



Universidad de Concepción
Facultad Farmacia

**EFFECTO DE CEPAS PROBIÓTICAS DE
LACTOBACILLUS CON ACTIVIDAD ANTI-
GARDNERELLA VAGINALIS COMO PREVENCIÓN
PARA LA VAGINOSIS BACTERIANA**

POR

CONSTANZA IGNACIA ARANEDA RODRÍGUEZ

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Bioquímico

Profesora Guía y Patrocinante
Apolinaria del Rosario García Cancino

Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Abril, 2023
Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

Dedicado a mis amigos, a mi familia y especialmente a mi bisabuela materna,
que gracias a su apoyo, sabiduría y valores he logrado alcanzar mis mayores
anhelos.

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	iii
TABLA DE CONTENIDOS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades aparato reproductor femenino.....	2
1.2. Microbiota vaginal	3
1.2.1. Lactobacillus spp.....	4
1.2.1.1. Ácido láctico	5
1.2.1.2. Peróxido de hidrógeno	6
1.2.1.3. Bacteriocinas.....	7
1.2.2. Gardnerella vaginalis	8
1.3. Vaginosis bacteriana.....	10
1.3.1. Prevalencia	11
1.3.2. Tratamiento	12
1.4. Probióticos	13
1.4.1. Mecanismo de acción	15

2. PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA	17
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	17
4. HIPÓTESIS.....	17
5. OBJETIVOS	18
5.1. General	18
5.2. Específicos.....	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1. Materiales	19
6.1.1. Medios de cultivos	19
6.1.2. Reactivos	19
6.1.3. Equipos e implementos	20
6.2. Metodología	20
6.2.1. Obtención de cepas bacterianas	20
6.2.2. Cultivo <i>in vitro</i> de cepas bacterianas.....	21
6.2.2.1. Fundamento	21
6.2.2.2. Cultivo de <i>Lactobacillus</i> spp.....	21
6.2.2.2.1. Sobrenadante de <i>Lactobacillus</i> spp.	22
6.2.2.3. Cultivo de <i>Gardnerella vaginalis</i>	23
6.2.3. Identificación de cepas bacterianas	23
6.2.3.1. Tinción de Gram.....	24
6.2.3.2. Pruebas bioquímicas.....	24

6.2.4. Determinación actividad antimicrobiana.....	25
6.2.4.1. Difusión de agar en pocillos	25
6.2.4.2. Actividad antagónica de cepas de <i>Lactobacillus</i>	26
6.2.4.3. Lectura del ensayo de inhibición	27
6.2.5. Ensayos de actividad antagónica	28
6.2.5.1. Fundamento	28
6.2.5.2. Preparación de las alícuotas	28
6.2.5.3. Inhibición por ácido láctico	29
6.2.5.4. Inhibición por peróxido de hidrógeno	29
6.2.5.5. Inhibición por bacteriocinas.....	30
6.2.5.6. Interpretación efecto inhibitorio	30
6.2.6. Ensayos de cinética	32
6.2.6.1. Preparación del cultivo inicial	32
6.2.6.2. Curva de muerte	33
6.2.7. Análisis estadísticos	34
7. RESULTADOS	35
7.1. Reactivación de cepas bacterianas	35
7.2. Identificación de cepas bacterianas	35
7.3. Determinación de la actividad antimicrobiana	39
7.3.1. Difusión en pocillos	39
7.3.2. Difusión en pocillos con sobrenadantes tratados.....	43

7.4. Cinética de inhibición	48
7.4.1. Curva de muerte	48
8. DISCUSIÓN	54
9. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES.....	61
10. BIBLIOGRAFÍA	63
11. ANEXOS	71
11.1. Manejos de desechos biológicos	71

ÍNDICE DE TABLAS

7.2. Tabla I. Características de la identificación bacteriana.....	39
7.3.3. Tabla II. Actividad antimicrobiana del cultivo completo (CC) y sobrenadante sin tratamiento (SST) de <i>Lactobacillus</i> contra la cepa de <i>G. vaginalis</i>	41
7.3.2. Tabla III. Actividad antimicrobiana exhibida por sobrenadantes de <i>Lactobacillus</i> tratados contra la cepa de <i>Gardnerella vaginalis</i>	45
7.4.1. Tabla IV. Recuento bacteriano de la cepa <i>Gardnerella vaginalis</i> en condiciones de máximo de crecimiento (McFarland 2).	49
7.4.1. Tabla V. Recuento bacteriano de las cepas de <i>Lactobacillus</i> con efecto inhibitorio sobre <i>Gardnerella vaginalis</i> a una concentración (5:1).....	50
7.4.1. Tabla VI Recuento bacteriano de las cepas de <i>Lactobacillus</i> con efecto inhibitorio sobre <i>Gardnerella vaginalis</i> a una concentración (10:1).....	50
7.4.1. Tabla VII. Mortalidad de cepas de <i>Lactobacillus</i> con actividad anti- <i>Gardnerella vaginalis</i> exhibida a distintas concentraciones.	53

