

TÍTULO DEL PROYECTO

Evaluación de cultivos de Lactobacillus para recolonización de la microbiota vaginal de mujeres con vaginosis bacteriana en Trujillo-Perú

SIGLAS

ELRVB

TIPO DE PROYECTO

Aplicada

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

Microbiología molecular y biotecnología

DURACIÓN ESTIMADA

Fecha de inicio: 04/04/2016 Fecha de término: 30/03/2017

PARTICIPANTES

- GONZALEZ CABEZA JOSE GUILLERMO (DOCENTE) — 000048718
- REYNA LOPEZ LENNIS ANTONIO (DOCENTE) — 000070550
- GOMEZ CASTRO KELLYN MYLUSKA (COORDINADOR(INV. PRINCIPAL)) — 000076554
- TERAN ROJAS YONY ALEXANDER (TECNICO) — 000070981
- ARAUJO JIMENEZ ARMANDO (DOCENTE) — 000042098
- AVILA VEREAU ELIO FERNANDO (DOCENTE) — 000064893
- GUEVARA YUPANQUI KAREN ESTRELLA (ESTUDIANTE) — 000097235
- ABANTO DIAZ CARLOS EDUARDO (DOCENTE) — 000142091

INSTITUCIÓN O LUGAR A EJECUCARSE

- UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO - UPAO (LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR)

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La microbiota vaginal humana puede cambiar en composición rápidamente, entre más de 50 especies, y se forma mayormente por el ascenso de microbios, a lo largo del periné, del recto a la vagina. Las cantidades y tipos de microorganismos fluctúan con los niveles hormonales, contacto sexual, duchas vaginales y dieta; sin embargo, la composición básica es relativamente simple, con lactobacilos (LB) dominantes en mujeres saludables (Hurtado, 2011).

Entre las principales funciones que se le atribuyen a los lactobacilos están: la producción de ácido láctico que acidifica el mucus vaginal (favoreciendo su propio crecimiento) y la producción de bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, bisurfactantes, ácidos orgánicos y otros compuestos, que le permiten competir exitosamente por espacio, nutrientes y receptores con otros microorganismos. La pérdida de la capacidad de los lactobacilos de realizar eficientemente estas funciones, principalmente la producción de peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos, está estrechamente

relacionada con la proliferación de bacterias encontradas en la vagina de pacientes con la Vaginosis Bacteriana (VB) (Martinez, 2013).

La VB es considerada como la alteración de la flora vaginal bacteriana normal donde hay una reducción de los lactobacilos productores de peróxido de hidrógeno y un incremento de prevalencia y concentración de *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis* y los anaerobios: *Mobiluncus sp*, *Prevotella sp*, *Bacteroides sp.* y *Pepto estreptococo* (Aleman & cols., 2010). La VB es la causa más común de infección vaginal en mujeres en edad reproductiva y hasta un 50% de las pacientes pueden cursar asintomáticas (Medina, 1999).

El tratamiento antimicrobiano de estas infecciones no siempre es efectivo por tanto, los problemas permanecen, debido a la resistencia de bacterias y levaduras, infecciones recurrentes, así como a efectos colaterales. Se asume que las recurrencias se deben a la falla de los antimicrobianos en eliminar a los patógenos, quizá por la resistencia, por biopelículas, o porque los organismos virulentos regresan desde sus fuentes (el intestino de la persona, o su pareja sexual) y atacan al huésped cuyas defensas no son óptimas. Las mujeres jóvenes que sufren de Infecciones del Tracto Urinario (ITU) son más proclives a tener episodios repetidos en la adultez y, en general muchas pacientes tendrán recurrencia con ITU, VB y vaginitis por levaduras (Aleman & cols., 2010).

La ruta de inoculación de los lactobacilos probióticos ha sido intuitivamente la vía de instalación directa en la vagina. Por ejemplo, la aplicación semanal de *L. rhamnosus* GR-1 y *L. fermentum* B-54 ha mostrado reducir las ITUs recurrentes en un rango de 6 a 1.6 por año (Falagas, 2007). La capacidad de una cepa de lactobacilos para adherirse a las células vaginales fue considerada una ventaja en la población temporal de la vagina que crea un ambiente propicio para la restauración de los lactobacilos nativos del huésped antes que el retorno de los patógenos. La adhesión de los lactobacilos al uroepitelio varía entre las especies y cepas, como lo demuestran los estudios *in vitro*, y muchos pueden ser mediados por adhesinas glicoproteicas y glúcidas que se unen a los receptores glucolípidos (Martin, 2008).

