahí la importancia por conocer la correcta aplicación y realización de sistemas de identificación alterna, ya sea empleando métodos de identificación tradicional o sistemas de identificación rápida como los son las pruebas API ⁽⁶⁹⁾.

La identificación por medio de sistemas miniaturizados API, es un método convencional que se basa en el estudio de características fenotípicas de un aislamiento bacteriano ⁽⁵²⁾; consiste en la aplicación simultánea de diversas pruebas bioquímicas, generalmente 20 ó 50, mediante el uso de galerías constituidas por microtubos aislados que contienen diferentes sustratos liofilizados. Dichas pruebas bioquímicas reaccionan positiva o negativamente de acuerdo con el inóculo bacteriano empleado, esto genera un sistema de códigos que se introducen al software específico e identifica la bacteria mediante un banco de datos ⁽⁷⁰⁾.

Cada galería precisa de tener especial cuidado en el uso de las concentraciones precisas del inóculo bacteriano a identificar, el modo de inoculación, de incubación, uso de reactivos y de lectura, que si llegan a descuidarse pueden dar lugar a importantes errores ⁽⁶⁵⁾.

Una de las primeras identificaciones fenotípicas, fueron realizadas por Rogosa y Sharpe en 1960, la cual se basó en los trabajos de Örla-Jensen de 1921. Realizó una clasificación del género *Lactobacillus* que se fundamentó en la ruta metabólica que emplean los lactobacilos y los productos de este proceso, así como cualidades de crecimiento y capacidad de fermentación ⁽⁴⁰⁾.

Nigatu, en el año 2000, reportó el uso de API 50CH para poder identificar y diferenciar las especies de lactobacilos los cuales presentan características metabólicas muy semejantes, como lo es el grupo *Lactobacillus acidophilus* al cual pertenecen 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 amylolyticus* y *Lactobacillus iners* ⁽⁷¹⁾.

Ángeles-López, en 2001, señaló que, mediante métodos de aislamiento, identificación bioquímica convencional y aplicación de API 50 CHL, las especies de lactobacilos de mayor prevalencia, en la población mexicana, fueron *L. acidophilus* y *L. crispatus*, aunque también logró determinar especies de *L. brevis*, *L. fermentii* y *L. jensenii* ⁽⁴⁹⁾.

Por lo tanto, el uso y aplicación correcta de la caracterización fenotípica determinará el éxito en el conocimiento de la microbiota de un organismo ^(50, 71).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El cáncer cervicouterino (CaCu) es la neoplasia más frecuente entre la población femenina, especialmente en el grupo de 25 a 64 años de edad, reflejándose por lo tanto como un grave problema de salud pública al ocupar el cuarto lugar entre los cánceres más mortales a nivel mundial y el segundo lugar en la población femenina mexicana.

El CaCu es multicausal y obedece a la asociación de diferentes cofactores de riesgo; por esto, actualmente se está teniendo énfasis por considerar aquellos que puedan en cierta medida cambiar el desarrollo, presencia o comportamiento de esta enfermedad. Destacan entre estos factores, la búsqueda de una relación del CaCu con factores biológicos como lo son los microorganismos, y es así como la microbiología clínica se ha involucrado en conocer el rol de la microbiota en las distintas implicaciones patogénicas o patológicas, así como la aplicación de un tratamiento eficaz.

A pesar de que en la identificación bacteriana actualmente las técnicas moleculares tienen mayor auge, muchos laboratorios clínicos no cuentan con la tecnología e infraestructura necesaria para aplicarlas. Por ello destaca la importancia en conocer la correcta aplicación y realización de sistemas de identificación alterna por métodos tradicionales o rápidos, que se basan principalmente en la obtención de perfiles fenotípicos.

Considerando lo anterior, se señala la escasa evidencia acerca de la microbiota vaginal cuando existe la patología de cáncer cervicouterino y más aún, del conocimiento de su perfil fenotípico y su comparación cuando no existe esta enfermedad; por lo que al respecto resulta particularmente importante aportar los primeros conocimientos acerca de la temática, así como destacar una identificación bacteriana rápida, sencilla y útil para llevarse a cabo en cualquier laboratorio clínico. Lo anterior coadyuvando a detectar la predominancia de bacterias cuando se desarrolla este tipo de cáncer, así como también aquellas bacterias que favorecen la salud vaginal y que permitan detectar futuramente el establecimiento de patógenos potenciales.

2.1. Pregunta de Investigación.

¿Existen diferencias en el perfil fenotípico de la microbiota vaginal de mujeres con y sin cáncer cervicouterino?

3. HIPÓTESIS

3.1. Hipótesis de trabajo.

Existen diferencias en el perfil fenotípico de la microbiota vaginal de mujeres con cáncer cervicouterino respecto a la microbiota vaginal de mujeres sin cáncer cervicouterino.

3.2. Hipótesis nula.

No existen diferencias en el perfil fenotípico de la microbiota vaginal de mujeres con cáncer cervicouterino respecto a la microbiota vaginal de mujeres sin cáncer cervicouterino.

4. OBJETIVOS.

4.1. Objetivo general.

Comparar el perfil fenotípico de la microbiota vaginal de mujeres con y sin cáncer cervicouterino mediante el uso de sistemas miniaturizados de galerías API.

4.2. Objetivos específicos.

- Recolectar muestras de exudado vaginal de mujeres que fueron diagnosticadas con cáncer cervicouterino localmente avanzado y muestras de exudado vaginal de mujeres diagnosticadas sin cáncer cervicouterino
- Aislar cepas bacterianas a partir de las muestras de exudados cervicovaginales.
- Determinar el perfil fenotípico a las cepas bacterianas obtenidas para su comparación mediante pruebas morfológicas, bioquímicas, nutricionales y enzimáticas, de los sistemas miniaturizados de las galerías API.
- Identificar especies bacterianas predominantes en las mujeres con cáncer cervicouterino y mujeres sin cáncer cervicouterino.
- Comparar especies bacterianas en las mujeres con cáncer cervicouterino y mujeres sin cáncer cervicouterino.

5. JUSTIFICACIÓN.

La identificación bacteriana es importante para la asignación de especie a un aislamiento, y de este modo, conocer la relación microorganismo-humano y el abordaje de las implicaciones patogénicas o patológicas que pudieran generarse.

La microbiota vaginal normal contribuye en forma significativa a mantener el estado fisiológico del tracto genital femenino y entre otros aspectos, a controlar la colonización de este tracto por microorganismos y patógenos externos.

En el presente proyecto de investigación, el desarrollo de un perfil fenotípico con respecto a la microbiota vaginal de mujeres con diagnóstico de cáncer cervicouterino y su comparación respecto a mujeres sin dicha enfermedad, permitirá generar los primeros conocimientos acerca de la temática, coadyuvando a detectar la predominancia de bacterias cuando se desarrolla este tipo de cáncer, así como también aquellas bacterias que favorecen la salud vaginal y que permitan detectar futuramente el establecimiento de patógenos potenciales. Lo anterior también involucra un marco de referencia para estudios actuales y futuros, en el manejo clínico sobre infecciones bacterianas sobreagregadas y su correcta intervención farmacológica cuando se cuente con el diagnóstico de cáncer cervicouterino.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Tipo de estudio.

Comparativo, transversal.

6.2. Población y Universo.

Grupo de estudio: Mujeres diagnosticadas con cáncer cervicouterino localmente avanzado, adscritas al Instituto Nacional de Cancerología, Ciudad de México (INCan).

Grupo control: Mujeres sin cáncer cervicouterino, acompañantes (relación familiar o de amistad) de las pacientes que conforman el grupo expuesto.

6.3. Muestreo.

No probabilístico, por conveniencia.

6.4. Tamaño de muestra

Grupo de estudio: n= 40

Grupo control: n= 40

6.5. Criterios para mujeres.

6.5.1. Criterios de inclusión:

Grupo de estudio.

- Mujeres recién diagnosticadas con cáncer cervicouterino localmente avanzado (que se encontraran en los estadios 1B-2 a IV-A), confirmado histológicamente, adscritas al Instituto Nacional de Cancerología, Ciudad de México (INCan)
- Mujeres entre 20 y 65 años de edad.
- Mujeres que aceptaron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado.

Grupo control:

- Mujeres sin cáncer cervicouterino (con citología cervical negativa) confirmado en el Instituto Nacional de Cancerología.
- Mujeres que fueron acompañantes (relación familiar o de amistad) de las pacientes que conforman el grupo de estudio.
- Mujeres entre 20 y 65 años de edad.
- Mujeres que aceptaron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado.

6.5.2. Criterios de exclusión:

- Mujeres embarazadas.
- Mujeres que utilizaron antimicrobianos y antifúngicos sistémicos o locales en los últimos 30 días.
- Mujeres que tuvieron relaciones sexuales 48 horas antes de la toma de muestra.

- Mujeres que utilizaron duchas vaginales.
- Mujeres con flujo vaginal anormal durante las últimas 48 horas.
- Mujeres que estuvieron menstruando durante la toma de la muestra.

6.5.3. Criterios de eliminación:

- Mujeres que decidieron no continuar con el estudio.

6.6. Criterios para bacterias y colonias bacterianas.

6.6.1. Criterios de inclusión:

- Bacterias con crecimiento aeróbico.
- Colonias con crecimiento a las 48 horas después de su inoculación.
- Colonias purificadas.

6.6.2. Criterios de exclusión:

- Bacterias con crecimiento anaeróbico.

6.6.3. Criterios de eliminación:

- Bacterias sin crecimiento a las 48hrs después de su inoculación.
- Colonias contaminadas.

6.7. Procedimientos.

6.7.1. Fase de reclutamiento.

El estudio inició con la conformación de ambos grupos (grupo de estudio y grupo control) de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión previamente establecidos. Cumpliendo los criterios bioéticos, a cada integrante del estudio se le explicó de manera detallada el tipo de investigación que se iba a realizar, la forma en que se llevaría a cabo y la importancia de su participación.

Las participantes de ambos grupos de estudio firmaron el consentimiento informado y posteriormente se les aplicó un cuestionario para evaluación de variables gineco-obstétricas de importancia.

6.6.2. Obtención de muestras.

Fueron tomadas con hisopos dos muestras de exudado cervicovaginal; de acuerdo con el protocolo establecido por el Instituto Nacional de Cancerología. Éstas se colocaron en tubos cónicos con solución salina isotónica estéril al 0.85%, etiquetados para su identificación y transportados al Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental de la Facultad de Medicina de la UAEMéx en un contenedor hermético en cadena de frío para su procesamiento.

6.6.3. Procesamiento de muestras y aislamiento de cepas.

Las muestras se procesaron de manera estéril en campana de flujo laminar de la siguiente manera: sobre una caja de Petri y con un bisturí del No. 4, fueron separadas las fibras de algodón de cada hisopo contenedor de muestra cervicovaginal y se desechó el soporte de plástico. De manera individual, cada algodoncillo fue colocado en un tubo Eppendorf con 1000µl de la solución salina isotónica estéril al 85%, que tenía el tubo cónico donde en un principio fueron transportadas las muestras. Enseguida se sometieron a centrifugación a 14000rpm durante 15 minutos.

Transcurrido el tiempo, se descartaron 500µl del sobrenadante y los restantes 500µl se dividieron de la siguiente forma: 200µl fueron inoculados en placas con agar sangre marca BD BBL® (Cat:220150) y 200µl fueron inoculados en placas de agar infusión cerebro corazón (BHI, por sus siglas en inglés) marca BD Bioxon® (Cat: 214700). Los 100µl restantes con el algodoncillo fueron procesados para crioconservación a modo de muestra respaldo.

Las placas inoculadas se incubaron a 37°C durante 48 horas en condiciones de aerobiosis. Finalmente, se seleccionaron las colonias representativas para ser purificadas en agar BHI bajo las mismas condiciones.

6.6.4. Caracterización morfológica.

6.6.4.1. Morfología macroscópica.

De las colonias purificadas se caracterizó lo siguiente:

- Forma: puntiforme, circular, irregular, filamentosa
- Borde: definido, irregular (lóbulos, filamentosos, aserrados, estriados, enrollados).
- Elevación: plana o elevada (convexa, umbonada, pulvinada, crateriforme).
- Superficie: lisa, rugosa, granular.
- Consistencia: suave, seca, mucoide, cremosa
- Aspecto: húmedo, seco, mucoide
- Color: variado de acuerdo con colonias; por ejemplo, blanco, transparente, amarillo, etc.
- Patrón de hemólisis: alfa (hemólisis incompleta con pigmentación verde), beta (hemólisis completa con pigmentación transparente) o gamma (hemólisis ausente, sin pigmentación)
- Contabilización de unidades formadoras de colonias: contables <400 UFC/ml; incontables >400 UFC/ml.
- Otras observaciones.

6.6.4.2. Morfología microscópica

Se realizó un frotis de cada colonia aislada, el cual fue teñido por la técnica de Gram. Las observaciones fueron realizadas a través de un microscopio óptico Leica® Binocular CME (ML23).

6.6.4.3. Caracterización enzimática para elección de Galería API

De acuerdo con la morfología microscópica que presentaron las colonias, se aplicaron pruebas de catalasa y oxidasa ⁽⁷⁰⁾ y se verificó la respuesta a la prueba de coagulasa. Los resultados obtenidos condujeron a seleccionar acertadamente la galería API que se aplicaría en cada caso como a continuación se presenta en las **Figuras 1, 2 y 3**:

Figura 1. Elección de galerías API para cocos Gram positivos, de acuerdo con reacciones de pruebas enzimáticas para catalasa.

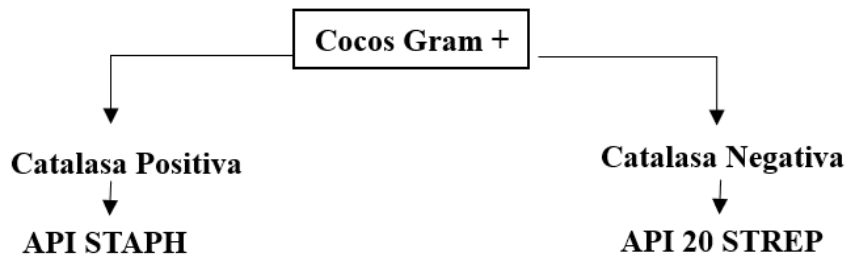


Figura 2. Elección de galerías API para bacilos Gram positivos, de acuerdo con reacciones de pruebas enzimáticas para catalasa.