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Mecanismo potencial de probióticos	15
Figura 2. Interpretación de la zona de inhibición del ensayo de difusión en pocillos con sobrenadantes tratados	31
Figura 3. Caracterización microscópica de cepas de <i>Lactobacillus</i> mediante tinción de Gram.....	36
Figura 4. Caracterización macroscópica y microscópica de cepas de <i>G. vaginalis</i> mediante tinción de Gram	38
Figura 5. Zonas de inhibición (mm) de cepas con Actividad anti- <i>Gardnerella vaginalis</i> del cultivo completo y sobrenadante sin tratamiento	42
Figura 6. Ensayo de difusión en pocillos con sobrenadantes tratados para las cepas de <i>Lactobacillus</i> que presentaron actividad anti- <i>Gardnerella vaginalis</i> en placas de agar Mueller Hinton (5% sangre humana)	44
Figura 7. Zonas de inhibición (mm) de cepas <i>Lactobacillus</i> con potencial efecto inhibitorio sobre <i>G. vaginalis</i> en sobrenadantes tratados y sin tratamiento	47
Figura 8A. Cinética de muerte de <i>Gardnerella vaginalis</i> cuando se varía la concentración de la cepa L121	51
Figura 8B. Cinética de muerte de <i>Gardnerella vaginalis</i> cuando se varía la concentración de la cepa L108	52
Figura 8C. Cinética de muerte de <i>Gardnerella vaginalis</i> cuando se varía la concentración de la cepa L95	52

RESUMEN

El microbioma vaginal presenta un dominio de bacterias del género *Lactobacillus* que secretan metabolitos con actividad antimicrobiana como el ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. Estos mantienen un pH idealmente ácido para evitar la proliferación de microorganismos patógenos como *Gardnerella vaginalis*. A partir de una disminución de *Lactobacillus* spp. se genera una disbiosis en la microbiota, que conduce al desarrollo de la vaginosis bacteriana; considerándose común en mujeres de edad fértil que pueden presentar recurrencia al menos 3 veces al año por la alta resistencia antibiótica que genera repercusiones. Por esta razón, es necesario encontrar alternativas que ayuden a fortalecer la microbiota vaginal. Dentro de ellas, está el empleo de probióticos, que ayudan a inhibir la adhesión de patógenos en el epitelio vaginal. Asimismo, la importancia de este trabajo radica en determinar el mecanismo responsable de la actividad anti-*Gardnerella vaginalis* en cepas probióticas de *Lactobacillus*, esperando encontrar actividad mediado por ácido láctico.

El método de difusión en pocillos que, junto a la cinética de inhibición bacteriana, constató la eficacia de 3 cepas de *Lactobacillus*, L95 (98,43%), L108 (99,47%) y L121 (98,63%) que presentaron la actividad antimicrobiana esperada.

ABSTRACT

The vaginal microbiome is dominated by bacteria of the species *Lactobacillus* that secrete metabolites with antimicrobial activity such as lactic acid, hydrogen peroxide and bacteriocins. These maintain an ideally acidic pH to prevent the proliferation of pathogenic microorganisms such as *Gardnerella vaginalis*. From a decrease of *Lactobacillus* spp. a dysbiosis is generated in the microbiota, which leads to the development of bacterial vaginosis; it is considered common in women of reproductive age who may present recurrence at least 3 times a year for high antibiotic resistance that generates repercussions. Therefore, it is necessary to find alternatives to help strengthen the vaginal microbiota. These include the use of probiotics, which help to inhibit the adhesion of pathogens in the vaginal epithelium. In addition, the importance of this work consists in determining the mechanism responsible for the anti-*Gardnerella vaginalis* activity in probiotic strains of *Lactobacillus*, expecting to find activity mediated by lactic acid. The well diffusion method, which, together with bacterial inhibition kinetics, confirmed the efficacy of three *Lactobacillus* strains, L95 (98.43%), L108 (99.47%) and L121 (98.63%), which showed the expected antimicrobial activity.

La vaginosis bacteriana (VB) prevalece en la microbiota vaginal cuando existe una depleción de *Lactobacillus* spp. Y, a la vez, un incremento de cepas patógenas, como *Gardnerella vaginalis* (Chetwin et al., 2019), causando una pérdida de acidez en la secreción vaginal. Algunos estudios afirman que la VB se asocia a una considerable susceptibilidad de infecciones de transmisión sexual (ITS) y a diversas complicaciones reproductivas (Chetwin et al., 2019).

En la actualidad, existen varios tratamientos con probióticos que en conjunto con la aplicación de antibióticos han demostrado ser efectivos frente a la VB recurrente. Sin embargo, la eficacia y características de seguridad son específicas para cada cepa probiótica y no se debe dar por hecho que alguna nueva cepa comparta los mismos antecedentes con otras ya preexistentes (Nader et al., 2021).