El concepto de suministrar los lactobacilos oralmente para repoblar la vagina fue por primera vez reportado en el 2001, los organismos fueron suministrados en una base de leche y se demostró su recuperación rectal: por lo tanto las cepas ingestadas podían pasar a través del intestino, alcanzar el recto, y potencialmente ascender a la vagina. Esto fue confirmado por otros investigadores de forma independiente.

Ante esto surge la siguiente interrogante: ¿Cuál es el cultivo de *Lactobacillus spp.* con potencial probiotico, aislado de mujeres sanas y que favorezca la recolonización de microbiota vaginal de mujeres con vaginosis bacteriana en los Distritos del Porvenir, la Esperanza, Florencia de Mora y Moche durante los meses de Julio y Octubre del 2016?

II. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

La vagina representa un ecosistema dinámico que permanece en equilibrio gracias a una fina interacción de factores tales como la flora normal bacteriana (Ángeles, López y cols., 2001). La flora normal vaginal está constituida en un 96 % por especies de *Lactobacillus*, micoplasmas y únicamente el 4 % por bacterias aeróbicas potencialmente patógenas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococos* del grupo B y *Escherichia coli*) (Eschenbach, 2001).

Estudios basados en cultivos de bacterias, seguidos de tipificación molecular, han mostrado que *Lactobacillus crispatus* y *L. jensenni* son los organismos predominantes en la mayoría de las mujeres sanas premenopáusicas (Antonio y col., 1999). Un análisis de la microflora vaginal en el curso del ciclo menstrual han mostrado que el 22 % de las mujeres mantienen una flora bacteriana estable en la que predominan los lactobacilos, en tanto que el 78 % sufren una alteración de la flora. La receptividad de las células epiteliales a la adherencia de los lactobacilos aumenta en el pico de estrógenos a mitad del ciclo, aunque aún no se conoce con exactitud los factores que causan tal alteración (Schwebke y Weiss, 2001).

El estrógeno producido durante la menarquia causa adelgazamiento de la mucosa vaginal y un aumento de la producción de glucógeno, lo que permite la proliferación de lactobacilos, que predominarán en la microbiota vaginal de la mujer fértil. El número de bacterias aisladas de la secreción vaginal en mujeres fértiles oscila entre 10^7 y 10^8 unidades formadoras de colonias por gramo de fluido (UFC/g). En la menopausia, la flora normal que hasta ese momento había estado dominada por lactobacilos, es reemplazada por una microbiota mixta, con concentraciones moderadas de *Mycoplasma*, y pequeñas cantidades de bacterias anaerobias, incluida *Gardnerella vaginalis* (*G. vaginalis*).

Muchos de los estudios sobre la composición de la flora normal de la vagina humana se basan en métodos fenotípicos, que muchas veces resulta en una clasificación taxonómica incorrecta. Además, muchos de los microorganismos de esta localización no son cultivables, por lo que solo pueden ser identificados empleando métodos de biología molecular. La mayoría de los especialistas en taxonomía recomiendan el empleo conjunto de métodos fenotípicos y de biología molecular (como la identificación del gen de ARN ribosomal de 16S) para estudios de identificación de microorganismos.

Después de la menopausia, el 25 - 30% de mujeres aún tiene lactobacilos vaginales, los que pueden aumentar entre el 60 y 90% mediante una terapia de reemplazo con estrógenos por vía oral o vaginal. Por lo tanto, el riesgo de infecciones del tracto urogenital aumenta con la edad y disminuye con la terapia antes mencionada (Reid y col., 2004).

Cuando se altera el balance de la flora vaginal, los microorganismos endógenos potencialmente patógenos que son parte de la flora normal (*Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* y bacterias

anaerobias) proliferan a una concentración que produce síntomas. También pueden favorecer la infección de los microorganismos patógenos transmitidos sexualmente tales como *Trichomonas vaginalis*, *N. gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis* (Eschenbach, 2001).

La interacción in vitro de *T. vaginalis* con diferentes especies de lactobacilos es capaz de modificar la virulencia del parásito (Gamiño Arroyo y cols., 2004). La infección por *T. vaginalis* incrementa el riesgo de adquisición o reactivación del virus del papiloma humano (VPH) y es un cofactor importante para amplificar la transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), en donde un microambiente cervicovaginal alterado juega un papel importante en la susceptibilidad a la infección (Sorvillo y col., 2002; Watts y col., 2005).

Diversos estudios han demostrado que la ausencia o disminución de los lactobacilos, asociado con un mayor crecimiento de patógenos anaerobios causantes de vaginitis bacteriana, resulta en un incremento significativo en el riesgo de infección por el, virus del herpes simple, *N. gonorrhoeae* o *Chlamydia*. Las bacterias patógenas desplazan a los lactobacilos, elevando el pH y creando un ambiente, en el cual, los patógenos pueden sobrevivir e infectar al huésped (Reid y col., 2004).