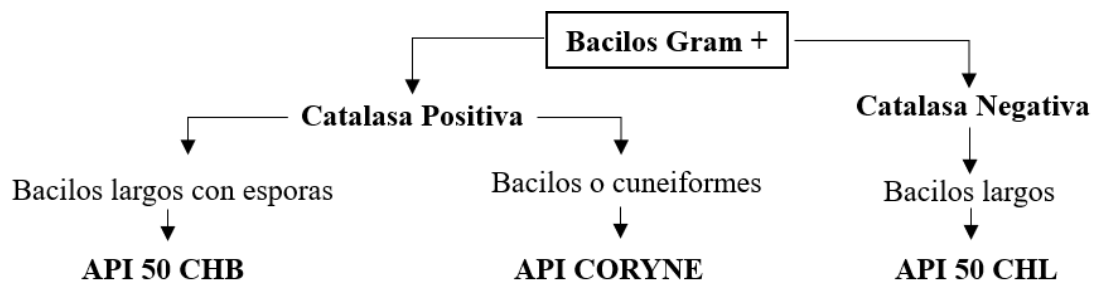
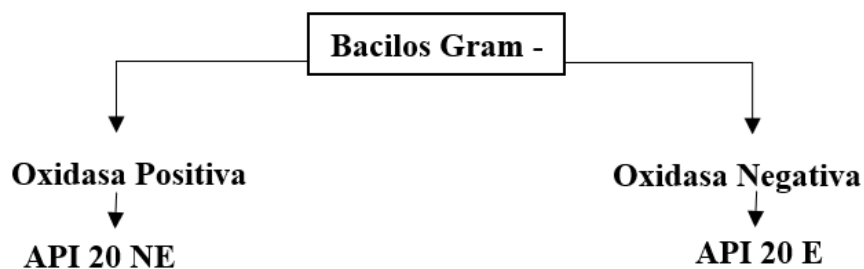


Figura 3. Elección de galerías API para bacilos Gram negativos, de acuerdo con reacciones de pruebas enzimáticas para oxidasa.



6.6.5. Obtención de Biomasa

Se procedió a inocular cada una de las colonias en medio líquido de BHI y se incubaron a 37°C durante 48 horas en condiciones de aerobiosis.

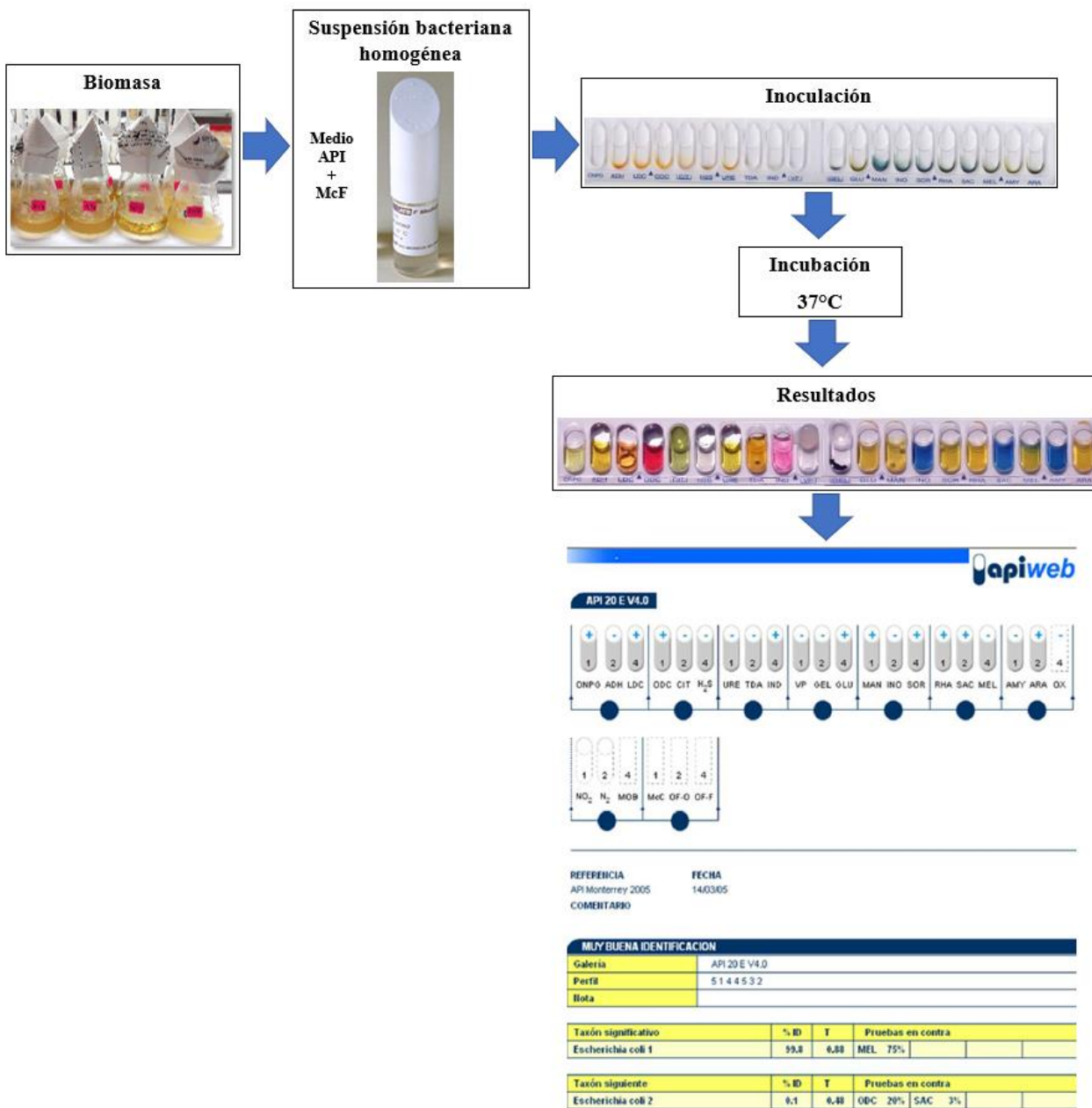
6.6.6. Pruebas bioquímicas para perfil fenotípico.

La biomasa de cada colonia fue empleada para preparar las ampollas del medio API necesario, realizando una suspensión bacteriana homogénea ajustada los estándares de turbidez del nefelómetro de McFarland ⁽⁷⁰⁾, según la galería correspondiente. La preparación de la galería, su inoculación y adición de reactivos correspondientes fueron realizados según las instrucciones del proveedor API bioMérieux®.

Las reacciones bioquímicas se tradujeron en cambios de color, y su interpretación se llevó a cabo utilizando una tabla de lectura incluida en el kit de las galerías, indicando reacciones positivas y negativas de las bacterias que fueron capaces o no de utilizar el correspondiente sustrato liofilizado. La identificación se realizó a partir de un perfil numérico obtenido por la lectura de los ensayos bioquímicos.

Haciendo uso de la base de datos del sistema de identificación de bioMérieux® (disponible en la página <https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Identify>) se seleccionó la galería a interpretar y se ingresó el perfil numérico obtenido, realizando automáticamente una identificación, la cuál proporcionó con un alto índice de fiabilidad la identificación del microorganismo a nivel especie. El procedimiento anterior se ejemplifica mejor en el **Diagrama 1**:

Diagrama 1: Procedimiento para la realización de las pruebas bioquímicas y perfil fenotípico mediante la aplicación de galerías API.



6.8. Variables de estudio.

Tabla 5. Operacionalización de variables.

Variable	Clasificación de variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición
Perfil fenotípico	Dependiente	Cualquier característica o rasgo observable de un organismo, como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas, fisiología y comportamiento.	Conjunto de pruebas morfológicas, bioquímicas, nutricionales y sensibilidad a antibióticos.	Cualitativa	Nominal
Microbiota vaginal	Dependiente	Conjunto de organismos que viven de manera natural y sin causar daño en la región vaginal.	Bacterias presentes en la región cervical de mujeres con cáncer cervicouterino y sin cáncer cervicouterino.	Cualitativa	Nominal
Cáncer cervicouterino	Independiente	Neoplasias malignas que se desarrollan en la porción fibromuscular inferior del útero que se proyecta dentro de la vagina.	Prueba de citología vaginal que caracterizará mujeres con cáncer cervicouterino localmente avanzado y mujeres sin cáncer cervicouterino	Cualitativa	Nominal

6.9. Implicaciones Bioéticas.

El presente estudio procedió con base en las pautas éticas para la práctica de investigación médica en seres humanos de la Declaración de Helsinki, 2013. La Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos, Ginebra, 2000. El Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, México, 1986; así como la Normatividad que estipula el Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Cancerología, Ciudad de México (INCan).

7. RESULTADOS.

7.1. Título del artículo enviado:

“COMPARACIÓN DEL PERFIL FENOTÍPICO DE LA MICROBIOTA VAGINAL DE MUJERES CON Y SIN CÁNCER CÉRVICOUTERINO”

“PHENOTYPIC PROFILE COMPARISION OF THE VAGINAL MICROBIOTA OF WOMEN WITH AND WITHOUT CERVICAL CANCER”

7.1.1. Página frontal del manuscrito.

COMPARACIÓN DEL PERFIL FENOTÍPICO DE LA MICROBIOTA VAGINAL DE MUJERES CON Y SIN CÁNCER CÉRVICOUTERINO

PHENOTYPIC PROFILE COMPARISION OF THE VAGINAL MICROBIOTA OF WOMEN WITH AND WITHOUT CERVICAL CANCER

Hilda Angeline Quintos-Meneses^a, Gaudy Lizeth Manzanares-Leal^a, Ángel Horacio Sandoval-Trujillo^b, Martín Pablo A. Moreno-Pérez^a, Jaime Alberto Coronel Martínez^c, Ninfa Ramírez-Durán^{a,*}.

^aLaboratorio de Microbiología Médica y Ambiental. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Tollocan/Jesús Carranza s/n. CP 50180. Toluca, Estado de México, México.

^bDepartamento de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calz. del Hueso 1100. CP 04960. Del. Coyoacán, Ciudad de México, México.

^cDivisión de Investigación Clínica. Instituto Nacional de Cancerología. Secretaría de Salud. Av. San Fernando 22. Col. Sección 16. CP 14080. Ciudad de México, México.

*Autor de Correspondencia. ninfard@hotmail.com (N. Ramírez-Durán)

Declaración de conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Agradecimientos:

i. Al Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) por su colaboración en este estudio. ii. El presente trabajo es derivado del proyecto 4350/2017/C1 de la Universidad Autónoma del Estado de México. iii. Este trabajo se deriva de una tesis de Maestría del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud, reconocido por el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (PNPC-CONACYT).

7.1.2. Carta de envío del manuscrito.

- RV: Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: Confirmación de envío

De: eesserver@eesmail.elsevier.com <eesserver@eesmail.elsevier.com> en nombre de EIMC
<eesserver@eesmail.elsevier.com>

Enviado: jueves, 26 de abril de 2018 05:15 p. m.

Para: ninfard@hotmail.com

Asunto: Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: Confirmación de envío

Estimado/a Dr. Ramírez-Durán

Le confirmamos que su artículo titulado: "COMPARACIÓN DEL PERFIL FENOTÍPICO DE LA MICROBIOTA VAGINAL DE MUJERES CON Y SIN CÁNCER CÉRVICOUTERINO PHENOTYPIC PROFILE COMPARISON OF THE VAGINAL MICROBIOTA OF WOMEN WITH AND WITHOUT CERVICAL CANCER" ha llegado a la secretaría de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

En breve recibirá un mensaje con el número de referencia asignado y que le confirmará que el artículo ha iniciado el proceso de revisión. En caso de que sea necesario que haga algún cambio previo, también se le notificará por correo electrónico.

Tal y como especifican en las normas de publicación de la revista, le recordamos que su manuscrito no puede ser publicado en ninguna otra revista mientras dure el proceso de revisión.

No dude en contactar con la redacción para cualquier información adicional.

Reciba un cordial saludo,

Secretaría Editorial
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

EIMC <eesserver@eesmail.elsevier.com>
para mí

26 abr. ☆  

Estimado/a Dr. Hilda Quintos-Meneses:

Le enviamos este correo porque se encuentra listado como co-autor del siguiente manuscrito:

Revista: Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Título: COMPARACIÓN DEL PERFIL FENOTÍPICO DE LA MICROBIOTA VAGINAL DE MUJERES CON Y SIN CÁNCER CÉRVICOUTERINO PHENOTYPIC PROFILE COMPARISON OF THE VAGINAL MICROBIOTA OF WOMEN WITH AND WITHOUT CERVICAL CANCER

Autor de correspondencia: Ninfa Ramírez-Durán

Co-autores: Hilda A Quintos-Meneses; Gaudy L Manzanares-Leal; Ángel H Sandoval-Trujillo; Martín Pablo A Moreno-Pérez; Jaime A Coronel Martínez;

Nos es grato invitarle a que enlace su ORCID a este manuscrito. Si el manuscrito fuera aceptado, su ORCID sería transferido a ScienceDirect y a CrossRef, y se actualizaría en su cuenta ORCID.

Para acceder a una página de EES haga clic en el siguiente enlace, <https://ees.elsevier.com/eimc/l.asp?i=130806&l=KDB8U74P> donde podrá enlazar un ORCID existente, o donde se podrá registrar.

Por favor, tenga en cuenta que si no ha sido co-autor de este manuscrito, debería contactar al autor de correspondencia en el siguiente correo electrónico ninfard@hotmail.com, y no hacer clic en el enlace indicado arriba.

¿Qué es ORCID?

ORCID es un proyecto abierto, sin ánimo de lucro, comunitario, que ofrece un sistema para la identificación inequívoca de investigadores y un método claro para vincular las actividades de investigación y los productos de estos identificadores.

Si desea más información sobre ORCID visite su página Web: <http://www.ORCID.org>, o bien visite nuestra página de ayuda de ORCID: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Atentamente,

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

7.1.3. RESUMEN.

Introducción: El cáncer cervicouterino (CaCu) es una de las enfermedades neoplásicas con mayor mortalidad entre la población femenina de 25 a 64 años de edad; por lo que es importante la relación de esta patología con otros factores biológicos como los microorganismos. La microbiota vaginal autóctona actúa como primera línea de defensa contra infecciones vaginales; cualquier alteración favorece la proliferación de patógenos oportunistas que producen síntomas y enfermedades. El objetivo de este estudio consistió en el uso de sistemas miniaturizados de galerías API para determinar y comparar el perfil fenotípico de la microbiota vaginal de mujeres con y sin cáncer cervicouterino. **Método:** Se realizó un estudio comparativo, transversal, no probabilístico, con 40 muestras cervicovaginales de mujeres recién diagnosticadas con CaCu localmente avanzado y 40 muestras cervicovaginales de mujeres sin CaCu. El perfil fenotípico e identificación bacteriana se realizó mediante el uso de sistemas miniaturizados de galerías API bioMérieux®. **Resultados:** Se logró caracterizar una diversidad en la microbiota cervicovaginal. Fueron 5 las especies bacterianas coincidentes para ambos grupos de estudio: *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia fergusonii* y *Corynebacterium amycolatum*. Cuando existió CaCu, predominaron corinebacterias y estafilococos, mientras que, en las mujeres sin dicha patología, se lograron identificar variedades de estafilococos, estreptococos, enterococos, aerococos, enteobacterias, paenibacilos, brevibacterias e incluso corinebacterias. **Conclusión:** Se determinó el perfil fenotípico de 70 cepas bacterianas purificadas empleando el sistema miniaturizado API, lo cual mostró una diversidad considerable en la microbiota vaginal de mujeres con y sin cáncer cervicouterino.

Palabras clave: cáncer cervicouterino; microbiota vaginal; perfil fenotípico; galerías API.