Un estudio señaló que la terapia complementaria con metronidazol oral 500 mg por 7 días junto al probiótico vaginal *Lactobacillus crispatus* durante 14 días, redujo la tasa de recurrencia de la VB. Los resultados arrojaron un 41% de VB recurrente en el grupo placebo y un 21% para el grupo probiótico *L. crispatus*

En otras palabras, se demostró que una administración continua durante cuatro ciclos menstruales produce una reducción efectiva gracias al uso del probiótico (Webb, 2021).

1.1. Generalidades del aparato reproductor femenino

Ante todo, la vagina es un músculo membranoso que presenta una longitud media de 10 a 12 cm con un color rosado, aspecto aterciopelado, húmedo y con una secreción característica de apariencia incoloro a opalescente, que puede cambiar discretamente durante el embarazo (Merchán et al., 2020). A lo largo de la edad fértil, se considera un rango aceptable de pH fisiológico entre 3,8 y 4,5 (Knapp, 2020), que se asocia a la secreción de ácido láctico, peróxido de hidrógeno y probablemente bacteriocinas por algunos microorganismos existentes en el microbioma vaginal (Zhu et al., 2022). Dicho de otro modo, tienen como objetivo mantener una microbiota saludable.

1.2. Microbiota vaginal

Dentro de una microbiota vaginal saludable habita alrededor de un 70% de bacterias ácido lácticas (BAL), que en su mayoría corresponden a *Lactobacillus* spp. destacándose algunas especies como *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. iners*, *L. gasseri* y *L. jensenii* (Balasubramaniam Mohankumar et al., 2022) e igualmente, existen otros microorganismos propios de la vagina, pero éstos se encuentran en menor proporción y a veces son considerados patógenos causantes de infecciones. Por ejemplo, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Mycoplasma*, *Streptococcus aureus*, *Staphylococcus* y Enterobacteriaceae (Martínez et al., 2021).

En relación a las etapas de la mujer, se sabe que tanto los cambios hormonales como las alteraciones fisiológicas y estructurales influyen en la cantidad de *Lactobacillus* spp. (Martínez et al., 2021). Puesto que, inicialmente hay presencia de un ambiente vaginal estéril para la infanta, que tras el comienzo de la lactancia se incrementan los niveles de estrógenos y así mismo, aumenta el glucógeno en las células epiteliales vaginales, provocando la colonización por parte de los *Lactobacillus* spp. (Hernández, 2017). Por otra parte, tras la primera menstruación comienza la etapa fértil en una mujer y con ella los cambios en la mucosa vaginal, debido a la alta producción de estrógeno, lo cual deja una

microbiota principalmente de *L. acidophilus*. Sin embargo, ocurre un efecto contrario después del embarazo y cuando llega la menopausia, ya que se reducen los niveles de estrógenos y este cambio provoca una tendencia a bacterias anaerobias como *Gardnerella vaginalis*. Por esta razón, se debe complementar con terapias hormonales como el uso de anticonceptivos para que haya una mayor incidencia de *Lactobacillus* spp. (Zhu et al., 2022).

Para contextualizar, cuando existe un elevado rango de *Lactobacillus* spp., estos proporcionan un ambiente protector, pues aumentan la acidez vaginal mediante la secreción de agentes antimicrobianos, entre otros. Dado que, un ambiente ácido inhibe el crecimiento de bacterias potencialmente patógenas y protege a la vagina de infecciones (Knapp, 2020).

1.2.1. *Lactobacillus* spp.

Los *Lactobacillus* spp. son bacilos que se caracterizan principalmente por ser bacterias aerobios facultativas, no esporulados, fermentativos y Gram positivas (Hernández, 2017). Asimismo, presentan una morfología bacilar que puede variar de tamaño y grosor, tanto como su afinidad tintorial, estos pueden formar cadenas y en general no tienen motilidad (Goldstein et al., 2015).

Las colonias de *Lactobacillus* en medios sólidos son pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. Sólo en algunos casos presentan coloración amarillenta o rojiza. En cambio, en medio líquido precipitan rápidamente después que el crecimiento cesa (Fernández &Castillo, 2007; Rajab et al., 2020).

Por otra parte, los *Lactobacillus* son la primera línea de defensa e impulsan restauración en la microbiota vaginal, que puede ocurrir por adhesión al epitelio vaginal, además que son capaces de producir y secretar metabolitos con actividad antimicrobiana como el ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas; quienes mantienen un pH idealmente ácido para evitar la proliferación de microorganismos patógenos (Scillato et al., 2021) como *Gardnerella vaginalis*.

1.2.1.1. Ácido láctico

Los *Lactobacillus* spp. son capaces de producir ácido láctico, compuesto que se genera como producto final del metabolismo fermentativo de la glucosa.