Los niveles de estrógeno son importantes en la regulación de la flora vaginal ya que estimula la secreción de glucógeno (Larsen, 1993). Muchos estudios confirman que las células de la vagina son ricas en glucógeno y algunas cepas de *Lactobacillus* son capaces de fermentar directamente el glucógeno e incrementar la acidez de la vagina.

Los probióticos son “microorganismos vivos que cuando son administrados en las cantidades adecuadas, confieren un beneficio saludable sobre la salud del huésped, o su fisiología”. Actualmente hay un creciente interés en la utilización de los Lactobacilos como probióticos vaginales humanos. Estas bioterapias serían una alternativa eficaz al tratamiento convencional con antibacterianos contra patógenos que ya han desarrollado resistencia, con la ventaja de ser administrado durante el embarazo sin ningún riesgo, pues se ha observado, al menos en ratones hembras, que no produce efectos adversos, ni modificaciones estructurales o ultra estructurales en la vagina.

El ácido láctico producido por los *Lactobacillus spp.* ha sido ampliamente considerado como el factor que predomina en el ecosistema vaginal; sin embargo, datos recientes sugieren que puede ser la producción de H_2O_2 y que mujeres que tienen en la flora vaginal, *Lactobacillus* productores de H_2O_2 son más propensas a mantener una microbiota vaginal normal que las mujeres con *Lactobacillus* no productores de H_2O_2 . Las especies de *Lactobacillus* facultativas, producen grandes cantidades de peróxido de hidrógeno, mientras que las anaerobias no.

La producción de H_2O_2 está fuertemente ligada con las especies y es un predictor para la colonización sostenida a largo plazo de la vagina. En mujeres monitoreadas durante 8 meses, el 96% de quienes mantuvieron colonización por *Lactobacillus spp.* fueron colonizadas por cepas productoras de H_2O_2 de *Lactobacillus crispatus* o *L. jensenii*. En contraste, el 5% de mujeres

permaneció colonizada por cepas de lactobacilos no productoras de H_2O_2 .

Hurtado y Benites (2011) estudiaron el “Efecto de la recolonización vaginal por *Lactobacillus* sp. probiótico potencial en mujeres con vaginosis bacteriana”; y encontraron que *Lactobacillus paracasei* LCR 1289 es una cepa seleccionada de vagina humana por su potencial probiótico capaz de inhibir a *Staphylococcus aureus* in vitro debido al H_2O_2 producido, por su adherencia a las células epiteliales vaginales y la competencia por receptores específicos de la exclusión.

Redondo et al. (1990) realizaron un estudio comparativo de la microflora urogenital de mujeres en buenas condiciones de salud y de mujeres con infecciones urinarias o vaginales y demostraron que los episodios infecciosos se asocian a una disminución importante, o hasta desaparición, de los lactobacilos endógenos. Debido a esto, se evidencia que los lactobacilos endógenos representan, en la prevención de las infecciones urogenitales, un papel similar al que tienen en el intestino.

III. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO (IMPORTANCIA, BENEFICIARIOS, RESULTADOS ESPERADOS)

Uno de los desafíos que presenta la Biotecnología, es la búsqueda de alternativas al uso de los antibióticos mediante sustancias naturales que disminuyan las infecciones que se presentan en el tracto urogenital provocados por bacterias patógenas. Sin duda, la situación que se ha creado entre los antibióticos y las bacterias debido a los problemas de resistencia entre ellos constituye una frontera a solucionar. Esto demuestra que la búsqueda de compuestos a partir de microorganismos continúa siendo la principal fuente de nuevos antimicrobianos.

La flora microbiana normal de la vagina juega un papel importante en la prevención de infecciones en el tracto genital y urinario en mujeres. Las bacterias ácido lácticas son dominantes del tracto vaginal en mujeres saludables, específicamente los lactobacilos. Estos forman una barrera que protege la colonización de patógenos por distintos mecanismos y han sido enfocados para tratar pacientes con infecciones del tracto urogenital, vaginosis bacteriana (VB) y otro grupo de infecciones genitales, excluyendo candidiasis. Sistemáticamente, los lactobacilos no han sido asociados con daños y por ende son considerados como miembros no patógenos de la flora intestinal y urogenital. Más recientemente, el uso de probióticos y lactobacilos reciben mayor atención como una alternativa natural para restaurar y mantener la salud.