7.1.4. ABSTRACT.

Introduction: Cervical cancer (CC) is one of the neoplastic diseases with higher mortality among the female population of 25 to 64 years of age; so it is important the relationship of this pathology with other biological factors such as microorganisms. The autochthonous vaginal microbiota acts as the first line of defense against vaginal infections; any alteration favors the proliferation of opportunistic pathogens that produce symptoms and diseases. The objective of this study was to use miniaturized systems of API galleries to determine and compare the phenotypic profile of the

vaginal microbiota of women with and without cervical cancer. **Method:** A cross-sectional, non-probabilistic study was conducted with 40 cervicovaginal samples from newly diagnosed women with locally advanced CC and 40 cervicovaginal samples from women without CC. The phenotypic profile and bacterial identification was made through the use of miniaturized systems of API galleries bioMérieux®. **Results:** It was possible to characterize a diversity in the cervicovaginal microbiota. There were 5 matching bacterial species for both study groups: *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia fergusonii* and *Corynebacterium amycolatum*. When CC existed, corynebacteria and staphylococci predominated, while in women without this pathology, strains of staphylococci, streptococci, enterococci, aerococci, enterobacteria, paenibacilos, brevibacteria and even corynebacteria were identified. **Conclusion:** The phenotypic profile of 70 purified bacterial strains was determined using the miniaturized API system, which showed considerable diversity in the vaginal microbiota of women with and without cervical cancer.

Keywords: cervical cancer; vaginal microbiota; phenotypic profile; API galleries.

7.1.5. INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero. Se manifiesta por etapas, inicialmente a través de lesiones precursoras que en grado variable evolucionan a cáncer *in situ* cuando se compromete sólo a la superficie epitelial y posteriormente a cáncer invasor cuando el compromiso traspasa la membrana basal.¹

Se considera como una de las enfermedades neoplásicas más frecuentes y mortales entre la población femenina, especialmente en el grupo de 25 a 64 años de edad, reflejándose como un grave problema de salud pública mundial al ocupar el cuarto lugar entre los cánceres diagnosticados con casi 528,000 casos y más de 266,000 muertes anuales. Cerca del 85% de estas muertes son registradas en países en vías de desarrollo e incluso se espera que para el año 2030, la mortalidad alcance 474,000 casos anuales.^{1,2}

La población femenina en Latinoamérica se considera de alto riesgo para desarrollar CaCu; presenta aproximadamente 68,818 casos anuales, es decir, una incidencia de 21.2 casos por 100,000 mujeres entre 40 y 50 años de edad, sin embargo, este padecimiento se detecta cada vez más en mujeres jóvenes de entre 20 y 30 años.²

A partir del año 2012, el CaCu en México se reportó como la segunda causa de muerte entre la población femenina de 25 a 64 años de edad, estimándose una ocurrencia de 13,960 casos anuales.³ Para el año 2015, con respecto a la clasificación por etapas clínicas del CaCu, 26.5% correspondieron a carcinoma *in situ*, 25.5% a etapas tempranas, 17.18% a etapas intermedias y un 31.19% a etapas tardías.⁴

La citología cervical es el método preventivo más empleado para la detección de alteraciones celulares, incluso, permite caracterizar los diversos factores influyentes en la evolución o prevalencia del CaCu, aun cuando la patología sea asintomática.⁵

Existen diversos estudios que intentan buscar la relación existente entre el CaCu y otros factores biológicos como los microorganismos. Destacan entre ellos la investigación de Zur Hausen por sus trabajos sobre el virus del papiloma humano y su implicación en el CaCu.⁶ Recientemente, Godoy y colaboradores indicaron la posibilidad de emplear exudados cervicovaginales de mujeres puertorriqueñas entre 20 y 50 años de edad con el virus del papiloma humano (VPH) como posible biomarcador asociado al CaCu, mediante el análisis de la composición y diversidad metabólica y funcional de su microbiota, a fin de desarrollar herramientas diagnósticas y terapéuticas en la salud y enfermedad de dichas mujeres.⁷

La microbiota del cuerpo humano se define como el conjunto de comunidades microbianas que habitan de forma estable e interactúan entre sí en un sitio anatómico específico, autorregulando su concentración numérica, dinámica metabólica⁸ y su material genético colectivo, al cual se denomina microbioma.⁹

La microbiota difiere ampliamente tanto entre individuos como entre sitios anatómicos. Se ha demostrado su importancia y efecto sobre el metabolismo y la susceptibilidad del huésped en el desarrollo de algunas enfermedades.^{10,11} Su prosperidad depende de factores fisiológicos como humedad, temperatura y nutrientes¹²; así como de aquellos factores propios del sitio anatómico en donde se desarrolle como son, tracto gastrointestinal, cavidad oral, nasofaringe, tracto respiratorio, piel, vagina, entre otros.¹³

La superficie vaginal presenta un epitelio plano multiestratificado carente de glándulas y cuyo grosor varía en función de la secreción estrogénica de la mujer, de manera que, durante la edad fértil presenta un grosor de hasta 40 capas de células.¹⁴

El moco vaginal, es una secreción producto de la exudación del propio epitelio y del cuello del útero; este líquido es muy rico en nutrientes como la glucosa y otros aminoácidos que facilitan la colonización de la cavidad por comunidades bacterianas que constituyen la microbiota vaginal autóctona y que es considerada como la primera línea de defensa contra infecciones vaginales.^{15,16,17}

Cualquier alteración en la microbiota vaginal afecta su equilibrio dinámico, lo cual desencadena en la proliferación de una microbiota anormal, representada principalmente por patógenos oportunistas que producen síntomas y favorecen el desarrollo de enfermedades^{18,19} por ejemplo, el Virus del Papiloma Humano (VPH) considerado como un factor altamente predisponente para el desarrollo de cáncer cérvicouterino.^{20,21}

En microbiología clínica, es importante una correcta identificación bacteriana, cuyo objetivo principal radica en la asignación de especie a un aislamiento, y de este modo, conocer las implicaciones patogénicas o patológicas que pudiera generar en el huésped, así como la aplicación de un tratamiento eficaz.²²

La identificación bacteriana se apoya de técnicas moleculares y fenotípicas; las primeras se relacionan con aquellas características que determinan el genotipo de la bacteria, haciendo uso principalmente del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal. Las técnicas

fenotípicas intentan recrear las condiciones de vida natural de la bacteria para que esta pueda crecer *in vitro* y así poder estudiar su fenotipo.²³

La identificación fenotípica bacteriana según lo establece el manual de Bergey, se basa en la determinación de las características observables de las bacterias, tales como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas.²²

A pesar de que las técnicas moleculares en la identificación bacteriana actualmente tienen mayor auge, muchos laboratorios clínicos no cuentan con la tecnología e infraestructura necesaria para aplicarlas.²⁴ De ahí la importancia por conocer la correcta aplicación y realización de sistemas de identificación alterna, ya sea empleando métodos de identificación tradicional o sistemas de identificación rápida como los son las pruebas API.²⁵

La identificación por medio de sistemas miniaturizados API, es un método convencional que se basa en el estudio de características fenotípicas de un aislamiento bacteriano²⁶; consiste en la aplicación simultánea de diversas pruebas bioquímicas, generalmente 20 ó 50, mediante el uso de galerías constituidas por microtubos aislados que contienen diferentes sustratos liofilizados. Dichas pruebas bioquímicas reaccionan positiva o negativamente de acuerdo al inóculo bacteriano empleado, esto genera un sistema de códigos que se introducen al software específico e identifica la bacteria mediante un banco de datos.²⁷

Cada galería precisa de tener especial cuidado en el uso de las concentraciones precisas del inóculo bacteriano a identificar, el modo de inoculación, de incubación, uso de reactivos y de lectura, que si llegan a descuidarse pueden dar lugar a importantes errores.²⁸

El objetivo de la presente investigación consistió en el uso de los sistemas miniaturizados de galerías API para determinar y comparar el perfil fenotípico de la microbiota vaginal de mujeres con y sin cáncer cervicouterino.

7.1.6. METODOLOGÍA

Se realizó un estudio comparativo, transversal, no probabilístico, en el cual se incluyó la participación de 80 mujeres de entre 20 y 65 años de edad, divididos en 2 grupos de estudio:

Pacientes: formado por 40 mujeres recién diagnosticadas con cáncer cervicouterino localmente avanzado en los estadios 1B-2 a IV-A confirmado histológicamente. Controles: formado por 40 mujeres sin cáncer cervicouterino (con citología cervical negativa), acompañantes de las mujeres que conformaron el grupo de pacientes (relación familiar o de amistad). Las participantes de ambos grupos de estudio firmaron el consentimiento informado y posteriormente se les aplicó un cuestionario para evaluación de variables gineco-obstétricas de importancia.

Se excluyeron mujeres embarazadas, que hubieran utilizado antimicrobianos o antifúngicos sistémicos y locales en los últimos 30 días, que tuvieran relaciones sexuales 48 horas antes de la toma de muestra, que utilizaran duchas vaginales, que tuvieran flujo vaginal anormal durante las últimas 48 horas, así como mujeres que estuvieran menstruando durante la toma de la muestra.

7.1.6.1. Obtención de muestras y aislamiento de cepas.

Fueron tomadas con hisopos dos muestras de exudado cervicovaginal; éstas se colocaron en solución salina isotónica estéril, etiquetadas para su identificación y transportadas en un contenedor hermético en cadena de frío para su procesamiento. Posteriormente, se inocularon por duplicado en placas de agar BHI (Brain Heart Infusion, por sus siglas en inglés) y agar sangre, las cuales se incubaron a 37°C durante 48 horas en condiciones de aerobiosis. Finalmente, se seleccionaron las colonias representativas para ser purificadas en agar BHI bajo las mismas condiciones.

7.1.6.2. Caracterización morfológica.

Morfología macroscópica.

De las colonias purificadas se caracterizó tamaño, forma, borde, elevación, superficie, consistencia, aspecto, color, patrón de hemólisis y unidades formadoras de colonias (contables <400 UFC/ml; incontables >400 UFC/ml).

Morfología microscópica.

Se realizó un frotis de cada colonia aislada, el cual fue teñido por la técnica de Gram. Las observaciones fueron realizadas a través de un microscopio óptico Leica® Binocular CME (ML23).

Caracterización enzimática para elección de Galería API

Se aplicaron pruebas de catalasa y oxidasa²⁷ y se verificó respuesta a coagulasa (**Tabla 1**). Esto según la morfología microscópica que presentaron las colonias:

Tabla 1. Elección de galería API de acuerdo con reacciones de pruebas enzimáticas para catalasa y oxidasa.

Morfología Microscópica	Prueba de Catalasa	
	Reacción +	Reacción -
Cocos Gram Positivos	API STAPH	API 20 STREP
Bacilos Gram Positivos largos con esporas	API 50 CHB	
Bacilos Gram Positivos pequeños o cuneiformes	API CORYNE	
Bacilos Gram Positivos largos		API 50 CHL
	Prueba de Oxidasa	
	Reacción +	Reacción -
Bacilos Gram Negativos	API 20 NE	API 20E

7.1.6.3. Obtención de Biomasa

Se procedió a inocular cada una de las colonias en medio líquido de BHI, incubándose a 37°C durante 48 horas en condiciones de aerobiosis.

7.1.6.4. Pruebas bioquímicas para perfil fenotípico.

La biomasa de cada colonia fue empleada para preparar las ampollas del medio API necesario, realizando una suspensión bacteriana homogénea ajustada los estándares de turbidez de McFarland, según la galería correspondiente. La preparación de la galería, su inoculación y adición de reactivos correspondientes fueron realizados según las instrucciones del proveedor API bioMérieux®.

Las reacciones bioquímicas se tradujeron en cambios de color, y su interpretación se llevó a cabo utilizando una tabla de lectura incluida en el kit de las galerías, indicando reacciones positivas y negativas de las bacterias que fueron capaces o no de utilizar el correspondiente sustrato liofilizado.

La identificación se realizó a partir de un perfil numérico obtenido por la lectura de los ensayos bioquímicos.

Haciendo uso del sistema de identificación de bioMérieux® (disponible en la página <https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Identify>) se seleccionó la galería a interpretar y se ingresó el perfil numérico obtenido, realizando automáticamente una identificación con la ayuda del catálogo analítico de API, el cuál proporcionó con un alto índice de fiabilidad la identificación del microorganismo a nivel especie.

7.1.7. RESULTADOS

Tras la purificación de las colonias representativas se obtuvieron para el grupo de estudio de pacientes, 40 cepas y 12 grupos morfológicamente distintos; para el grupo de estudio de controles, 30 cepas y 13 grupos morfológicamente distintos.

Se presentan las **Tablas 2 y 3** para ambos grupos de estudio:

Tabla 2. Ordenamiento de cepas por grupo morfológico, caracterización macroscópica, microscópica, enzimática e identificación fenotípica por galería API empleada. Grupo de estudio de pacientes.

GM	TOTAL DE CEPAS	CLAVE DE CEPA	OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA	RTG	OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA	P. CAT	P. OX	P. COA	ANÁLISIS API	IDENTIFICACIÓN
1	9 cepas	2PB3	2-3.5mm, forma circular, borde irregular, elevación plana, superficie lisa, consistencia viscosa, aspecto húmedo, color blanco brillante, hemólisis γ	+	Cocos	+	ND	-	STAPH	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
		3PB4		+	Cocos	+	ND	-		
		20PS3		+	Cocos	+	ND	-		
		39PB2		+	Cocos	+	ND	-		
		29PS1		+	Cocos	+	ND	-		
		40PS3		+	Cocos	+	ND	-		
		36PS1		+	Cocos	+	ND	-		
		2PB1		+	Cocos	+	ND	-		
		7PB3		+	Cocos	+	ND	-		
2	9 cepas	3PS2	1-1.5mm, forma circular, borde irregular, elevación convexa, superficie lisa, consistencia suave, aspecto seco, color crema opaco, hemólisis α	+	Bacilos	+	ND	ND	CORYNE	<i>Corynebacterium amycolatum</i>
		11PB2		+	Bacilos	+	ND	ND		
		19PB2		+	Bacilos	+	ND	ND		
		32PB3		+	Bacilos	+	ND	ND		
		33PB3		+	Bacilos	+	ND	ND		
		35PB2		+	Bacilos	+	ND	ND		
		39PB4		+	Bacilos	+	ND	ND		
		39PS2		+	Bacilos	+	ND	ND		
		39PB5		+	Bacilos	+	ND	ND		
3	3 cepas	9PB3	1-2mm, forma circular, borde irregular, elevación convexa, superficie lisa, consistencia suave, aspecto seco, color crema opaco, hemólisis α	+	Bacilos	+	ND	ND	CORYNE	<i>Corynebacterium jeikeium</i>
		21PS1		+	Bacilos	+	ND	ND		
		36PS4		+	Bacilos	+	ND	ND		
4	3 cepas	35PB1	1-2mm, forma circular, borde irregular, elevación convexa, superficie lisa, consistencia suave, aspecto húmedo, color blanco, hemólisis β	+	Cocos	-	ND	-	20 STREP	<i>Streptococcus agalactiae</i>
		7PS3		+	Cocos	-	ND	-		
		16PS2		+	Cocos	-	ND	-		
5	5 cepas	13PS3	0.5-1mm, forma circular, borde irregular, elevación convexa, superficie lisa, consistencia suave, aspecto húmedo, color blanco opaco, hemólisis γ , β	+	Cocos	-	ND	-	20 STREP	<i>Enterococcus faecalis</i>
		20PB4		+	Cocos	-	ND	-		
		24PS2		+	Cocos	-	ND	-		
		32PB1		+	Cocos	-	ND	-		
		10PB1		+	Cocos	-	ND	-		
6	2 cepas	3PS5	0.5-1mm, forma circular, borde irregular, elevación convexa, superficie lisa, consistencia suave, aspecto húmedo, color blanco transparente, hemólisis α	+	Cocos	-	ND	-	20 STREP	<i>Streptococcus uberis</i>
		38PS1		+	Cocos	-	ND	-		