Asimismo, el ácido láctico es el responsable de no permitir la colonización de microorganismos patógenos y mantener el equilibrio de la microbiota vaginal (Kalia et al., 2020). Algunas clasificaciones de *Lactobacillus* productores de ácido láctico son *L. crispatus*, *L. gasseri* y *L. jensenii*. Donde algunos hallazgos han indicado que *L. crispatus* inhibe la actividad de *Gardnerella vaginalis* en la mucosa vaginal (Plummer et al., 2021) De hecho, la concentración del ácido láctico está inversamente correlacionada con el pH, este vínculo muestra la principal causa de la acidificación en la vagina (Tachedjian et al., 2017). Por lo tanto, la administración de una cepa probiótica puede revertir una disbiosis vaginal.

1.2.1.2. Peróxido de hidrógeno

La producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es realizada por *Lactobacillus* spp. en presencia de oxígeno y esta sustancia antimicrobiana tiene efecto bactericida debido a su capacidad oxidante (Martín et al., 2008). Sin embargo, algunos estudios han mostrado que la producción de H_2O_2 no tienen efectos considerables para la prevención de VB, debido a que en concentraciones

excesivas puede ser dañino para los *Lactobacillus* (Kalia et al., 2020; O'Hanlon et al., 2011).

Por otra parte, es posible encontrar este metabolito en especies de *Lactobacillus* como *L. crispatus* y *L. jensenii* que proporcionan protección a la mucosa ante alteraciones causadas por otros microorganismos, debido a que son más estables en la microbiota vaginal (Martín et al., 2008). En cambio, hay otras algunas cepas como *L. helveticus* y *L. rhamnosus* que producen altas concentraciones de H₂O₂ y suprimen eficazmente las actividades patógenas. También, está el caso de *L. salivarius* que registró una producción moderada de H₂O₂. Por último, la especie de *L. gasseri* demostró tener una baja capacidad de producción de este metabolito (Pino et al., 2019)

1.2.1.3. Bacteriocinas

Las bacteriocinas se consideran una amplia familia de polipéptidos sintetizados por los ribosomas (Perez et al., 2018). Poseen actividad antibacteriana y suelen ser anfipáticas ya que originan la apertura de poros en las membranas ocasionando incluso la lisis celular (Martín et al., 2008).

Además, estos péptidos biológicamente activos de bajo peso molecular son capaces de inhibir el crecimiento de diversos microorganismos patógenos (Prabhurajeshwar & Chandrakanth, 2019) como es el caso de la *Gardnerella vaginalis*, que aparecen en infecciones bacterianas cuando hay una disbiosis en el microbioma vaginal.

1.2.2. *Gardnerella vaginalis*

Gardnerella vaginalis se caracteriza por ser un cocobacilo anaerobio facultativo, pleomórfico e inmóvil no capsulado (Sacoto, 2014), con un tamaño equivalente entre 0.5µm –1.5µm (Díaz, 2020) y puede observarse como bacteria Gram positiva, Gram negativa, es decir, Gram variable (Sacoto, 2014).

En base a ello, para una correcta identificación se deben realizar pruebas bioquímicas y mediante un cultivo primordialmente de agar chocolate (Díaz, 2020) o de agar sangre se lograrían observar colonias pequeñas circulares y de color grisáceo (Díaz, 2020).

La actividad que provoca *G. vaginalis* en el microbioma femenino es principalmente una secreción homogénea de consistencia lechosa y color grisáceo a blanquecino que provoca un mal olor, debido a la volatilización de aminas (Sanchez, 2018). Es decir, provoca una elevación del pH por encima de 4.5 y así se desarrolla la VB. Además, las cepas de *G. vaginalis* tienen la facultad de formar biopelículas y se estima que es la primera bacteria patógena que se consolida en el epitelio vaginal actuando como un soporte de adhesión en que precisa de asistencia de otras especies anaerobias para promover la VB. Por lo tanto, suprimir la proliferación de *G. vaginalis* es una estrategia viable para el tratamiento de la VB. Por esta razón, la terapia antimicrobiana no es completamente efectiva en alrededor de un 10% al 15% de los pacientes que acuden a dicho tratamiento (Hyemin et al., 2021; Kalia et al., 2020; Qian et al., 2021). Además, *G. vaginalis* posee factores de virulencia como la vaginolisina y sialidasa asociadas a la VB y a infecciones intrauterinas (Qian et al., 2021).