En mujeres sanas, la microflora vaginal está dominada por especies de Lactobacilos, con un nivel de $10^7 - 10^8$ UFC/g de líquido, que ejercen una influencia significativa sobre la microbiología del ecosistema; los LB autóctonos previenen el sobrecrecimiento e invasión de bacterias patógenas por una combinación de mecanismos como: exclusión, competencia por nutrientes y liberación de sustancias antimicrobianas, tales como el peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos, bacteriocinas, y biosurfactantes.

Una de las causas de la VB recurrente es la eliminación de los organismos comensales en la vagina por el antimicrobiano, de ese modo se incrementa la recolonización por patógenos. Esta es una de las principales razones para considerar el uso de probióticos para reponer a los microbios comensales como una manera de disminuir el riesgo de reinfección. Existe una tendencia mundial en el empleo de productos probióticos con resultados altamente satisfactorios para la salud humana.

Evidencias científicas, demuestran la efectividad de la administración de probióticos frente a situaciones clínicas o infecciones en el tracto urogenital. Su aplicación, particularmente como bioterapéuticos, ha alcanzado gran interés para diseñar productos farmacéuticos a base de microorganismos. Esto hace sumamente atractiva la búsqueda de productos naturales viables empleando la terapia con probióticos, definida como preparaciones con microorganismos vivos usadas intravaginalmente para prevenir infecciones y restaurar el balance ecológico microbiano afectado o desequilibrado. Dicha terapia se considera natural y sin efectos colaterales en contraste con los tratamientos farmacéuticos convencionales.

Para desarrollar una formulación de probióticos para el tratamiento y la prevención no sólo de la VB sino también de otras infecciones del tracto urogenital, la presente investigación pretende obtener y evaluar aislamientos vaginales de *Lactobacillus sp.* productores de H_2O_2 a los cuales se caracterizará microbiológica y molecularmente a fin de proponer terapias alternativas con preparados de lactobacilos probióticos aplicados en mujeres con infecciones vaginales en la Región la Libertad.

La selección de cultivos de Lactobacilos con capacidad probiótica conllevará a contribuir en la formación de una colección de cepas en el laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, y a partir de ahí utilizar estos cultivos para manipulación genética y/o utilizar para futuras investigaciones.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general (Propósito del proyecto)	Resultados finales	Medios de verificación
Evaluar el efecto de cultivos de <i>Lactobacillus sp</i> con potencial probiótico en la recolonización	Obtención de biomasa de cultivos de <i>Lactobacillus</i> con potencial probiotico y con la capacidad de recolonizar la flora vaginal de mujeres con	Observación microscópica de bacilos Gram positivos, apartir de cultivo de <i>Lactobacillus</i> . Observación macroscopica de

de la microbiota vaginal de mujeres con vaginosis bacteriana.

vaginosis bacteriana.

colonias de *Lactobacillus* en Agar Man Rogosa.

Pruebas bioquímicas y moleculares

Reconocimiento mediante el score de Nugent (score 0) de recolonización de la flora vaginal, luego del tratamiento con los preparados de *Lactobacillus sp.* en mujeres que sufrieron de vaginosis bacteriana.

Objetivos específicos

Resultados intermedios:

Medios de verificación

(Componentes)

- Aislar cultivos de *Lactobacillus spp.* a partir de flora vaginal de mujeres sanas de la sierra liberteña.

- Identificar y caracterizar

Obtención de cultivos de *Lactobacillus* a partir de flora vaginal de mujeres sanas.

Observación microscópica de bacilos Gram positivos, a partir de cultivo de *Lactobacillus*.

Observación macroscópica de colonias de *Lactobacillus* en

cultivos de *Lactobacillus* a partir
de flora vaginal de mujeres
sanas de la sierra liberteña

Agar Man Rogosa.

Cultivos de *Lactobacillus* con
actividad antagónica.

Pruebas bioquímicas y
moleculares para la
identificación de cultivos de
Lactobacillus spp.

Prueba para medir la capacidad
antagónica.

V. MARCO TEÓRICO

La microbiota vaginal humana puede cambiar su composición, por razones no totalmente claras, en más de 50 especies, y se forma mayormente por el ascenso de microbios, a lo largo del periné, del recto a la vagina. Las cantidades y tipos de microbios fluctúan con los niveles hormonales, contacto sexual, duchas vaginales y dieta; sin embargo, la composición básica es relativamente simple, con LB dominantes en mujeres saludables.

Los lactobacilos vaginales fueron reportados por primera vez en 1892 por el ginecólogo alemán Albert Döderlein, por lo que fueron conocidos por mucho tiempo como bacilos de Döderlein. Los lactobacilos de la vagina utilizan el glucógeno producido por las células epiteliales vaginales como sustrato para realizar su metabolismo.