7	4 cepas	21PB1	2-4mm, forma circular, borde irregular, elevación convexa, superficie lisa, consistencia suave, aspecto húmedo, color blanco opaco, hemólisis α , β	-	Bacilos cortos	ND	-	ND	20 E	<i>Escherichia fergusonii</i>
		25PS1		-	Bacilos cortos	ND	-	ND		
		26PB1		-	Bacilos cortos	ND	-	ND		
		29PS5		-	Bacilos cortos	ND	-	ND		
8	1 cepa	5PB1	1.5-4mm, forma circular, borde irregular, elevación convexa, superficie lisa, consistencia suave, aspecto húmedo, color crema brillante, hemólisis α , β	-	Bacilos cortos	ND	-	ND	20 E	<i>Escherichia coli</i>
9	1 cepa	21PS3	1-2mm, forma circular, borde irregular, elevación convexa, superficie lisa, consistencia suave, aspecto húmedo, color blanco, hemólisis γ	+	Bacilos largos	-	ND	ND	50 CHL/B	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
10	1 cepa	23PS5	1-2mm, forma circular, borde irregular, elevación plana, superficie rugosa, consistencia viscosa, aspecto seco, color crema, hemólisis γ	+	Bacilos largos con esporas	+	ND	ND	50 CHL/B	<i>Bacillus pumilus</i>
11	1 cepa	16PB3	2-4mm, forma circular, borde irregular, elevación plana, superficie rugosa, consistencia viscosa, aspecto seco, color crema opaco, hemólisis β	+	Bacilos largos con esporas	+	ND	ND	50 CHL/B	<i>Bacillus subtilis</i>
12	1 cepa	3PB1	1-2mm, forma circular, borde irregular, elevación convexa, superficie lisa, consistencia suave, aspecto húmedo, color crema, hemólisis α , β	+	Bacilos	+	ND	ND	CORYNE	<i>Corynebacterium striatum</i>
TOTAL 40 CEPAS										

GM, grupo morfológico; RTG, respuesta a tinción de Gram; P.CAT, prueba de catalasa; P. OX, prueba de oxidasa; P. COA, prueba de coagulasa; ND, no determinado.

Tabla 3. Ordenamiento de cepas por grupo morfológico, caracterización macroscópica, microscópica, enzimática e identificación fenotípica por galería API empleada. Grupo de estudio de controles.

GM	TOTAL DE CEPAS	CLAVE DE CEPA	OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA	RTG	OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA	P. CAT	P. OX	P. COA	ANÁLISIS API	IDENTIFICACIÓN
1	3 cepas	2CB1	2-3.5mm, forma circular, borde irregular, elevación plana, superficie lisa, consistencia viscosa, aspecto húmedo, color blanco brillante, hemólisis γ	+	Cocos	+	ND	-	STAPH	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
		7CB1		+	Cocos	+	ND			
		28CS2		+	Cocos	+	ND			
2	2 cepas	17CS1	1-3mm, forma circular, borde irregular, elevación plana, superficie lisa, consistencia viscosa, aspecto húmedo, color blanco, hemólisis γ	+	Cocos	+	ND	-	STAPH	<i>Staphylococcus auricularis</i>
		18CS1		+	Cocos	+	ND			

3	8 cepas	20CB2		+	Cocos	-	ND	-	20 STREP	<i>Enterococcus faecalis</i>
		5CB2		+	Cocos	-	ND	-		
		8CB1	0.5-1mm, forma circular, borde irregular, elevación convexa, superficie lisa, consistencia suave, aspecto húmedo, color blanco opaco, hemólisis γ , β	+	Cocos	-	ND	-		
		12CS4		+	Cocos	-	ND	-		
		25CS3		+	Cocos	-	ND	-		
		5CS1		+	Cocos	-	ND	-		
		15CB2		+	Cocos	-	ND	-		
38CB2	+	Cocos	-	ND	-					
4	3 cepas	4CS2	0.5-1mm, forma circular, borde irregular, elevación convexa, superficie lisa, consistencia suave, aspecto húmedo, color blanco opaco, hemólisis α	+	Cocos	-	ND	-	20 STREP	<i>Globicatella sanguinis</i>
		17CS3		+	Cocos	-	ND	-		
		9CS3		+	Cocos	-	ND	-		
5	5 cepas	2CS3		-	Bacilos cortos	ND	-	ND	20 E	<i>Escherichia fergusonii</i>
		13CS3	2-4mm, forma circular, borde irregular, elevación convexa, superficie lisa, consistencia suave, aspecto húmedo, color blanco opaco, hemólisis α , β	-	Bacilos cortos	ND	-	ND		
		28CB1		-	Bacilos cortos	ND	-	ND		
		31CS1		-	Bacilos cortos	ND	-	ND		
		35CS1		-	Bacilos cortos	ND	-	ND		
2CB2	1-5mm, forma circular, borde regular, elevación convexa, superficie lisa, consistencia suave, aspecto húmedo, color gris transparente, hemólisis γ	+		Bacilos largos con esporas	+	ND	ND	50 CHL/B	<i>Paenibacillus lautus</i>	
7	2 cepas	8CS5	1-1.5mm, forma circular, borde irregular, elevación convexa, superficie lisa, consistencia suave, aspecto seco, color crema opaco, hemólisis α	+	Bacilos cuneiformes	+	ND	ND	CORYNE	<i>Corynebacterium amycolatum</i>
		25CS1		+	Bacilos cuneiformes	+	ND	ND		
8	1 cepa	12CS5	4-7mm, forma circular, borde irregular, elevación umbonada, superficie lisa, consistencia suave, aspecto húmedo, color crema amarillento, hemólisis β	+	Cocos	+	ND	-	STAPH	<i>Staphylococcus warneri</i>
9	1 cepa	16CS3	1-2mm, forma circular, borde irregular, elevación convexa, superficie lisa, consistencia suave, aspecto húmedo, color blanco, hemólisis β	+	Cocos	-	ND	-	20 STREP	<i>Streptococcus agalactiae</i>
10	1 cepa	15CB1	2-4mm, forma circular, borde regular, elevación convexa, superficie lisa, consistencia suave, aspecto húmedo, color crema transparente, hemólisis α , γ	-	Bacilo	ND	-	ND	20 E	<i>Citrobacter freundii</i>
11	1 cepa	25CS4	1-3mm, forma circular, borde regular, elevación convexa, superficie lisa, consistencia suave, aspecto húmedo, color blanco opaco, hemólisis γ	+	Cocos	+	ND	-	STAPH	<i>Staphylococcus capitis</i>
12	1 cepa	26CB1	0.5-1mm, forma circular, borde regular, elevación convexa, superficie lisa, consistencia suave, aspecto húmedo, color crema transparente, hemólisis γ	+	Bacilos	+	ND	ND	CORYNE	<i>Brevibacterium epidermidis</i>
13	1 cepa	38CB3	7-10mm, forma circular, borde ondulado, elevación umbonada, superficie lisa, consistencia suave, aspecto viscoso, color crema brillante, hemólisis γ	-	Bacilos	ND	-	ND	20 E	<i>Klebsiella oxytoca</i>

TOTAL 30 CEPAS

GM, grupo morfológico; RTG, respuesta a tinción de Gram; P.CAT, prueba de catalasa; P. OX, prueba de oxidasa; P. COA, prueba de coagulasa; ND, no determinado.

El número de cepas del grupo de pacientes y controles identificadas por galería API fueron:

Tabla 4. Cepas totales del grupo de pacientes y controles.

Especies	Numero de cepas (Pacientes)	Numero de cepas (Controles)	Análisis API
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9	3	STAPH
<i>Staphylococcus auricularis</i>	0	2	
<i>Staphylococcus warneri</i>	0	1	
<i>Staphylococcus capitis</i>	0	1	
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	8	20 STREP
<i>Globicatella sanguinis</i>	0	3	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	1	
<i>Streptococcus uberis</i>	2	0	
<i>Escherichia fergusonii</i>	4	5	20 E
<i>Escherichia coli</i>	1	0	
<i>Citrobacter freundii</i>	0	1	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	1	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1	0	50 CHL/B
<i>Paenibacillus lautus</i>	0	1	
<i>Bacillus pumilus</i>	1	0	
<i>Bacillus subtilis</i>	1	0	
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	9	2	CORYNE
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	3	0	
<i>Corynebacterium striatum</i>	1	0	
<i>Brevibacterium epidermidis</i>	0	1	
TOTAL DE CEPAS	40	30	

7.1.8. DISCUSIÓN.

En el presente estudio se realizó un análisis de cepas bacterianas a partir de muestras cervicovaginales de mujeres con la patología de cáncer cervicouterino empleando el sistema miniaturizado API, aplicando galerías y análisis de API STAPH, API 20 STREP, API 20E, API CORYNE y API 50 CHL/B.

A pesar de que la identificación con estudios genéticos y moleculares actualmente ha tomado mayor auge²⁴, la identificación fenotípica aún resulta ser bastante eficaz cuando no se cuenta con la tecnología e infraestructura necesaria en los laboratorios clínicos. Esto queda demostrado con los resultados presentados, donde se puede observar que las pruebas bioquímicas de cada una de las galerías API analizadas para los grupos de estudio de pacientes y controles, fueron suficientes para poder identificar y determinar en forma rápida, sencilla y asequible una amplia diversidad bacteriana.

Ravel y colaboradores, realizaron un estudio con 396 mujeres norteamericanas asintomáticas de cuatro grupos étnicos a fin de caracterizar la microbiota vaginal; se encontró una gran diversidad de comunidades microbianas. Se lograron caracterizar especies de *Lactobacillus* (*L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii*); así como otros grupos taxonómicos bacterianos como *Gardnerella*, *Atopobium*, *Leptotrichia*, *Sneathia* spp. y otros organismos asociados a la vaginosis bacteriana.²⁹ Este hallazgo da pie a las investigaciones actuales, en donde se puede determinar que entre el 20-30% de las mujeres pueden presentar en algún momento una microbiota diversa deficiente o disminuida en especies de lactobacilos, considerada como una microbiota anormal.^{16,17}

En coincidencia con los estudios de Ravel, en el presente estudio se logró caracterizar una diversidad en la microbiota cervicovaginal, sin embargo, se hizo uso de exudados cervicovaginales de mujeres con cáncer cervicouterino y mujeres sin dicha patología. Se encontró que, fueron 5 las especies bacterianas coincidentes para ambos grupos de estudio: *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia fergusonii* y *Corynebacterium amycolatum*.

Velázquez y colaboradores en 2011, indicaron en sus revisiones que, ante la existencia del CaCu, se modifica el ambiente cervicovaginal al presentar alteraciones y lesiones celulares, lo cual es un factor predisponente para el desarrollo de infecciones recurrentes causadas por la colonización predominante de comunidades bacterianas consideradas como patógenos oportunistas.³⁰

En concordancia con lo anterior, a pesar de que fueron 40 las cepas que se lograron purificar del grupo de las pacientes, la microbiota cervicovaginal identificada no fue tan diversa en comparación a la microbiota que se identificó en las 30 cepas de las mujeres sin cáncer cervicouterino; además se puede observar que cuanto existió la patología del CaCu, predominaron corinebacterias y estafilococos, mientras que en las mujeres sin CaCu, se lograron identificar variedades de estafilococos, estreptococos, enterococos, eococos, enteobacterias, paenibacilos, brevibacterias e incluso corinebacterias.

Los resultados del presente estudio también coinciden con lo expuesto por Gajer y colaboradores en 2012, y Lewis y colaboradores en 2017, quienes indican que “cualquier alteración por factores fisiológicos, anatómicos o biológicos en la microbiota vaginal, afectará su equilibrio dinámico¹⁸, lo cual desencadenará el desarrollo de una microbiota anormal, representada principalmente por patógenos oportunistas que producirán síntomas y favorecerán el desarrollo de enfermedades¹⁹”

Conocer el perfil fenotípico de la microbiota cervicovaginal que acompaña el cáncer cervicouterino puede ser un posible biomarcador para desarrollar futuros estudios enfocados en el desarrollo de técnicas clínicas, diagnósticas y terapéuticas que permitan complementar el entendimiento del proceso salud-enfermedad de las mujeres mexicanas en presencia de esta patología y la dinámica de la microbiota en el desarrollo de infecciones sobreagregadas.

En conclusión, Se logró determinar y comparar el perfil fenotípico de la microbiota vaginal de 80 mujeres, donde 40 fueron diagnosticadas con cáncer cervicouterino localmente avanzado en los estadios 1B-2 a IV-A confirmado histológicamente y 40 mujeres con citología cervical negativa para dicha patología.

A partir de los exudados cervicovaginales, se lograron aislar 70 cepas bacterianas donde, para el grupo de pacientes se determinaron 40 cepas y 12 grupos morfológicamente distintos y para el grupo de controles se determinaron 30 cepas y 13 grupos morfológicamente distintos.

Se determinó el perfil fenotípico de las cepas bacterianas purificadas empleando el sistema miniaturizado API, aplicando galerías y análisis de API STAPH, API 20STREP, API 20E, API CORYNE y API 50 CHL/B.

Quizá una de las limitantes del presente, consistió en la base de datos que utiliza el sistema de identificación de API bioMérieux®, puesto que el análisis del perfil numérico generado por las pruebas bioquímicas de las galerías muchas veces puede ser coincidente o similar para dos especies, o bien, no encontrarse actualizada con respecto al constante cambio que se tiene en el campo de la microbiología bacteriana.

7.1.9. Conflicto de Intereses.

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

7.1.10. Agradecimientos.

i. Al Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) por su colaboración en este estudio. ii. El presente trabajo es derivado del proyecto 4350/2017/C1 de la Universidad Autónoma del Estado de México. iii. Este trabajo se deriva de una tesis de Maestría del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud, reconocido por el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (PNPC-CONACYT).