El control del crecimiento de *G. vaginalis* requiere fortalecer el microbioma vaginal con especies beneficiosas como lo son las bacterias *Lactobacillus* spp., ya que evitan que diversos tipos de microorganismos potencialmente dañinos se adhieran al epitelio vaginal, por lo que dificulta el crecimiento y su colonización (Knapp, 2020)

1.3. Vaginosis bacteriana

La VB es una disbiosis en la microbiota vaginal que indica un crecimiento excesivo de bacterias anaerobias como es el caso de *G. vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Prevotella* sp., *Mobiluncus* sp. y *Mycoplasma hominis* que a su vez son acompañadas por un aumento de pH vaginal y un agotamiento considerable en los niveles de las bacterias del ácido Láctico (BAL) (Herrera, 2021; B. Mohankumar et al., 2022; Park et al., 2023). Lo que provoca una serie de molestias genitales como es el caso del exudado, prurito y flujo maloliente. Sin embargo, pueden existir situaciones complejas como es el aborto espontáneo, parto prematuro e infecciones de una herida postoperatoria, entre otras (Hyemin et al., 2021).

Asimismo, la VB presenta tasas de recurrencia significativa en mujeres de edad reproductiva, por lo general, acuden a la aplicación de antibióticos, que en innumerables ocasiones aumenta el riesgo de aparición de cepas resistentes, además de una alteración persistente en la microbiota (Lehtoranta et al., 2020).

Los factores de riesgo que predisponen una VB, son principalmente el uso de antibióticos, algunos dispositivos intrauterinos, además de una higiene deficiente, rutinas de lavado o duchas vaginales, tener múltiples compañeros sexuales, tabaquismo, estrés entre otros eventos (Abou Chacra et al., 2021).

1.3.1. Prevalencia

A nivel mundial, se reveló en el año 2002 que Sudáfrica tenía un 58,3% de prevalencia de VB. Asimismo, en 2004 se indicó que un 29,2% de la población de EE.UU. tenía VB moderada. No obstante, durante el 2008 se observó una baja prevalencia de VB en países subdesarrollados como el caso de Australia (4,7%), Finlandia (8,6%) y en parte del continente europeo. En cambio, para Asia, América Latina, se notificó una tasa moderada de VB, donde Chile destacó con un 32% de VB, en el año 2006. (Coudray & Madhivanan, 2020). Según la guía perinatal del MINSAL (Perinatal, 2015), la VB es una enfermedad prevalente en Chile, que afecta principalmente a mujeres en etapa de embarazo. Donde, un 26% padece esta afección en un embarazo normal sin complicaciones.

Además, hay prevalencia de un 43% con riesgo de parto prematuro. En el caso de Chile, se ha demostrado que la VB es una infección frecuente, con mayor prevalencia que la descrita en estudios internacionales.

1.3.2. Tratamiento

Los tratamientos recomendados son antibióticos como el metronidazol y la clindamicina, puesto que ambos cuentan con una amplia cobertura para la VB recurrente y se encuentran disponibles en formatos por vía oral e intravaginal (Vodstrcil et al., 2021). Entonces, se recomienda seguir con metronidazol durante 7 días, equivalente a una dosis de 500 mg cada 12 horas por vía oral. De otra forma, en caso alternativo usar clindamicina (2%) en crema o metronidazol en gel (0,75%), para un uso de 5 a 7 días (Bagnall & Rizzolo, 2017). No obstante, existen casos que ocurre una disbiosis persistente donde se puede experimentar a los 12 meses, 6 meses o de manera mensual en los casos más graves, lo cual puede requerir ciclos prolongados de terapias con antibióticos. En otras palabras, se necesita una terapia más agresiva para una VB recurrente con los antibióticos ya antes mencionados.

Puesto que, el centro de control y prevención de enfermedades (CDC) recomienda que las recurrencias poco frecuentes se puedan controlar con los mismos medicamentos que se usan en una infección inicial (Bagnall & Rizzolo, 2017; Park et al., 2023). Por consiguiente, la búsqueda de nuevas alternativas para la prevención de infecciones vaginales es importante para promover una microbiota vaginal sana, debido a que el constante uso de antibióticos plantea una resistencia a bacterias patógenas como *G. vaginalis* y es capaz de eliminar una amplia gama de microorganismos beneficiosos en el microbioma vaginal.

1.4. Probióticos

Una alternativa que contribuye al fortalecimiento de la microbiota vaginal, y a su vez se considera una medida de prevención para la VB es el uso de probióticos (Lyra et al., 2023). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se definen como microorganismos vivos que tienen un impacto positivo en la salud y en la fisiología de un individuo cuando se toman en cantidades suficientes (Akgül & Karakan, 2018).

Los criterios que caracterizan a un buen probiótico es la capacidad de adherirse a las células, así como también impedir o disminuir la adherencia de microorganismos patógenos. Por otra parte, deben ser aptos para secretar o producir ácidos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas para inhibir el crecimiento de microorganismos potencialmente dañinos. Asimismo, no pueden ser invasivos, ni cancerígenos para una persona. Por último, deben ser idóneos para la formación de una microbiota saludable y equilibrada (Akgül & Karakan, 2018). Sin duda, los probióticos abarcan una gran variedad y pueden suministrarse derechamente al tracto vaginal mediante cápsulas, aplicadores, o dispositivos intrauterinos cargados con lactobacilos entre otros (Tachedjian et al., 2017).