El género *Lactobacillus* son bacilos grampositivos, no esporulados, catalasa y oxidasa negativo, no reducen nitrato, no producen indol ni H₂S, no licuan la gelatina. La mayoría son homofermentativas, es decir forman ácido láctico a partir de glucosa como producto final de fermentación, están ampliamente distribuidos en la naturaleza y en los humanos habitan como componentes importantes de la flora autóctona: en la vagina, tracto gastrointestinal y orofaringe. El término “Bacilo de Döderlein” incluye a cepas vaginales humanas de *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermenti*, *L. celobiosus* y *Leuconostoc mesenteroides*.

Se ha observado que dos cepas de lactobacilos, GG (ATCC 53103) y GR-1 son efectivas para la colonización y protección del tracto intestinal y urogenital contra infecciones microbiales. Las infecciones del tracto urogenital de origen bacteriano tienen una alta incidencia entre la población femenina mundial en edad reproductiva. Un sin número de estas enfermedades, como la VB son causados a menudo por múltiples agentes patógenos, tales como *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* y *Bacteroides spp.*, *Peptococcus*, *Peptoestreptococcus*, *Prevotella*, *Mycoplasma hominis* etc.

Las vías de administración de los probióticos vaginales son la oral y la vaginal. En el primer caso, suelen usarse cápsulas y en el segundo óvulos, aunque recientemente se han comercializado tampones en cuyo interior se encuentran los lactobacilos. Independientemente del tipo de presentación, las bacterias se suministran como cultivos refrigerados o liofilizados. Los primeros aseguran un inicio de actividad casi inmediato, pero su viabilidad depende de un mantenimiento adecuado de la cadena de frío hasta su utilización por la paciente; los liofilizados requieren de unas horas para rehidratarse e iniciar la colonización. Sin embargo, no son dependientes de condiciones de conservación especiales por cuanto pueden permanecer a temperatura ambiente durante periodos limitados de tiempo, sin pérdida de viabilidad.

Habitualmente, por vía vaginal se instalan 10^8 bacterias viables/día durante 5 %u2010 10 días. La vía oral requiere dosis de 10^9 bacterias/día durante 15 – 30 días, debido a que tendrán que soportar el efecto antimicrobiano de la acidez estomacal y de la bilis y a que la colonización de la mucosa vaginal es indirecta. Como ya se indicó, en el caso de una infección activa, la administración se iniciaría después del tratamiento antibiótico.

Los lactobacilos tienen un poder patogénico nulo, de hecho y como se indicó anteriormente, se les considera organismos GRAS por la FDA y QPS por la EFSA. En pacientes terminales o con enfermedades muy graves existe el riesgo de que puedan penetrar en el medio interno y producir bacteriemia e incluso endocarditis. Estos cuadros se han asociado principalmente con *L. rhamnosus*, posiblemente porque es uno de los más utilizados como probiótico digestivo y tiene así la probabilidad de invadir el medio interno. De todas maneras, no existen descripciones de infección oportunista causada por lactobacilos durante su utilización como probióticos vaginales.

VI. HIPÓTESIS

Implícita

VII. METODOLOGÍA

Universo muestral

Estará conformado por todas las mujeres en edad reproductiva (15 a 35 años) atendidas por consulta externa en el servicio de Ginecología y Obstetricia de hospitales y centros de salud de los distritos del Porvenir, la Esperanza, Florencia de Mora y Moche en Trujillo-Perú entre Julio y octubre del 2016. (Ver anexo N°1)

Criterio de inclusión

I ETAPA

Mujeres atendidas en el servicio de Ginecología, y sin tratamiento antifúngico y antibacteriano contra vaginosis. Edad entre 15 – 35 años y según criterios de Nugent.

II ETAPA

Mujeres con manifestaciones clínicas de vaginosis bacteriana y sin tratamiento antifúngico y antibacteriano

Criterio de exclusión

Mujeres atendidas en el servicio de Ginecología con tratamiento antibacteriano y antifúngico.

I ETAPA: Mujeres mayores de 35 años de edad.

II ETAPA: Mujeres que no tienen manifestaciones clínicas de vaginosis bacteriana

Tamaño de la muestra

Para dar mayor adecuación y precisión a los resultados tomar en cuenta el total de las muestras recolectadas.

I ETAPA: menor o igual a 10 muestras

II ETAPA: igual o mayor a 10 muestras

Toma de muestra

Las muestras de mujeres que cumplieron con el criterio de inclusión se recogieron teniendo en cuenta los criterios según Nugent. Una vez recogida la muestra, se transportarán en medio de cultivo Cary Blair, al Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Universidad Privada Antenor Orrego dentro de 8 a 24 horas posterior a la toma de muestra.