7.1.11. Referencias

1. Parkhurst JO and Vulimiri M. Cervical cancer and the global health agenda: Insights from multiple policy-analysis frameworks. *Global Public Health*. 2013. 8(10): 1093–1108.
2. Globocan. Cervical Cancer. Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Lyon, France: GLOBOCAN 2012. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization, 2012.
3. INEGI 2012. Estadísticas de mortalidad. Cubos dinámicos y CONAPO 2012. Proyecciones de la población de México, 2012- 2050
4. Secretaría de Salud 2017. Subsecretaría de prevención y promoción de la salud Programa de Acción Específico: Prevención y Control del cáncer de la mujer 2013-2018. Disponible en:https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/10046/PrevencionyControldelCancerdeLaMujer_2013_2018.pdf y <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/250701/LineamientosCaCu2017.pdf>
5. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV and cervical cancer. *J Gynecol Oncol*. 2008; 110 (3):4-7
6. Zur Hausen H. The search for infectious causes of human cancers: where and why (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*. 2009;48:5798–808
7. Godoy VF, Romaguera J. Relación entre las comunidades bacterianas cervicovaginales y el Virus del Papiloma Humano (VPH) en mujeres puertorriqueñas. *Rev Puert MSP*. 2015. 30:1-17
8. Redinbo MR. The Microbiota, Chemical Symbiosis, and Human Disease. *J. Mol. Biol.*, 2014. 426(23): 3877–3891.
9. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the health human microbiome. *Nature* 2012; 486:207–14
10. Turnbaugh PJ, Ley RE, HamadyM, Fraser-Liggett C, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature* 2007; 449:804–10.
11. Relman DA. The human microbiome and the future of medicine. *JAMA* 2015;314:1127–8.
12. Methe B, Karen N, Mihai P, Heather HC, Michelle GG, Curtis H, et al. NIH Public Acces. A framework for human microbiome research. *Nature*. 2012. 486:215- 221.
13. Peterson J, Garges S, Giovanni M, et al., NIH HMP Working Group. The NIH human microbiome project. *Genome Res*. 2009(19):2317-2323.
14. Martín R, Soberón N, Vázquez F y Suárez JE. La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26 (3):160-7.
15. Martínez-Peña MD. Microbiota vaginal normal: los Lactobacilos. *Rev Med Lab*. 2012. 4 (1): 17-25
16. Bing M, Forney LJ, Ravel J. Vaginal microbiome: rethinking health and diseases. *Annu Rev Microbiol* 2012;66:371–89.
17. Aldunate M, Srbinovski D, Hearps AC, Latham CF, Ramsland PA, Gugasyan R, et al. Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Front Physiol* 2015;6:164.
18. Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schütte UM, Zhong X, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med* 2012;4(132):132ra52. doi:10.1126/scitranslmed.3003605

19. Lewis FMT, Bernstein KT, Aral SO. El microbioma vaginal y su relación con el comportamiento, la salud sexual y las enfermedades de transmisión sexual. *Obstet Gynecol* 2017;129:643–54.
20. Ghosh SK, Choudhury B, Hansa J, Mondal R, Singh M, Singh M, Duttagupta S, Das A, Kumar R, Laskar RS, Kannan R, Ghosh PR. Human Papillomavirus Testing for Suspected Cervical Cancer Patients from Southern Assam by Fast-PCR. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(3):749-51.
21. Dols JA, Reid G, Brown JM, Tempelman H, Bontekoe TR, Quint WG, Boon ME. HPV Type Distribution and cervical cytology among HIV-Positive Tanzanian and South African Women. *ISRN Obstetrics and Gynecology*. 2012; 2012:514146. doi:10.5402/2012/514146.
22. Bou G., Fernández-Olmos AF., García C., Sáenz-Nieto JA y Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(8):601–608. doi:10.1016/j.eimc.2011.03.012.
23. García-Mazcorro JF., Garza-González E., Marroquín-Cardona AG y Tamayo JL. Caracterización, influencia y manipulación de la microbiota gastrointestinal en salud y enfermedad. *Gastroenterol Hepatol*. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gastrohep.2015.01.004>
24. Flores AA, Ramírez AR, Salazar AM, Salgado R. Evaluación del diagnóstico de laboratorio manual y automatizado de infecciones vaginales. *Investigación Disciplinaria Multidisciplinaria. Ciencia y Tecnología*. 2010. Año 9. Número 9.
25. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Microbiología médica*. 4ª ed. España: Mosby Elsevier Science; 2002. p. 153-170.
26. Isenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, American Society for Microbiology. Washington dc: ASM Press; 2004. p. 3213.323.
27. Velasco J, Araque MA, Araujo E, Longa A, Nieves B, Ramírez AC, Sánchez K, Velazco E. *Manual práctico de bacteriología clínica*. Venezuela: Editorial Venezolana C. A. 2008. p. 18-23.
28. McFaddin JF. *Biochemical test for identification of medical bacteria*. 3ª. Ed. Filadelfia: Lippincot Williams & Wilkings; 2000.
29. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(suppl 1):4680–7.
30. Velázquez E., Peix A y Gómez-Alonso A. Microorganismos y cáncer: evidencias científicas y nuevas hipótesis. *Cir Esp*. 2011; 89(3) :136–144.

7.2. RESULTADOS ADICIONALES

7.3. Caracterización enzimática y elección de galerías API.

La caracterización microscópica de cada una de las colonias bacterianas fue indispensable para proceder a realizar la caracterización enzimática; en esta última se aplicaron pruebas de catalasa (para cocos y bacilos Gram positivos) y oxidasa (para bacilos Gram negativos) según el Manual Práctico de Bacteriología Clínica de Velasco ⁽⁷⁰⁾, y a su vez, se verificó la respuesta a la prueba de coagulasa. Los resultados obtenidos de acuerdo con las reacciones de cada prueba enzimática condujeron a seleccionar la galería API como a continuación se presenta en la **Tabla 6**:

Tabla 6. Elección de galería API de acuerdo con reacciones de pruebas enzimáticas para catalasa y oxidasa.

Morfología Microscópica	Prueba de Catalasa	
	Reacción +	Reacción -
Cocos Gram Positivos	API STAPH	API 20 STREP
Bacilos Gram Positivos largos con esporas	API 50 CHB	
Bacilos Gram Positivos pequeños o cuneiformes	API CORYNE	
Bacilos Gram Positivos largos	API 50 CHL	
	Prueba de Oxidasa	
	Reacción +	Reacción -
Bacilos Gram Negativos	API 20 NE	API 20E

De lo anterior, para el grupo de pacientes conformado por 40 cepas se aplicaron 40 galerías API como se muestra en la **Tabla 7**:

Tabla 7. Realización de galerías API para el grupo de estudio de pacientes.

GM	Observación microscópica	Prueba enzimática	Galería API	Total de cepas
1	Cocos en racimo Gram +	Catalasa positiva	STAPH	9
2	Bacilos Gram +	Catalasa positiva	CORYNE	9
3	Bacilos Gram +	Catalasa positiva	CORYNE	3
4	Cocos en cadena Gram +	Catalasa negativa	20 STREP	3
5	Cocos en cadena corta Gram +	Catalasa negativa	20 STREP	5

6	Cocos en cadena Gram +	Catalasa negativa	20 STREP	2
7	Bacilos cortos Gram -	Oxidasa negativa	20 E	4
8	Bacilos cortos Gram -	Oxidasa negativa	20 E	1
9	Bacilos largos Gram +	Catalasa negativa	50 CHL	1
10	Bacilos largos con esporas Gram +	Catalasa positiva	50 CHB	1
11	Bacilos largos con esporas Gram +	Catalasa positiva	50CHB	1
12	Bacilos Gram +	Catalasa positiva	CORYNE	1
			TOTAL	40 cepas

GM, grupo morfológico. API STAPH: 9 cepas; API STREP: 10 cepas; API 20 E: 5 cepas; API 50 CHL/B: 3 cepas; API CORYNE: 13 cepas.

Para el grupo de controles conformado por 30 cepas se aplicaron 30 galerías API como se muestra en la **Tabla 8**:

Tabla 8. Realización de galerías API para el grupo de estudio de controles.

GM	Observación microscópica	Prueba enzimática	Galería API	Total de Cepas
1	Cocos en racimo Gram +	Catalasa positiva	STAPH	3
2	Cocos en racimo Gram +	Catalasa positiva	STAPH	2
3	Cocos en cadena corta Gram +	Catalasa negativa	20 STREP	8
4	Cocos en racimo Gram +	Catalasa negativa	20 STREP	3
5	Bacilos cortos Gram -	Oxidasa negativa	20 E	5
6	Bacilos largos con esporas Gram +	Catalasa positiva	50 CHB	1
7	Bacilos cuneiformes Gram +	Catalasa positiva	CORYNE	2
8	Cocos en racimo Gram +	Catalasa positiva	STAPH	1
9	Cocos en cadena Gram +	Catalasa negativa	20 STREP	1
10	Bacilos Gram -	Oxidasa negativa	20 E	1
11	Cocos en racimo Gram +	Catalasa positiva	STAPH	1
12	Bacilos Gram +	Catalasa positiva	CORYNE	1
13	Bacilos Gram -	Oxidasa negativa	20 E	1
			TOTAL	30 cepas

GM, grupo morfológico. API STAPH: 7 cepas; API STREP: 12 cepas; API 20 E: 7 cepas; API 50 CHL/B: 1 cepa; API CORYNE: 3 cepas.

7.4. Identificación fenotípica y pruebas bioquímicas por galería API.

Se tuvieron reacciones positivas y negativas en las pruebas bioquímicas que conformaron cada galería API que fue empleada, según fue el caso.

De acuerdo con estos resultados, se lograron determinar con la galería API STAPH las especies *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus warneri* y *Staphylococcus*

capitis. Las reacciones en las pruebas bioquímicas que conforman la galería API STAPH y su consiguiente identificación fenotípica se presentan en la **Tabla 9**:

Tabla 9. Galería API STAPH.

Ribotipo	Especie bacteriana	Pruebas bioquímicas																				
		0	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR
1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
2	<i>Staphylococcus auricularis</i>	0	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
3	<i>Staphylococcus warneri</i>	0	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
4	<i>Staphylococcus capitis</i>	0	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-

Con la galería API 20 STREP las especies bacterianas que se lograron identificar fueron: *Enterococcus faecalis*, *Globicatella sanguinis*, *Streptococcus agalactiae*, y *Streptococcus uberis*. Las reacciones en las pruebas bioquímicas que conforman la galería API STREP y su consiguiente identificación fenotípica se presentan en la **Tabla 10**:

Tabla 10. Galería API 20 STREP.

Ribotipo	Especie bacteriana	Pruebas bioquímicas																				
		VP	HIP	ESC	PYR	AGA	BGU	BGA	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLY	HEM
5	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
6	<i>Globicatella sanguinis</i>	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
7	<i>Streptococcus agalactiae</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
8	<i>Streptococcus uberis</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-

Con la galería API 20 E las especies bacterianas que se lograron identificar fueron: *Escherichia fergusonii*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* y *Klebsiella oxytoca*. Las reacciones en las pruebas bioquímicas que conforman la galería API 20 E y su consiguiente identificación fenotípica se presentan en la **Tabla 11**:

Tabla 11. Galería API 20 E.

Ribotipo	Especie bacteriana	Pruebas bioquímicas																				
		ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
9	<i>Escherichia fergusonii</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
10	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
11	<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
12	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Con la galería API 50 CHB/L las especies bacterianas que se lograron identificar fueron: *Paenibacillus lautus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus rhamnosus*. Las reacciones en las pruebas bioquímicas que conforman la galería API API 50B/L y su consiguiente identificación fenotípica se presentan en la **Tabla 12**:

Tabla 12. Galería API 50 CHL/B.

		Pruebas bioquímicas																				
Ribotipo	Especie bacteriana	0	GLY	ERY	DAR	LAR	RIB	DXY	LXY	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM
13	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
14	<i>Paenibacillus lautus</i>	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
15	<i>Bacillus pumilus</i>	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
16	<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-

		Pruebas bioquímicas																				
Ribotipo	Especie bacteriana	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLY	XLT	GEN	TUR	LYX
13	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
14	<i>Paenibacillus lautus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
15	<i>Bacillus pumilus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
16	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-

		Pruebas bioquímicas																			
Ribotipo	Especie bacteriana	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG	ONP	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	NIT
13	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	<i>Paenibacillus lautus</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
15	<i>Bacillus pumilus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
16	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+

Con la galería API CORYNE las especies bacterianas que se lograron identificar fueron: *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium striatum* y *Brevibacterium epidermidis*. Las reacciones en las pruebas bioquímicas que conforman la galería API CORYNE y su consiguiente identificación fenotípica se presentan en la **Tabla 13**:

Tabla 13. Galería API CORYNE.

		Pruebas bioquímicas																				
Ribotipo	Especie bacteriana	NIT	PYZ	PYR	PAL	βGU	βGAL	αGLU	βNA	ESC	URE	GEL	0	GLU	RIB	XYL	MAN	MAL	LAC	SAC	GLY	CAT
17	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+
18	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
19	<i>Corynebacterium striatum</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+
20	<i>Brevibacterium epidermidis</i>	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+

Fueron 20 los fenotipos identificados correspondientes a 20 especies bacterianas distintas para el grupo de pacientes con 40 cepas analizadas y para el grupo de controles con 30 cepas analizadas (**Tabla 14**):

Tabla 14. Fenotipos y especies bacterianas identificadas por análisis API para cepas del grupo de pacientes y controles.

Fenotipos	Especies	Numero de cepas (Pacientes)	Numero de cepas (Controles)	Análisis API
1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9	3	STAPH
2	<i>Staphylococcus auricularis</i>	0	2	
3	<i>Staphylococcus warneri</i>	0	1	
4	<i>Staphylococcus capitis</i>	0	1	
5	<i>Enterococcus faecalis</i>	5	8	20 STREP
6	<i>Globicatella sanguinis</i>	0	3	
7	<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	1	
8	<i>Streptococcus uberis</i>	2	0	
9	<i>Escherichia fergusonii</i>	4	5	20 E
10	<i>Escherichia coli</i>	1	0	
11	<i>Citrobacter freundii</i>	0	1	
12	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	1	
13	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1	0	50 CHL/B
14	<i>Paenibacillus lautus</i>	0	1	
15	<i>Bacillus pumilus</i>	1	0	
16	<i>Bacillus subtilis</i>	1	0	
17	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	9	2	CORYNE
18	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	3	0	
19	<i>Corynebacterium striatum</i>	1	0	
20	<i>Brevibacterium epidermidis</i>	0	1	
TOTAL DE CEPAS		40	30	

En la **Tabla 15**, se muestran desglosados los 7 fenotipos que se identificaron para el grupo de pacientes, 8 fenotipos identificados para el grupo de controles y los 5 fenotipos que fueron identificados en ambos grupos:

Tabla 15. Fenotipos en grupo de pacientes y controles.

Grupo de pacientes		Grupo de Controles	
Fenotipo		Fenotipo	
8	• <i>Streptococcus uberis</i>	2	• <i>Staphylococcus auricularis</i>
10	• <i>Escherichia coli</i>	3	• <i>Staphylococcus warneri</i>
13	• <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	4	• <i>Staphylococcus capitis</i>
15	• <i>Bacillus pumilus</i>	6	• <i>Globicatella sanguinis</i>
16	• <i>Bacillus subtilis</i>	11	• <i>Citrobacter freundii</i>
18	• <i>Corynebacterium jeikeium</i>	12	• <i>Klebsiella oxytoca</i>
19	• <i>Corynebacterium striatum</i>	14	• <i>Paenibacillus lautus</i>
		20	• <i>Brevibacterium epidermidis</i>
Fenotipo	Especies coincidentes en grupo de pacientes y grupo de controles		
1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
5	<i>Enterococcus faecalis</i>		
7	<i>Streptococcus agalactiae</i>		
9	<i>Escherichia fergusonii</i>		
17	<i>Corynebacterium amycolatum</i>		

7.5. Aislamiento, purificación, ubicación en grupo morfológico e identificación de cepas mediante análisis API.

Se presenta la **Tabla 16** donde se muestra el número de cepas aisladas por cada una de las 40 mujeres que participaron en el grupo de pacientes, teniendo un total de 196 cepas; de las cuales 40 fueron cepas las que se seleccionaron para ser purificadas e identificadas mediante el uso de galerías API.