Aunque no es la única vía, puesto que existen probióticos orales que pueden transportarse desde el tracto gastrointestinal hasta llegar a la microbiota vaginal (Tachedjian et al., 2017). Diferentes estudios han descrito especies de *Lactobacillus* que se han evaluado como probióticos vaginales para tratamiento o prevención de la recurrencia de VB, incluida las cepas de *L. rhamnosus* GR-1, *L. reuteri* RC-14, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. gasseri*, *L. crispatus* y *L. fermentum* (Tachedjian et al., 2017).

1.4.1. Mecanismo de acción

En la figura 1, se muestran los cuatro mecanismos fundamentales: (1) Actividad antimicrobiana mediante compuestos como el ácido láctico, el peróxido de hidrógeno y bacteriocinas que son capaces de regular el pH de la microbiota; (2) inhibición de biopelículas patógenas; (3) coagregación con los patógenos; y (4) modulación en la respuesta inmune (Hyemin et al., 2021).

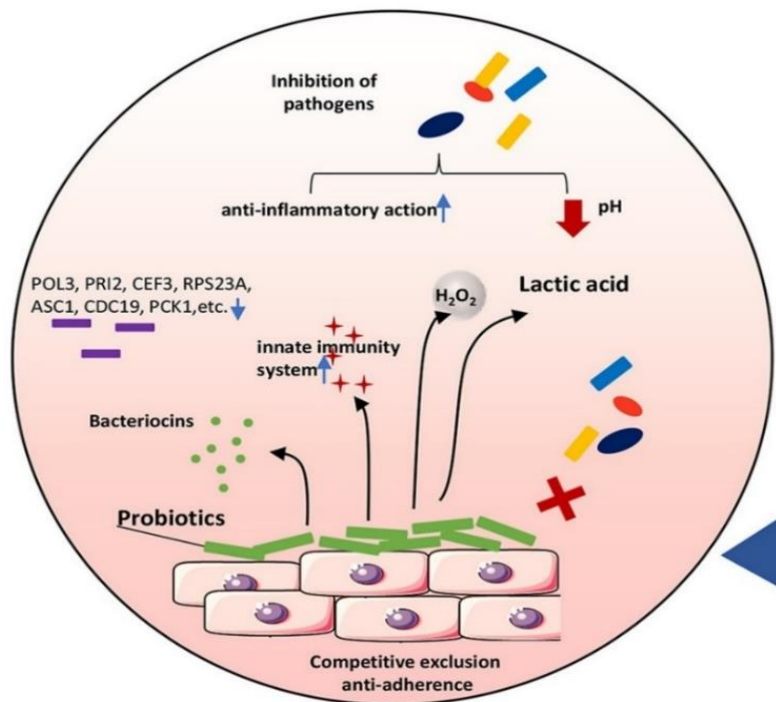


Figura 1. Mecanismo potencial de probióticos. Obtenido de (Han &Ren, 2021)

Cuando los probióticos son ingeridos por vía oral y dispensados a través del estómago, estos siguen por los intestinos hasta llegar a las células epiteliales de la vagina. Donde, se adhieren y contribuyen al equilibrio del microbioma por medio de bacterias ácido lácticas (BAL), que regulan el pH mediante la secreción de diversos metabolitos como es el caso del ácido láctico, el peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, entre otros (Han & Ren, 2021). Por consiguiente, se produce una competencia de exclusión entre BAL y patógenos, que en el mejor de los casos induce una actividad de inhibición contra los microorganismos que causaron la disbiosis.

2. PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA

El tratamiento con antibióticos contra la VB conduce a una disbiosis de la microbiota vaginal, lo que se traduce en mayor susceptibilidad a infecciones microbianas como la causada por *Gardnerella vaginalis*.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál será el mecanismo de las cepas probióticas de *Lactobacillus* con actividad anti-*Gardnerella vaginalis* en el cepario del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Universidad de Concepción?

4. HIPÓTESIS

En el cepario del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Universidad de Concepción existen cepas de *Lactobacillus* con actividad anti-*Gardnerella vaginalis*, dada por la producción de ácido láctico.

5.

OBJETIVOS

5.1. General

Determinar cuál es el mecanismo responsable de la actividad anti-*Gardnerella vaginalis* de cepas *Lactobacillus*, provenientes del cepario del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Universidad de Concepción.

5.2. Específicos

- 1) Determinar la actividad anti-*Gardnerella vaginalis* en las cepas de *Lactobacillus* del cepario del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana.
- 2) Identificar la producción de ácido láctico en las cepas que posean actividad anti-*Gardnerella vaginalis*.
- 3) Establecer si la actividad anti-*Gardnerella vaginalis* está dada por otros factores como la producción de bacteriocinas o de peróxido de hidrógeno.
- 4) Determinar la cinética de inhibición de las cepas de *Lactobacillus* que presenten mayor actividad anti-*Gardnerella vaginalis*.