I ETAPA: OBTENCION DE *Lactobacillus* probiótico

1. Recolección de muestras

Se realizarán hisopados vaginales de mujeres atendidas por consulta externa en el servicio de Ginecología y Obstetricia de hospitales y centros de salud de los distritos del Porvenir, Florencia de Mora y Moche en Trujillo-Perú entre Julio y octubre del 2016. Las muestras serán transportadas al laboratorio en medio de cultivo Cary Blair.

1. Enriquecimiento de la muestra: Las muestras colectadas serán sembradas en medio de enriquecimiento, caldo Man Rogosa Sharpe (MRS), e incubar a 37°C por 24 horas en condiciones de microaerofilia por el método de la vela.
2. Aislamiento y obtención de cultivos puros de *Lactobacillus* de secreción vaginal

Subcultivar 0.1mL de la suspensión en Agar Man Rogosa Sharpe (MRS) a pH 5,5 ± 0,2, e incubar a 37° C por 24-48 horas en atmósfera de microaerobiosis, entre 5 - 8% de dióxido de carbono (CO₂) por el método de la vela.

1. Selección e identificación preliminar de *Lactobacillus* sp.

Teniendo como base las características morfológicas de las colonias, características tintoreales de las bacterias, sembrar los cultivos puros en agar MRS. Luego, de cada cultivo puro realizar las tinciones Gram, prueba de la catalasa con peróxido de hidrógeno al 3%, y el uso del sistema API 50.

Identificación molecular

Extracción de ADN genómico bacteriano (método rápido-INCABIOTEC)

1. Tomar 1,2ml de caldo pre-enriquecido MRS en un tubo de 1.5ml y micro centrífugar a 10000rpm por 2 min.
2. Posteriormente eliminar el sobrenadante y re suspender el sedimento en 500ul de la solución PBS 1X estéril.
3. Se lleva a centrifugar a 10000rpm por 2 min, se elimina el sobrenadante añadiendo luego 200ul de la solución TE (Tris 1M/0.1M EDTA).
4. Luego llevar a ebullición por 10 min e inmediatamente colocar sobre hielo por 5 min centrifugar a 10000rpm por 1 min.
5. Transferir el sobrenadante a otro micro tubo y se agregar 1ul de ARNasa y llevar a 65°C por 15 minutos y almacenar.

PCR amplificación del gen 16S rRNA

1. La amplificación del gen 16SRNA, se realizara mediante la técnica de PCR convencional. Para cada reacción se tomara 2.5ul de buffer 10X,
2. 1ul de cloruro de magnesio 50Mm, 0.1 unidad de taq polimerasa (invitrogen),
3. 0.5 ul de DNTps a 10mM, 0.6 ul de cada primer a 15 pmol, 17.6 ul de agua libre de nucleasas y 2ul de ADN extraído en una reacción final de 25ul.
4. La programación para termociclador, temperatura 94°C por 6 minutos, 94°C por 30 segundos, 58°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto, 72°C por 4 minutos, 4°C por 10 horas , el juego de primer que será: 16S rRNA F518 (CCAGCAGCCGCGGTAATACG), 16S rRNA R800

(TACCAGGGTATCTAATCC).

5. La migración del amplicon de ADN, se realizara en gel agarosa 1.5%
6. Actividad antagónica de cultivos de *Lactobacillus* contra *Staphylococcus aureus* y *Gardnerella*.
Método de agar por doble capa: Estandarizar individualmente en medio líquido las cepas patógenas, a Standard de Mc Farland 0,5 equivalente a 1×10^8 UFC/mL, luego inocular en TSA (semi solido a una temperatura de 55°C) 30 µL (cepa testigo), homogenizar y rápidamente verter en una placa con Agar MRS que contiene las bacterias de *Lactobacillus* sembradas por puntura, homogenizar para que el agar quede parejo. Incubar a 37°C por 24 horas. Realizar por segunda vez el proceso de la bicapa para corroborar la formación de halos.

II ETAPA: Evaluación de cultivo de *Lactobacillus* como probiotivo vaginal

Según los criterios de inclusión para la II etapa, se realizara el tratamiento vaginal con cultivo de *Lactobacillus* con potencial probiotico en mujeres con vaginosis bacteriana de los servicios de Ginecología y Obstetricia de los hospitales y centros de salud de los distritos del Porvenir, La esperanza, Florencia de Mora y Moche.