Asimismo, en la **Tabla 17**, se muestra el número de cepas aislados por cada una de las 40 mujeres que participaron en el grupo de controles, teniendo un total de 155 cepas; de las cuales 30 fueron las que se seleccionaron para ser purificadas e identificadas mediante el uso de galerías API.

TABLA 16. Aislamiento, purificación, ubicación en grupo morfológico e identificación de cepas de pacientes.

Paciente	Número de cepas por paciente	Clave del número de cepas	Cepas purificadas	Clave de cepas purificadas	Ubicación en grupo morfológico	Identificación	Análisis API
1	7	1PS1, 1PS2, 1PS3, 1PS4, 1PB1, 1PB2, 1PB3	0	NA	NA	NA	NA
2	8	2PS1, 2PS2, 2PS3, 2PS4, 2PB1, 2PB2, 2PB3, 2PB4	2	2PB1	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	STAPH
				2PB3	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	STAPH
3	10	3PS1, 3PS2, 3PS3, 3PS4, 3PS5, 3PB1, 3PB2, 3PB3, 3PB4, 3PB5	4	3PB1	12	<i>Corynebacterium striatum</i>	CORYNE
				3PB4	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	STAPH
				3PS2	2	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	CORYNE
				3PS5	6	<i>Streptococcus uberis</i>	20 STREP
4	3	4PS1, 4PS2, 4PB1	0	NA	NA	NA	NA
5	2	5PB1, 5PB2	1	5PB1	8	<i>Escherichia coli</i>	20 E
6	4	6PS1, 6PS2, 6PB1, 6PB2	0	NA	NA	NA	NA
7	9	7PB1, 7PB2, 7PB3, 7PB4, 7PS1, 7PS2, 7PS3, 7PS4, 7PS5	2	7PB3	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	STAPH
				7PS3	4	<i>Streptococcus agalactiae</i>	20 STREP
8	8	8PB1, 8PB2, 8PB3, 8PB4, 8PS1, 8PS2, 8PS3, 8PS4	0	NA	NA	NA	NA
9	8	9PB1, 9PB2, 9PB3, 9PS1, 9PS2, 9PS3, 9PS4, 9PS5	1	9PB3	3	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	CORYNE
10	3	10PB1, 10PS1, 10PS2	1	10PB1	5	<i>Enterococcus faecalis</i>	20 STREP
11	5	11PB1, 11PB2, 11PS1, 11PS2, 11PS3	1	11PB2	2	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	CORYNE
12	3	12PB1, 12PS1, 12PS2	0	NA	NA	NA	NA
13	8	13PB1, 13PB2, 13PB3, 13PB4, 13PS1, 13PS2, 13PS3, 13PS4	1	13PS3	5	<i>Enterococcus faecalis</i>	20 STREP
14	1	14PB1	0	NA	NA	NA	NA

TABLA 16 (Continuación). Aislamiento, purificación, ubicación en grupo morfológico e identificación de cepas de pacientes.

Paciente	Número de cepas por paciente	Clave del número de cepas	Cepas purificadas	Clave de cepas purificadas	Ubicación en grupo morfológico	Identificación	Análisis API
15	1	15PB1	0	NA	NA	NA	NA
16	6	16PB1, 16PB2, 16PB3, 16PS1, 16PS2, 16PS3	2	16PS2 16PB3	4 11	<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Bacillus subtilis</i>	20 STREP 50 CHL/B
17	6	17PB1, 17PB2, 17PS1, 17PS2, 17PS3, 17PS4	0	NA	NA	NA	NA
18	7	18PS1, 18PS2, 18PS3, 18PS4, 18PB1, 18PB2, 18PB3	0	NA	NA	NA	NA
19	7	19PS1, 19PS2, 19PS3, 19PS4, 19PB1, 19PB2, 19PB3	1	19PB2	2	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	CORYNE
20	8	20PB1, 20PB2, 20PB3, 20PB4 20PS1, 20PS2, 20PS3, 20PS4	2	20PS3 20PB4	1 5	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	STAPH 20 STREP
21	5	21PS1, 21PS2, 21PS3, 21PB1, 21PB2	3	21PS1 21PB1 21PS3	3 7 9	<i>Corynebacterium jeikeium</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CORYNE 50CHL/B
22	2	22PB1, 22PS1	0	NA	NA	NA	NA
23	8	23PB1, 23PB2, 23PB3, 23PS1, 23PS2, 23PS3, 23PS4, 23PS5	1	23PS5	10	<i>Bacillus pumilus</i>	50CHL/B
24	6	24PB1, 24PB2, 24PB3, 24PB4, 24PS1, 24PS2	1	24PS2	5	<i>Enterococcus faecalis</i>	20 STREP
25	3	25PS1, 25PS2, 25PB1	1	25PS1	7	<i>Escherichia fergusonii</i>	20 E
26	2	26PS1, 26PB1	1	26PB1	7	<i>Escherichia fergusonii</i>	20 E
27	5	27PB1, 27PB2, 27PS1, 27PS2, 27PS3	0	NA	NA	NA	NA
28	2	28PB1, 28PS1	0	NA	NA	NA	NA
29	10	29PB1, 29PB2, 29PB3, 29PB4, 29PB5, 29PS1, 29PS2, 29PS3, 29PS4, 29PS5	2	29PS1 29PS5	1 7	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Escherichia fergusonii</i>	STAPH 20 E

TABLA 16 (Continuación). Aislamiento, purificación, ubicación en grupo morfológico e identificación de cepas de pacientes.

Paciente	Número de cepas por paciente	Clave del número de cepas	Cepas purificadas	Clave de cepas purificadas	Ubicación en grupo morfológico	Identificación	Análisis API
30	3	30PB1, 30PS1, 30PS2	0	NA	NA	NA	NA
31	1	31PB1	0	NA	NA	NA	NA
32	3	32PB1, 32PB2, 32PB3	2	32PB1	5	<i>Enterococcus faecalis</i>	20 STREP
				32PB3	2	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	CORYNE
33	3	33PB1, 33PB2, 33PB3	1	33PB3	2	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	CORYNE
34	1	34PB1	0	NA	NA	NA	NA
35	5	35PS1, 35PS2, 35PS3, 35PB1, 35PB2	2	35PB1	4	<i>Streptococcus agalactiae</i>	20 STREP
				35PB2	2	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	CORYNE
36	5	36PS1, 36PS2, 36PS3, 36PS4, 36PS5	2	36PS1	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	STAPH
				36PS4	3	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	CORYNE
37	3	37PS1, 37PB1, 37PB2	0	NA	NA	NA	NA
38	4	38PB1, 38PB2, 38PS1 38PS2	1	38PS1	6	<i>Streptococcus uberis</i>	20 STREP
				39PB2	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	STAPH
39	8	39PS1, 39PS2, 39PS3, 39PB1, 39PB2, 39PB3, 39PB4, 39PB5	4	39PB4	2	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	CORYNE
				39PB5	2	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	CORYNE
				39PS2	2	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	CORYNE
40	3	40PS1, 40PS2, 40PS3	1	40PS3	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	STAPH

TABLA 17. Aislamiento, purificación, ubicación en grupo morfológico e identificación de cepas de controles.

Control	Número de cepas por control	Clave del número de cepas	Cepas purificadas	Clave de cepas purificadas	Ubicación en grupo morfológico	Identificación	Análisis API
1	1	1CB1	0	NA	NA	NA	NA
2	6	2CS1, 2CS2, 2CS3, 2CB1, 2CB2, 2CB3	3	2CB1	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	STAPH
				2CB2	6	<i>Paenibacillus lautus</i>	50CHL/B
				2CS3	5	<i>Escherichia fergusonii</i>	20 E
3	3	3CB1, 3CS1, 3CS2	0	NA	NA	NA	NA
4	4	4CB1, 4CB2, 4CS1, 4CS2	1	4CS2	4	<i>Globicatella sanguinis</i>	20 STREP
5	4	5CB1, 5CB2, 5CS1, 5CS2	2	5CB2	3	<i>Enterococcus faecalis</i>	20 STREP
				5CS1	3	<i>Enterococcus faecalis</i>	20 STREP
6	2	6CB1, 6CS1	0	NA	NA	NA	NA
7	6	7CB1, 7CB2, 7CS1, 7CS2, 7CS3, 7CS4	1	7CB1	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	STAPH
8	6	8CB1, 8CS1, 8CS2, 8CS3, 8CS4, 8CS5	2	8CB1	3	<i>Enterococcus faecalis</i>	20 STREP
				8CS5	7	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	CORYNE
9	7	9CS1, 9CS2, 9CS3, 9CB1, 9CB2, 9CB3, 9CB4	1	9CS3	4	<i>Globicatella sanguinis</i>	20 STREP
10	5	10CS1, 10CS2, 10CB1, 10CB2, 10CB3	0	NA	NA	NA	NA
11	1	11CB1	0	NA	NA	NA	NA
12	6	12CB1, 12CS1, 12CS2, 12CS3, 12CS4, 12CS5	2	12CS4	3	<i>Enterococcus faecalis</i>	20 STREP
				12CS5	8	<i>Staphylococcus warneri</i>	STAPH
13	7	13CB1, 13CB2, 13CB3, 13CS1, 13CS2, 13CS3, 13CS4	1	13CS3	5	<i>Escherichia fergusonii</i>	20 E
14	1	14CB1	0	NA	NA	NA	NA
15	3	15CB1, 15CB2, 15CS1	2	15CB1	10	<i>Citrobacter freundii</i>	20 E
				15CB2	3	<i>Enterococcus faecalis</i>	20 STREP

TABLA 17 (Continuación). Aislamiento, purificación, ubicación en grupo morfológico e identificación de cepas de controles.

Control	Número de cepas por control	Clave del número de cepas	Cepas purificadas	Clave de cepas purificadas	Ubicación en grupo morfológico	Identificación	Análisis API
16	9	16CB1, 16CB2, 16CB3, 16CB4, 16CS1, 16CS2, 16CS3, 16CS4, 16CS5	1	16CS3	9	<i>Streptococcus agalactiae</i>	20 STREP
17	4	17CB1, 17CB2, 17CS1, 17CS2	2	17CS1 17CS3	2 4	<i>Staphylococcus auricularis</i> <i>Globicatella sanguinis</i>	STAPH 20 STREP
18	6	18CB1, 18CB2, 18CS1, 18CS2, 18CS3, 18CS4	1	18CS1	2	<i>Staphylococcus auricularis</i>	STAPH
19	1	19CB1	0	NA	NA	NA	NA
20	3	20CB1, 20CB2, 20CS1	1	20CB2	3	<i>Enterococcus faecalis</i>	20 STREP
21	1	21CB1	0	NA	NA	NA	NA
22	1	22CB1	0	NA	NA	NA	NA
23	4	23CB1, 23CB2, 23CB3, 23CB4	0	NA	NA	NA	NA
24	4	24CB1, 24CB2, 24CS1, 24CS2	0	NA	NA	NA	NA
25	10	25CS1, 25CS2, 25CS3, 25CS4, 25CS5, 25CS6, 25CB1, 25CB2, 25CB3, 25CB4	3	25CS1 25CS3 25CS4	7 3 11	<i>Corynebacterium amycolatum</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus capitis</i>	CORYNE 20 STREP STAPH
26	3	26CB1, 26CB2, 26CS1	1	26CB1	12	<i>Brevibacterium epidermidis</i>	CORYNE
27	3	27CS1, 27CS2, 27CB1	0	NA	NA	NA	NA
28	8	28CB1, 28CB2, 28CB3, 28CS1, 28CS2, 28CS3, 28CS4, 28CS5	2	28CB1 28CS2	5 1	<i>Escherichia fergusonii</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	20 E STAPH

TABLA 17 (Continuación). Aislamiento, purificación, ubicación en grupo morfológico e identificación de cepas de controles.

Control	Número de cepas por control	Clave del número de cepas	Cepas purificadas	Clave de cepas purificadas	Ubicación en grupo morfológico	Identificación	Análisis API
29	6	29CS1, 29CS2, 29CS3, 29CS4, 29CB1, 29CB2	0	NA	NA	NA	NA
30	5	30CB1, 30CB2, 30CS1, 30CS2, 30CS3	0	NA	NA	NA	NA
31	3	31CB1, 31CS1, 31CS2	1	31CS1	5	<i>Escherichia fergusonii</i>	20 E
32	1	32CB1	0	NA	NA	NA	NA
33	1	33CB1	0	NA	NA	NA	NA
34	1	34CB1	0	NA	NA	NA	NA
35	2	35CS1, 35CB1	1	35CS1	5	<i>Escherichia fergusonii</i>	20 E
36	2	36CB1, 36CS1	0	NA	NA	NA	NA
37	3	37CS1, 37CS2, 37CB1	0	NA	NA	NA	NA
38	9	38CB1, 38CB2, 38CB3, 38CB4, 38CS1, 38CS2, 38CS3, 38CS4, 38CS5	2	38CB2	3	<i>Enterococcus faecalis</i>	20 STREP
				38CB3	13	<i>Klebsiella oxytoca</i>	20 E
39	1	39CB1	0	NA	NA	NA	NA
40	2	40CB1, 40CB2	0	NA	NA	NA	NA

7.6. DISCUSIÓN.

En el presente estudio se realizó un análisis de 70 cepas bacterianas a partir de muestras cervicovaginales de 40 mujeres con la patología de cáncer cervicouterino y 40 mujeres sin dicha patología; en donde fueron identificadas la presencia de 20 fenotipos correspondientes a especies bacterianas distintas; lo anterior empleando el sistema miniaturizado API, aplicando galerías y análisis de API STAPH, API 20STREP, API 20E, API CORYNE y API 50CHL/B.

A pesar de que la identificación con estudios genéticos y moleculares actualmente ha tomado mayor auge ⁽⁶⁸⁾, la identificación fenotípica aún resulta ser bastante eficaz cuando no se cuenta con la tecnología e infraestructura necesaria en los laboratorios clínicos. Esto queda demostrado con los resultados presentados, donde se puede observar que las pruebas bioquímicas de cada una de las galerías API analizadas para los grupos de estudio de pacientes y controles, fueron suficientes para poder identificar y determinar en forma rápida, sencilla y asequible una amplia diversidad bacteriana.

Ravel *et al.*, 2011, caracterizaron la microbiota vaginal de 396 mujeres norteamericanas asintomáticas de cuatro grupos étnicos y encontraron una gran diversidad de comunidades microbianas, en su mayoría especies de *Lactobacillus* (*L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii*); así como otros grupos taxonómicos bacterianos como *Gardnerella*, *Atopobium*, *Leptotrichia*, *Sneathia* spp. y otros organismos asociados a la vaginosis bacteriana ⁽⁴³⁾. Este hallazgo da pie a las investigaciones actuales, en donde se puede determinar que entre el 20-30% de las mujeres pueden presentar en algún momento una microbiota diversa deficiente o disminuida en especies de lactobacilos, considerada como una microbiota anormal ^(41,42).