6.

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Materiales

6.2.1. Medios de cultivo

- Agar Mann-Rogosa-Sharpe (MRS).
- Caldo Mann-Rogosa-Sharpe (MRS).
- Caldo Brain-Heart Infusion (BHI).
- Agar Mueller-Hinton Infusion (AMH). Se adicionó 5% de sangre humana en medios de cultivo para crecimiento de *G. vaginalis*
- Suero fisiológico 0,9% p/v NaCl (TSL) en agua destilada

6.2.2. Reactivos

- Tinción de Gram (Violeta de Genciana, Lugol, Alcohol/Acetona 80/20, Safranina)
- Ensayos difusión en pocillo con SST (Hidróxido de sodio; NaOH 1N, enzimas peroxidasa y tripsina Sigma)
- Otros (Glicerol grado técnico, Etanol 70%)

6.2.3. Equipos e implementos

- Gabinete (Arquimed)
- Estufa microaerobiosis (Thermo Scientifics)
- Centrifuga
- Peachimetro (TCL)
- Propipeta/Pipetas y micropipetas
- Asas de siembra curva
- Tubos de vidrio con tapa rosca
- Tubos FALCON (15 y 50 ml)
- Tubos Eppendorf (1,5 y 2 mL)
- Tórulas estériles
- Placas Petri
- Gradillas
- Cajas de puntas
- Regla y plumón

6.2. Metodología

6.2.1. Obtención de cepas bacterianas

La obtención de cepas aisladas de *Lactobacillus* y *G. vaginalis* se ha adquirido del cepario perteneciente al laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Departamento de Microbiología en la Universidad de Concepción.

Las condiciones en las que se encuentran almacenadas las cepas de *Lactobacillus* corresponden a -80°C en 800 µl de caldo MRS (Mann Rogosa Sharpe) con 200 µL de glicerol.

En cambio, las cepas de *G. vaginalis* se presentan a -80°C en caldo BHI (Brain Heart Infusion) suplementado con 5% de sangre humana.

6.2.2. Cultivo *in vitro* de cepas bacterianas

6.2.2.1. Fundamento

El cultivo *in vitro* tiene la finalidad de conseguir colonias aisladas de las cepas bacterianas de interés, lo cual corresponde a un medio enriquecido de nutrientes capaz de suplir los requerimientos de las bacterias en condiciones adecuadas.

6.2.2.2. Cultivo de *Lactobacillus* spp.

Las cepas de *Lactobacillus* obtenidas del cepario a -80°C, fueron seleccionadas con un asa curva esterilizada en un mechero Bunsen y sembradas por estriado en distintas placas Petri con agar MRS. Luego, se llevaron por un periodo de 48 horas a 37° C, a una estufa de cultivo en microaerobiosis (10% CO₂) (Pessoa et al., 2017).

6.2.2.2.1 Sobrenadante de *Lactobacillus* spp.

El cultivo de colonias aisladas de *Lactobacillus* spp. en un tubo con caldo MRS generó condiciones óptimas para que las bacterias logaran la fase logarítmica y se pudieran desarrollar.

Entonces, al transcurrir el periodo de incubación del cultivo anterior, se procedió a seleccionar las colonias aisladas de *Lactobacillus* spp. obtenidas de la placa por un asa curva previamente esterilizada y se añadieron a tubos FALCON con 35 ml de caldo MRS, luego los tubos fueron puestos en una gradilla e incubadas por 24 horas a 37° C en condición de microaerobiosis. Después, de cumplirse el periodo de incubación se llevó cada tubo a una balanza analítica y se dejaron de un mismo volumen para el proceso de centrifugación. Por último, se centrifugaron a 4500 rpm durante 15 minutos a 4° C (Pessoa et al., 2017) y con ello, se obtuvo el sobrenadante de cada cepa de *Lactobacillus*.

6.2.2.3. Cultivo de *Gardnerella vaginalis*

Las cepas de *Gardnerella vaginalis* provenientes del cepario a -80°C, se sembraron en placas de agar Mueller Hinton (suplementado con 5% sangre humana) y se incubaron por 48 horas a 37°C en estufa de microaerobiosis (Pessoa et al., 2017).

6.2.3. Identificación de cepas bacterianas

La identificación bacteriana tanto de cepas de *Lactobacillus* y *Gardnerella vaginalis* se llevó a cabo mediante la observación macroscópica de los respectivos cultivos. Además, en cuanto a la identificación microscópica, esta se realizó mediante microscopía óptica, donde se clasificó la morfología, el tamaño y la afinidad tintorial, esta última a través de la tinción de Gram (Y. Li et al., 2022). Por último, se realizaron 2 pruebas bioquímicas como las reacciones de catalasa y el citocromo oxidasa en las colonias aisladas de cada cepa bacteriana analizada.