- Obtención de biomasa: La biomasa de *Lactobacillus* se obtendrá a partir de subcultivos en caldo MRS, incubar a 35 - 37°C. por 18 – 24 horas y 5 - 7% de CO₂. Suspende el cultivo puro de *Lactobacillus* en SSF estéril hasta la densidad óptica (DO) deseada.
- Presentación del inóculo para tratamiento: Entregar a las pacientes un tubo pyrex tapa rosca de 5 mL de capacidad, dentro de un sobre de papel aluminio, conteniendo 3 mL de una suspensión de *Lactobacillus*, con DO 1,70 en el Fotometro semiautomatizado Herba® equivalente a 10^9 UFC/mL.(Hurtado, 2001)
- Medición del efecto de recolonización vaginal por *Lactobacillus*: Realizar controles los días 1, 7, 15 y 30avo día post tratamiento, recolectar muestras de hisopado vaginal y sembrar en caldo MRS, así como en agar MRS a 37°C, e incubar por 24 horas en microaerobiosis y determinar según características macroscópicas y tintoreales la presencia de *Lactobacillus* con potencial probiótico.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Alemán Mondeja, L. D., Almanza Martínez, C., & Fernández Limia, O. (2010). Diagnóstico y prevalencia de infecciones vaginales. Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología, 36(2), 62-103.
2. Ángeles López, M., García Cano, E. y Aquino C. S. (2001). Hydrogen peroxide production and resistance to nonoxil in *Lactobacillus spp.* isolated from the vagina of reproductive age women.

Revista Latinoamericana de Microbiología 43(4):171-176.

3. Antonio, M. A. D., Hawes, S. E. y Hillier S. L. (1999). The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *Journal Infectious Diseases* 180: 1950-1956.
4. Berthier F, Ehrlich S. (1998). Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS Microbiol Lett* 161: 97-106.
5. Corzo, G.; Gilliland, S. E. (1999). Bile salt hydrolase activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science* 82, 472-480.
6. Cribby, S, Taylor, M, Reid, G. (2008). Vaginal microbiota and the use of probiotics. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, Epub 2009 Mar 29. PMID: 19343185 %5BPubMed - in process%5D
7. Dubernet S, Desmaures N, Guéguen M. (2002). A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol Lett* 214: 271-275.
8. Eschenbach, D. A., (2001). *Infectious vaginitis de Gynecology and Obstetrics on CD-ROM*, Ciarra J. J. Sin país. Lippincott Williams & Wilkins.
9. Eschenbach, D. A., Davick, P. R., Williams, B. L., Seymour, K. J., Young-Smith, K., Critchlow, C. M., y Holmes, K. K.. (1989). Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *Journal of Clinical Microbiology* 27:251-256.
10. Falagas, M, Betsi, G and Athanasiou, S. (2007). Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clinic Microbiol Infect*; 13: 657-664. *Microbiología bucal y clínica* Philip W. Ross, W. Peter Holbrook, editorial científica PLM 1985, 320 paginas
11. Gamiño Arroyo, E., Anaya Velázquez, F. y Padilla Vaca, F. (2004). *Servicio social profesional en investigación*. Instituto de Investigación en Biología Experimental, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato.
12. Goldin, R. (1990). Intestinal microflora: Metabolism of drugs and carcinogens. *Annals of Medicine* 22: 43-48.
13. Gorbach S. L. (1990). Lactic Acid Bacteria and Human Health. *Annals of Medicine* 22: 37-41.
14. Gupta, K.; Mital, K.; Garg, S. K. (1996). Characterization of *Lb. acidophilus* strains for use as dietary adjunct. *International Journal of Food Microbiology* 29, 105-109.
15. Hillier, L., Krohn, A., Rabe, K., Klebanoff, J. y Eschenbach, A. (1993). The normal vaginal flora, H₂O₂-producing lactobacilli and bacterial vaginosis in pregnant women. *Clinical Infectious Diseases* 16 (Suppl 4):S273-281.
16. Hood, K.; Zottola, A. (1988). Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *Journal of Food Science* 53, 1514-1516
17. Hoesl, CE; et al (2005) "The probiotic approach: an alternative treatment option in urology" *European Urology*. 47: 288-296.
18. Hurtado, T., Escamilo, S. (2001) Efecto in vitro de tres características antibacterianas de *Lactobacillus sp.* vaginales de pacientes categorizadas según criterio de Nugent contra *Gardnerella vaginalis*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias – Microbiología Clínica. Post Grado – Universidad Nacional de Trujillo.