En coincidencia con los estudios de Ravel, en el presente estudio se logró caracterizar una diversidad considerable en la microbiota cervicovaginal, sin embargo, se hizo uso de exudados cervicovaginales de mujeres con cáncer cervicouterino y mujeres sin dicha patología, por lo que se identificaron fenotípicamente un total de 20 especies bacterianas. De estas especies, se observó que, fueron 5 las coincidentes para ambos grupos de estudio (pacientes y controles): *Staphylococcus*

epidermidis, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia fergusonii* y *Corynebacterium amycolatum*.

Velázquez *et al.*, 2011, indicaron en sus revisiones que, ante la existencia del CaCu, se modifica el ambiente cervicovaginal al presentar alteraciones y lesiones celulares, lo cual es un factor predisponente para el desarrollo de infecciones recurrentes causadas por la colonización predominante de comunidades bacterianas consideradas como patógenos oportunistas ⁽⁷²⁾.

En concordancia con lo anterior, a pesar de que fueron 40 las cepas que se lograron purificar del grupo de las pacientes, la microbiota cervicovaginal identificada no fue tan diversa en comparación a la microbiota que se identificó en las 30 cepas de las mujeres sin cáncer cervicouterino; es decir, se puede observar que cuanto existió la patología del CaCu, predominaron corinebacterias y estafilococos, mientras que en las mujeres sin CaCu, se lograron identificar variedades de estafilococos, estreptococos, enterococos, aerococos, enteobacterias, paenibacilos, brevibacterias e incluso corinebacterias.

Los resultados del presente estudio también coinciden con lo expuesto por Gajer *et al.*, 2012, y Lewis *et al.*, 2017, quienes indicaron que “cualquier alteración por factores fisiológicos, anatómicos o biológicos en la microbiota vaginal, afecta su equilibrio dinámico ⁽⁵⁸⁾, lo cual desencadenará el desarrollo de una microbiota anormal, representada principalmente por patógenos oportunistas que producirán síntomas y favorecerán el desarrollo de enfermedades ⁽⁵⁹⁾”

Conocer el perfil fenotípico de la microbiota cervicovaginal que acompaña el cáncer cervicouterino puede ser un posible biomarcador para desarrollar futuros estudios enfocados en el desarrollo de técnicas clínicas, diagnósticas y terapéuticas que permitan complementar el entendimiento del proceso salud-enfermedad de las mujeres mexicanas en presencia de esta patología y la dinámica de la microbiota en el desarrollo de infecciones sobreagregadas.

8. CONCLUSIONES GENERALES.

8.1. Conclusiones.

- a) De acuerdo con el perfil fenotípico analizado mediante galerías API, se encontró que la microbiota vaginal de mujeres con y sin cáncer cervicouterino es distinta.
- b) Se identificaron para ambos grupos 20 fenotipos correspondientes a 20 especies bacterianas.
- c) Para el grupo de estudio de pacientes (mujeres con CaCu) conformado por 40 cepas, se identificaron 12 fenotipos, donde 7 fenotipos fueron exclusivos de este grupo con las siguientes especies bacterianas: *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium jeikeium* y *Corynebacterium striatum*.
- d) Para el grupo de estudio de controles (mujeres con CaCu) conformado por 30 cepas, se presentaron 13 fenotipos, donde 8 fenotipos fueron exclusivos de este grupo con las siguientes especies bacterianas: *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Globicatella sanguinis*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Paenibacillus lautus* y *Brevibacterium epidermidis*.
- e) Se encontraron 5 fenotipos que fueron coincidentes para ambos grupos de estudio con las siguientes especies bacterianas: *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia fergusonii* y *Corynebacterium amycolatum*.
- f) La patología del CaCu es factor importante para alterar el equilibrio dinámico de la microbiota vaginal, influyendo en el desarrollo de una microbiota normal para la salud vaginal.
- g) La elección de los sistemas miniaturizados de galerías API, se basó en la caracterización morfológica (macro y microscópicas) y aplicación de pruebas enzimáticas (catalasa y oxidasa). Se observó, que fueron una excelente opción de identificación fenotípica rápida,

sencilla y factible para ser empleadas por laboratorios que no cuentan con tecnología e infraestructura para realizar pruebas de identificación molecular, especialmente si se trata de detectar oportunamente bacterias que pueden influir en el desarrollo de alguna patología o su progresión.

- h) Conocer el perfil fenotípico de la microbiota cervicovaginal que acompaña el CaCu, puede ser un posible biomarcador para desarrollar futuros estudios enfocados en el desarrollo de técnicas clínicas, diagnósticas y terapéuticas que permitan complementar el entendimiento del proceso salud-enfermedad de las mujeres mexicanas en presencia de esta patología y la dinámica de la microbiota en el desarrollo de infecciones sobreagregadas.

8.2. Limitaciones del estudio.

Una de las limitantes del presente, consistió en la base de datos que utiliza el sistema de identificación de API bioMérieux®, puesto que el análisis del perfil numérico generado por las pruebas bioquímicas de las galerías muchas veces puede ser coincidente o similar para dos especies, o bien, no encontrarse actualizada con respecto al constante cambio que se tiene en el campo de la microbiología bacteriana.

8.3. Recomendaciones.

Se sugiere continuar la línea de investigación con relación al tema expuesto, completando la identificación fenotípica de la microbiota vaginal anaeróbica, pues es importante comprender la influencia de esta en el proceso o desarrollo de una patología tan importante como lo es el cáncer cervicouterino.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Parkhurst JO and Vulimiri M. Cervical cancer and the global health agenda: Insights from multiple policy-analysis frameworks. *Global Public Health*. 2013. 8(10): 1093–1108.
2. Globocan. Cervical Cancer. Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Lyon, France: GLOBOCAN 2012. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization, 2012.
3. Tovar V. Panorama epidemiológico de la mortalidad por cáncer cervicouterino en México (1980-2004). *Rev Fac Med UNAM*. 2008; 51(2).
4. INEGI 2012. Estadísticas de mortalidad. Cubos dinámicos y CONAPO 2012. Proyecciones de la población de México 2012–2050.
5. Secretaría de Salud 2017. Subsecretaría de prevención y promoción de la salud Programa de Acción Específico: Prevención y Control del cáncer de la mujer 2013-2018. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/10046/PrevencionyControldelCancerdeLaMujer_2013_2018.pdf y <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/250701/LineamientosCaCu2017.pdf>
6. Organización Mundial de la Salud [Internet]. Ginebra: OMS; 1995-2015 [actualizado 12 Ene 2016; citado 4 Jun 2015]. Cervical Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012; Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp>
7. Organización Panamericana de Salud. Estrategia y plan de acción regional para la prevención y control de cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe. Washington: OPS; 2010.
8. American Joint Committee on Cancer. 7th edition – Cervix Uteri Cancer Staging. Disponible en (Available at): <http://www.cancerstaging.org/staging/posters/cervix24x30.pdf>. Accedido (Accessed): enero 17, 2012.
9. Modificación a la Norma Oficial Mexicana (NOM-014-SSA2-1994) para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cervicouterino. *Diario Oficial*, 2007.
10. Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, et.al. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine*. 2012 Nov 20;30 (Suppl 5): F12-23. doi: 10.1016/j. vaccine.2012.07.055.

11. Insinga RP, Perez G, Wheeler CM, Koutsky LA, Garland SM, Leodolter S, et al. Incident cervical HPV infections in Young women: transition probabilities for CIN and infection clearance. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20, 287–296. Doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0791
12. Jemal, A., Simard, E. P., Dorell, C., Noone, A., Markowitz, L. E., Kohler, B., Edwards, B. K. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2009, featuring the burden and trends in human papillomavirus (HPV) associated cancers and HPV vaccination coverage levels. 2013. *Journal of the National Cancer Institute*, 105, 175–201. Doi:10.1093/jnci/djs491
13. De Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* 2013 445(1-2):2-10. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.023. Epub 2013 May 16.
14. Peralta-Rodríguez R, Romero-Morelos P, Villegas-Ruíz V, Mendoza-Rodríguez M, Taniguchi-Ponciano K, González-Yebra B, et.al. Prevalence of human papillomavirus in the cervical epithelium of Mexican women: meta-analysis. *Infect Agent Cancer*. 2012;7(1):34. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3586354/>
15. Zur Hausen H. The search for infectious causes of human cancers: where and why (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*. 2009;48:5798–808.
16. Godoy VF, Romaguera J. Relación entre las comunidades bacterianas cervicovaginales y el Virus del Papiloma Humano (VPH) en mujeres puertorriqueñas. *Rev Puert MSP*. 2015. 30:1-17.
17. Redinbo MR. The Microbiota, Chemical Symbiosis, and Human Disease. *J. Mol. Biol.*, 2014. 426(23): 3877–3891.
18. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the health human microbiome. *Nature* 2012; 486:207–14
19. Turnbaugh PJ, Ley RE, HamadyM, Fraser-Liggett C, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature* 2007; 449:804–10.
20. Relman DA. The human microbiome and the future of medicine. *JAMA* 2015;314:1127–8.
21. Methe B, Karen N, Mihai P, Heather HC, Mitchell GG, Curtis H, et al. NIH Public Acces. A framework for human microbiome research. *Nature*. 2012. 486:215- 221.
22. Peterson J, Garges S, Giovanni M, et al., NIH HMP Working Group. The NIH human microbiome project. *Genome Res*. 2009(19):2317-2323.

23. Llop HA, Váldez-Dapena VMM, Suazo SJL. Microbiología y parasitología médica. La Habana. Ed. De Ciencias Médicas. 2001. 107-122.
24. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 260-70.
25. Alarcón Cavero T, D'Auria G, Delgado Palacio S, Del Campo Moreno, R, Ferrer Martínez, M. Microbiota. 2016 59. Del Campo Moreno R (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2016.
26. Costello EK. Et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*. 2009. 326: 1694-1697.
27. Gallo RL, Nakatsuji T. Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin. *J Invest Dermatol*. 2011. 131:1974-80.
28. Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. The function of our microbiota: ¿who is out there and what do they do? *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:104.
29. Patiño LA, Morales CA. Skin microbiota: The cutaneous ecosystem. *Rev Asoc Colomb Dermatol*. 2013. 21(2): 47-158.
30. Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simón Soro A. The oral metagenome in health and disease *ISME journal*. 2012 (6):46-56.
31. Segata N, Haake SK, Mannon P, Lemon KP, Waldron L, Gevers D, et al. Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biol*. 2012. 13:R42.
32. Joklik WK, Willett HP, Amos BD, Wilfert CM. Flora normal e infecciones oportunistas. En: Joklik WK, Willett HP, Amos BD, Wilfert CM. *Zinsser Microbiología*. 20ª edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1994. pp. 524-681.
33. Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada K, et al. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature*. 2010. 465:346-9.
34. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011. 473:174-180.

35. Ruiz Alvarez V, Puig Pena Y, Rodríguez Acosta M. Microbiota intestinal, sistema inmune y obesidad. *Revista Cubana Invest Biomed.* 2012;29.
36. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 2012; 489: 220-30.
37. Borchers AT, Selmi C, Meyers FJ, Keen CL, Gershwin ME. Probiotics and immunity. *J Gastroenterol* 2009; 44: 26-46.
38. Bull MJ, Plummer NT. Part 1: The human gut microbiome in health and disease. *Integrative Medicine* 2014; 13:17- 22.
39. Martín R, Soberón N, Vázquez F y Suárez JE. La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26 (3):160-7.
40. Martínez-Peña MD. Microbiota vaginal normal: los Lactobacilos. *Rev Med Lab.* 2012. 4 (1): 17-25
41. Bing M, Forney LJ, Ravel J. Vaginal microbiome: rethinking health and diseases. *Annu Rev Microbiol* 2012;66:371–89.
42. Aldunate M, Srbinovski D, Hearps AC, Latham CF, Ramsland PA, Gugasyan R, et al. Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Front Physiol* 2015;6:164.
43. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R, Russell J, Tacket CO, Brotman RM, Davis CC, Ault K, Peralta L, Forney LJ. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108 (Suppl 1):4680-7.
44. Martín R, Escobedo S, Martín C, Suárez E. La vagina y su microbiota. En: Probióticos, prebióticos y salud: evidencia científica. Eds. Álvarez-Calatayud G, Marcos A, Margolles A. Capítulo 4. Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos (SEPyP). 2016. ISBN: 978-84-16732-09-8.
45. Döderlein A. Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber. *Zentbl Bakteriol Microbiol Hyg Abt.* 1982. 11: 699.
46. Eschenbach, D. A., Davick, P. R., Williams, B. L., Seymour, K. J., Young-Smith, K., Critchlow, C. M., y Holmes, K. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species

- in normal women and women with bacterial vaginosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001. 27:251-256.
47. Pradenas AM. Infecciones cérvico vaginales y embarazo. *Rev. Med. Clin. Condes* 2014 ; 25(6) 925-935.
48. 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.
49. Ángeles-López, M., García-Cano E. y Aquino C. S. Hydrogen peroxide production and resistance to nonoxil in *Lactobacillus* spp. isolated from the vagina of reproductive age women. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2001. 43(4):171-176.
50. Matthew R. Redinbo. The Microbiota, Chemical Symbiosis, and Human Disease. *J. Mol. Biol.*, 2014. 426(23): 3877–3891.
51. Prats G, *Microbiología Clínica*, Editorial Médica Panamericana, Barcelona 2006.
52. Isenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, American Society for Microbiology. Washington dc: ASM Press; 2004. p. 3213.323.
53. Schwebke, J. R. y Weiss, H. Influence of the normal menstrual cycle on vaginal microflora. *Clinical Infectious Diseases*. 2001. 32:325.
54. Fernández-Cid A, Fernández-Cid M. El pH vaginal y su importancia clínica. *Ginecol obstetr clin*. 2004; 5 (2):75-80.
55. Raz R, Gennesin Y, Wasser J, Stoler Z, Rosenfeld S, Rottensterich E, et al. Recurrent urinary tract infections in postmenopausal women. *Clin Infect Dis*. 2000;30:152-6.
56. Watts, DH., Fazarri, M., Minkoff, H., Hillier, S. L., Sha, B., Glesby, M., Levine, A. M., Burk, R., Palefsky, J. M., Moxley, M., Ahdieh-Grant, L. y Strickler, H. D. Effects of Bacterial Vaginosis and Other Genital Infections on the Natural History of Human Papillomavirus Infection in HIV-1-Infected and High-Risk HIV-1-Uninfected Women. *Journal Infection Disease*. 2005. 191(7):1129-1139.
57. Fernández-Cid A, Fernández-Cid M. El pH vaginal y su importancia clínica. *Ginecol obstetr clin*. 2004; 5 (2):75-80.

58. Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schütte UM, Zhong X, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med* 2012;4(132):132ra52.
doi:10.1126/scitranslmed.3003605
59. Lewis FMT, Bernstein KT, Aral SO. El microbioma vaginal y su relación con el comportamiento, la salud sexual y las enfermedades de transmisión sexual. *Obstet Gynecol* 2017;129:643–54.
60. Ghosh SK, Choudhury B, Hansa J, Mondal R, Singh M, Singh M, Duttagupta S, Das A, Kumar R, Laskar RS, Kannan R, Ghosh PR. Human Papillomavirus Testing for Suspected Cervical Cancer Patients from Southern Assam by Fast-PCR. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(3):749-51.
61. Dols JA, Reid G, Brown JM, Tempelman H, Bontekoe TR, Quint WG, Boon ME. HPV Type Distribution and cervical cytology among HIV-Positive Tanzanian and South African Women. *ISRN Obstetrics and Gynecology*. 2012; 2012:514146. doi:10.5402/2012/514146.
62. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV and cervical cancer. *J Gynecol Oncol*. 2008; 110 (3):4-7
63. Bou G., Fernández-Olmos AF., García C., Sáenz-Nieto JA y Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(8):601–608. doi:10.1016/j.eimc.2011.03.012.
64. Barrow G I, Cowan ST. Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. 3ª. 2004. Cambridge Univ. Press.
65. McFaddin JF. Biochemical test for identification of medical bacteria. 3ª. Ed. Filadelfia: Lippincot Williams & Wilkins; 2000.
66. Gobernado M, López-Hontangas JL. Identificación bacteriana. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003; 21 (Supl 2):54-60.
67. García-Mazcorro JF., Garza-González E., Marroquín-Cardona AG y Tamayo JL. Caracterización, influencia y manipulación de la microbiota gastrointestinal en salud y enfermedad. *Gastroenterol Hepatol*. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gastrohep.2015.01.004>
68. Flores AA, Ramírez AR, Salazar AM, Salgado R. Evaluación del diagnóstico de laboratorio manual y automatizado de infecciones vaginales. *Investigación Disciplinaria Multidisciplinaria. Ciencia y Tecnología*. 2010. Año 9. Número 9.

69. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Microbiología médica. 4ª ed. España: Mosby Elsevier Science; 2002. p. 153-170.
70. Velasco J, Araque MA, Araujo E, Longa A, Nieves B, Ramírez AC, Sánchez K, Velasco E. Manual práctico de bacteriología clínica. Venezuela: Editorial Venezolana C. A. 2008. p. 18-23.
71. 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.
72. Velázquez E., Peix A y Gómez-Alonso A. Microorganismos y cáncer: evidencias científicas y nuevas hipótesis. *Cir Esp.* 2011; 89(3) :136–144

10. ANEXOS.

10.1. Consentimiento informado para pacientes o grupo de Estudio



1. Datos generales

Investigador principal.

Nombre: Jaime Alberto Coronel Martínez

Teléfono: 56280400

Correo electrónico: quiehc8@hotmail.com

Título del proyecto: **“COMPARACIÓN DEL PERFIL FENOTÍPICO DE LA MICROBIOTA VAGINAL DE MUJERES CON Y SIN CÁNCER CÉRVICOUTERINO.”**

Versión del consentimiento:

Sitio donde se realizará: Instituto Nacional de Cancerología.

2. Participación voluntaria

Su médico le ha diagnosticado cáncer cervico-uterino, por lo que le estamos invitando a participar en una investigación para evaluar la microbiota vaginal mediante la obtención de una muestra de exudado vaginal. Para este estudio se espera que participen 50 personas con diagnóstico similar a usted. **SU PARTICIPACION ES ABSOLUTAMENTE VOLUNTARIA Y USTED PUEDE ABANDONAR EL ESTUDIO EN EL MOMENTO QUE LO DESEE SIN AFECTAR SU ATENCIÓN MEDICA NI CUALQUIERA DE LOS DERECHOS QUE USTED TIENE COMO PACIENTE EN EL CASO DE QUE USTED NO DESEE PARTICIPAR O DESEE ABANDONAR EL ESTUDIO.**

3. Información para el paciente sobre la justificación y objetivos del procedimiento

Le invitamos a que participe en un estudio de investigación, para evaluar, si pacientes con el tipo de cáncer que usted tiene pudieran tener una microbiota vaginal diferente a las mujeres sanas. **SU PARTICIPACION ES ABSOLUTAMENTE VOLUNTARIA Y NO AFECTARA SU ATENCION MEDICA.**

4. Datos propios del procedimiento

Si usted acepta participar y una vez que firme el consentimiento y se confirme que pueda participar en el estudio, antes de iniciar el tratamiento, se le tomará una muestra de exudado vaginal. Una vez realizada esta prueba, usted recibirá su tratamiento. Usted será valorado por un médico cada semana. En la consulta se le tomara una muestra de exudado vaginal al inicio de su tratamiento, a la mitad y al final del mismo. **La toma de muestra de exudado vaginal es segura, para realizarla se le colocara en posición ginecológica, con la ayuda de un espejo se expondrá su cuello vaginal para que mediante un isopo especial sea tomada una muestra del exudado vaginal. El tiempo de realización de la toma de muestra es de 10-15 minutos.**

5. Beneficios

Si usted acepta participar no obtendrá un beneficio directo de los resultados de este estudio. La información obtenida en este estudio podría ayudarnos en el futuro a mejorar el control de su enfermedad para otros pacientes.

6. Riesgos

Es esperable que usted tenga las molestias propias de la toma de muestra: dolor local y probable sangrado.

7. Procedimientos Alternativos

Su participación en este estudio es completamente voluntaria, si decide no participar en el estudio será tratado de forma convencional.

8. Responsabilidad del paciente

Al aceptar participar en este estudio usted se compromete a asistir a sus consultas en las fechas que se le indiquen, y si usted se muda o no regresa al Instituto, se le podrá llamar o buscar y averiguar cómo se encuentra de salud. Así mismo se compromete a aceptar la realización de algunas preguntas sobre usted y sus hábitos, y la realización de pruebas incluyendo la toma de muestra de exudado vaginal.

9. Confidencialidad

Sólo su doctor y sus colaboradores sabrán que usted está participando en el estudio. Los registros que se hagan se harán identificándolo sólo con un código y no con el nombre; sin embargo, personal autorizado podrán revisar su expediente clínico como parte de su actividad de supervisión del estudio. Si los resultados de este estudio son publicados, usted no será identificado por el nombre.

10. Compensación

Usted no recibirá remuneración alguna por su participación. Usted entiende que su participación en el estudio es voluntaria.

11. Terminación del estudio

En cualquier momento usted puede retirar su consentimiento a participar en el estudio, sin que su tratamiento médico posterior se vea afectado. Su médico también podrá detener el estudio por razones médicas u otras razones.

12. Personas a contactar

EN CASO DE DUDAS SOBRE SU PARTICIPACION EN ESTE ESTUDIO, PODRA CONTACTAR AL INVESTIGADOR PRINCIPAL, Dr. Jaime Alberto Coronel Martínez, al tel: 562800400 Ext. EN CASO DE DUDAS SOBRE SUS DERECHOS COMO PACIENTE QUE PARTICIPA EN UN ESTUDIO CLINICO, CONTACTAR AL PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ETICA: Dra. Myrna Candelaria Hernández, al teléfono 56280400, Ext:338.

13. Firmas:

Yo _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos, por lo que acepto participar en el estudio:” Estudio comparativo presente en mujeres con cáncer cervicouterino atendidas en el INCAN y en mujeres sanas”. Así mismo, he recibido una copia de este consentimiento informado.

NOMBRE DEL PARTICIPANTE _____

Firma _____

Fecha _____ Teléfono _____

Dirección _____

NOMBRE DEL TESTIGO 1 _____

Firma _____

Fecha _____ Teléfono _____

Dirección _____

Parentesco con el paciente _____

NOMBRE DEL TESTIGO 2 _____

Firma _____

Fecha _____ Teléfono _____

Dirección _____

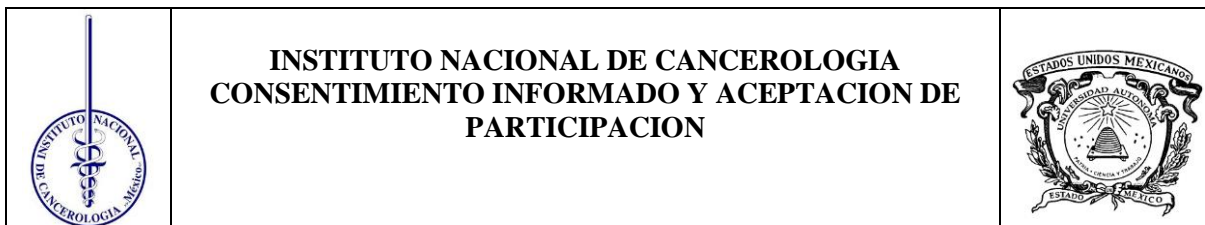
Parentesco con el paciente _____

NOMBRE Y FIRMA DE QUIEN TOMA EL CONSENTIMIENTO

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR

11.2. Consentimiento informado para grupo Control



1. Datos generales

Investigador principal:

Nombre: Jaime Alberto Coronel Martínez

Teléfono: 56280400 Ext

Correo electrónico: quiehc8@hotmail.com

Título del proyecto: **“COMPARACIÓN DEL PERFIL FENOTÍPICO DE LA MICROBIOTA VAGINAL DE MUJERES CON Y SIN CÁNCER CÉRVICOUTERINO.”**

Versión del consentimiento:

Sitio donde se realizará: Instituto Nacional de Cancerología.

2. Participación voluntaria

Le estamos invitando a participar en un estudio de investigación para evaluar la microbiota vaginal mediante la obtención de una muestra de exudado vaginal. Para este estudio se espera que participen 50 personas sanas y 50 personas con cáncer cervico-uterino. **SU PARTICIPACION ES ABSOLUTAMENTE VOLUNTARIA Y USTED PUEDE ABANDONAR EL ESTUDIO EN EL MOMENTO QUE LO DESEE SIN AFECTARSE EN EL CASO DE QUE USTED NO DESEE PARTICIPAR O DESEE ABANDONAR EL ESTUDIO.**

3. Información para el paciente sobre la justificación y objetivos del procedimiento

Le invitamos a que participe en un estudio de investigación, para evaluar, si mujeres sanas como usted tiene pudieran tener una microbiota vaginal diferente a las mujeres con cáncer cervico-uterino. **SU PARTICIPACION ES ABSOLUTAMENTE VOLUNTARIA.**

4. Datos propios del procedimiento

Si usted acepta participar y una vez que firme el consentimiento y se confirme que pueda participar en el estudio, se le tomará una muestra de exudado vaginal. Una vez realizada esta prueba, una vez realizada la toma de muestra usted podrá realizar sus actividades cotidianas. **La toma de muestra de exudado vaginal es segura, para realizarla se le colocara en posición ginecológica, con la ayuda de un especulo se expondrá su cuello vaginal para que mediante un hisopo especial sea tomada una muestra del exudado vaginal. El tiempo de realización de la toma de muestra es de 10-15 minutos.**

5. Beneficios

Si usted acepta participar no obtendrá un beneficio directo de los resultados de este estudio. La información obtenida en este estudio podría ayudarnos en el futuro a mejorar el control de pacientes con Cáncer cervicouterino.

6. Riesgos

Es esperable que usted tenga las molestias propias de la toma de muestra: dolor local y probable sangrado.

7. Procedimientos Alternativos

Su participación en este estudio es completamente voluntaria, si decide no participar en el estudio no tendrá ninguna repercusión.

8. Responsabilidad del paciente

Al aceptar participar en este estudio usted se compromete a aceptar la realización de algunas preguntas sobre usted y sus hábitos, y la realización de pruebas incluyendo la toma de muestra de exudado vaginal.

9. Confidencialidad

Sólo su doctor y sus colaboradores sabrán que usted está participando en el estudio. Los registros que se hagan se harán identificándolo sólo con un código y no con el nombre; sin embargo, personal autorizados podrán revisar su expediente clínico como parte de su actividad de supervisión del estudio. Si los resultados de este estudio son publicados, usted no será identificado por el nombre.

10. Compensación

Usted no recibirá remuneración alguna por su participación. Usted entiende que su participación en el estudio es voluntaria.

11. Terminación del estudio

En cualquier momento usted puede retirar su consentimiento a participar en el estudio, sin verse afectada.

12. Personas a contactar

EN CASO DE DUDAS SOBRE SU PARTICIPACION EN ESTE ESTUDIO, PODRA CONTACTAR AL INVESTIGADOR PRINCIPAL, Dr. Jaime Alberto Coronel Martínez, al tel: 562800400 Ext. EN CASO DE DUDAS SOBRE SUS DERECHOS COMO PACIENTE QUE PARTICIPA EN UN ESTUDIO CLINICO, CONTACTAR AL PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ETICA: Dra. Myrna Candelaria Hernández, al teléfono 56280400,Ext:338.

13. Firmas

Yo _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos, por lo que acepto participar en el estudio:” Estudio comparativo presente en mujeres con cáncer cervicouterino atendidas en el INCAN y en mujeres sanas”. Así mismo, he recibido una copia de este consentimiento informado.

NOMBRE DEL PARTICIPANTE _____

Firma _____

Fecha _____ Teléfono _____

Dirección _____

NOMBRE DEL TESTIGO 1 _____

Firma _____

Fecha _____ Teléfono _____

Dirección _____

Parentesco con el paciente _____

NOMBRE DEL TESTIGO 2 _____

Firma _____

Fecha _____ Teléfono _____

Dirección _____

Parentesco con el paciente _____



NOMBRE Y FIRMA DEL QUIEN TOMA EL CONSENTIMIENTO

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR

10.2. Cuestionario de datos sociodemográficos y gineco-obstétricos

	INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA HOJA DE RECOLECCION DE DATOS “COMPARACIÓN DEL PERFIL FENOTÍPICO DE LA MICROBIOTA VAGINAL DE MUJERES CON Y SIN CÁNCER CÉRVICOUTERINO.”	
---	---	---

Número de Identificación: _____.

Edad: _____. Escolaridad: _____.

Ocupación: _____. Estado Civil: _____.

Originaria: _____. Residencia actual: _____.

Tabaquismo: Si _____. No _____. Frecuencia: _____ años. Estatus actual: _____.

Alcoholismo: Si _____. No _____. Frecuencia: _____ años. Estatus actual: _____.

Infecciones previas (Máximo 3 meses): _____.

Tratamiento utilizado: _____.

Dosis: _____. Días de tratamiento: _____.

Flujo vaginal: Si _____. No: _____. Tiempo de aparición: _____.

Metrorragia: Si _____. No: _____. Tiempo de aparición: _____.

Dispareunia: Si _____. No: _____. Tiempo de aparición: _____.

Hemorragia Postcoital: Si _____. No: _____. Tiempo de aparición: _____.

Numero de apósitos o toallas utilizadas durante el día: _____.

Menarca: _____. Ciclos: _____. IVSA: _____ Menopausia: _____

Número de parejas sexuales: _____.

Gestas: _____. Partos: _____. Cesáreas: _____. Abortos: _____.

Nacidos vivos: _____. Nacidos muertos: _____.

Complicaciones durante el embarazo: _____.

Citologías realizadas: Si _____. No _____. Fecha: ____/____/____:

MPF: Si _____. No: _____. Especifique: _____. Duración: _____ años.

Número de parejas sexuales:_____.

Gestas:_____. Partos:_____. Cesáreas:_____. Abortos:_____.

Nacidos vivos:_____. Nacidos muertos:_____.

Complicaciones durante el embarazo:_____.

Citologías realizadas: Si_____. No_____. Fecha: ____/____/____:

MPF: Si_____. No:_____. Especifique:_____. Duración:_____años.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA
AVENIDA SAN FERNANDO 22, CIUDAD DE MÉXICO, CP 14080 TELEFONO 562804