19. Juárez T, Bru E, Nader Macías, E. (2003) Comparison of the growth and hydrogen peroxide production by vaginal probiotic lactobacilli under different culture conditions. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*;188(1):35-44.
20. Madigan, T, Martinko, J, Parker J. (1997) *Biología de los microorganismos*. Edit Prentice Hall. España.
21. Martínez Martínez, W. (2013). Actualización sobre vaginosis bacteriana. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 39(4), 427-441.
22. Martinez, R y col. (2005). Evaluation of bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* against *Listeria monocytogenes* growth and haemolytic activity. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol.36 N°1 São Paulo.
23. Martín, R., Soberón, N., Vázquez, F., & Suárez, J. E. (2008). La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(3), 160-167.
24. Medina, R., Rechkemmer, A., & Garcia-Hjarles, M. (1999). Prevalencia de vaginitis y vaginosis bacteriana en pacientes con flujo vaginal anormal en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza. *Revista Medica Herediana*, 10(4), 144-150.
25. Merk, K., Borelli, C. y Korting, C. (2005). Lactobacilli – bacteria- host interactions with special regard to the urogenital tract. *International Journal of Medicine Microbiology*. 295(1):9-18.
26. Nugent R, Krohn M and Hiller SL. (1991). Reliability of Diagnosing Bacterial Vaginosis Is Improved by a Standarized Method of Gram Stain Interpretation. *Journal of Clinical Microbiology*. 29(2): 297-301.
27. Othman, Neilson P, Alfirevic, Z. (2008) Probióticos para la prevención del trabajo de parto prematuro. *La Biblioteca Cochrane Plus*, número 3. Oxford, Update Software Ltd. (ISSN 1745-9990).
28. Pérez Leonard, H. (2012) *Lactobacillus Probióticos: Sustancias Naturales Bioactivas para la Prevención de Infecciones Urogenitales*.
29. Reid G and Bruce A. (2006) Probiotics to prevent urinary tract infections: the rationale and evidence. *World Journal of Urology*. 24(1):28–32.
30. Reid G. (2008) Probiotic Lactobacilli for urogenital health in women. *Journal Clin Gastroenterol*. Sep;42 Suppl 3 Pt 2: S234-6. Review. PMID: 18685506
31. Reid, G., Burton, J. y Devillard E. (2004). The Rationale for Probiotics in Female Urogenital Healthcare. *Medscape General Medicine* 6 (1) 1-9.
1. Schillinger, U. (1990). Lactic acid bacteria as protective culture in meta products. *Fleischwirtsch*. 70: 1296-1299. Alemania.
32. Silva C, Rey R, Nader Macías, E. (2003) Structural and ultrastructural studies of the urinary tract of mice inoculated with *Lactobacillus fermentum*. *British Journal of Urology*; 91:878-882.
33. Song Y, Kato N, Liu C, Matsumiya Y, Kato H, Watanabe K. (2000). Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiol Lett* 187: 167-173.
34. Washington Winn, Jr.; Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger, Woods G.

Koneman's (2005) .Color Atlas and Textboock of Diagnostic Microbiology. Ed. Lippincott Company. 6ta ed, p: 838-840.

35. 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. (2005). 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. 191(7):1129-1139.
36. Zárate G, Santos V, Nader Macias, E. (2007) Efecto protector vaginal de Lactobacillus paracasei CRL 1289 contra la infección urogenital Producido por Staphylococcus aureus en un modelo animal de ratón. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology. 48358.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD	INICIO	FIN
Recoleccion de muestras	04/04/2016	04/07/2016
I ETAPA: Aislamiento, identificación y selección de cultivos de Lactobacillus.	06/06/2016	31/08/2016
II ETAPA: Evaluacion como probiotico vaginal	05/09/2016	31/12/2016
Informe Parcial del Proyecto	21/11/2016	28/11/2016
Recolección y análisis de resultados	01/12/2016	31/01/2017
Redaccion de Informe	01/02/2017	30/03/2017
Informe Final del Proyecto	23/03/2017	30/03/2017

PRESUPUESTO			
DESCRIPCION	CANTIDAD	PRECIO UNITARIO	PRECIO PARCIAL
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	20	20
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	15	30
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	200	400
REACTIVOS E INSUMOS	3 UNI	3.50	10.50
REACTIVOS E INSUMOS	4 UNI	15	60
MATERIAL DE VIDRIO	1 UNI	50	50
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	450	450
REACTIVOS E INSUMOS	3 UNI	12	36
Coolers Coleman 5QT	2 UNI	40	80
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	4745.50	4745.50
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	250	250
REACTIVOS E INSUMOS	100 UNI	25	2500
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	340	340
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	7	14
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	15	30
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	12	12
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	170	170
REACTIVOS E INSUMOS	4 UNI	5	20
TRANSPORTE LOCAL	40 UNI	10	400
REACTIVOS E INSUMOS	60 UNI	1.20	72
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	8891.90	8891.90
			Total 18581.90