6.2.3.1. Tinción de Gram

En un portaobjetos se extendió una colonia de la cepa bacteriana sobre una gota de suero fisiológico (0,9%), luego se fijó con calor de un mechero Bunsen y se siguió el protocolo correspondiente a la técnica de tinción de Gram, la cual se utiliza para la observación y clasificación de microorganismos Gram positivos y Gram negativos, bajo un objetivo de inmersión en el microscopio óptico.

6.2.3.2. Pruebas bioquímicas

La prueba de catalasa ocurre a través de la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno (O_2). En cambio, la prueba de oxidasa está determinada por una reacción de oxidación. Entonces, estas pruebas, ayudan a comprobar la presencia de la enzima catalasa y oxidasa, respectivamente. Las cuales se encuentran en bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen el citocromo de oxidasa.

Para la prueba de catalasa, se añadió una gota de peróxido de hidrógeno en un portaobjetos y mediante un asa de siembra se colocó una colonia aislada de la cepa bacteriana. En paralelo, para la prueba de oxidasa se ocupó el método indirecto, que trató de colocar un trozo de papel filtro en un portaobjetos y se añadió 2-3 gotas del reactivo de Kovacs en el centro del papel. Luego, se extendió con el asa de siembra una colonia aislada sobre el papel impregnado. En ambos casos las pruebas resultaron negativas para las cepas de *Gardnerella vaginalis* y *Lactobacillus*.

6.2.4. Determinación de la actividad antimicrobiana

6.2.4.1. Difusión de agar en pocillos

El ensayo difusión de agar en pocillos, es ampliamente utilizado para la evaluación de la actividad antimicrobiana y resulta favorable para observar halos de inhibición bien definidos. Esto permitió un análisis para aquellas cepas de *Lactobacillus* en base a un volumen determinado (Balouiri et al., 2016).

Para comprender la ejecución del ensayo, todo este procedimiento se realizó en el gabinete donde se depositó en una placa Petri 20 ml de agar Mueller Hinton suplementado con 5% de sangre humana. Luego, con una punta estéril se perforaron 9 orificios con un diámetro de 6 mm; una vez hecho los orificios se tapizó la superficie del agar con un inóculo McFarland 0,5 ($1,25 \times 10^8$ UFC/ml) de *Gardnerella vaginalis* mediante una tórula estéril. Después, en cada pocillo se introdujo un volumen de 50 μ l del sobrenadante de las cepas de *Lactobacillus* que se deseaba evaluar (Balouiri et al., 2016; Hebel-Gerber et al., 2021). Posteriormente, estas placas fueron incubadas en condiciones adecuadas, de tal manera que el agente antimicrobiano difundió en el medio e inhibió el crecimiento de la cepa de *G. vaginalis*.

6.2.4.2. Actividad antagónica de cepas de *Lactobacillus*

Se prepararon 9 pocillos de 6 mm de diámetro, con pipetas Pasteur estériles, en placas con 20 ml de agar Mueller Hinton (suplementado con 5% sangre humana). Posteriormente, cada placa Petri se tapizó con *G. vaginalis* mediante tórulas estériles y la suspensión del inóculo fue de 0,5 McFarland (equivalente a $1,25 \times 10^8$ UFC/ml).

Finalmente, se procedió a depositar 50 µl del cultivo completo de *Lactobacillus* spp. en los 8 pocillos y se añadió un control negativo de caldo MRS en el pocillo central. Luego, la placa se incubó en una estufa de cultivo a 37°C en microaerobiosis por 24 horas (Oldak et al., 2017). Además, se realizó el mismo procedimiento con el sobrenadante de cada uno de los cultivos de 24 horas de *Lactobacillus*, para poder comparar los halos de inhibición del cultivo completo de *Lactobacillus* vs el sobrenadante de las distintas cepas de *Lactobacillus*.

6.2.4.3. Lectura del ensayo de Inhibición

Al transcurrir las 24 horas de incubación se realizó la lectura del ensayo, en el cual, se utilizó una regla para medir el halo de inhibición que generó cada pocillo. Entonces, para clasificar las zonas de inhibición se ocupó el criterio de Gaudana, donde las cepas que generaron las zonas de inhibición de igual o menor a 1 mm fueron clasificadas como *Lactobacillus* sin inhibición (-), las zonas mayores a 1 mm o igual a 2 mm, con ligera inhibición (+), de mayor a 2 mm o igual a 5 mm, es inhibición fuerte (++) y mayor a 5 mm, son cepas que presentan una inhibición muy fuerte (Gaudana et al., 2010).

6.2.5. Ensayos de actividad antagónica

6.2.5.1. Fundamento

Para poder conocer de forma preliminar la naturaleza química de los compuestos que estarían inhibiendo (compuestos antagónicos), cada uno de los sobrenadantes de cada cepa de *Lactobacillus* se trataron de una manera distinta, para poder así conocer si se trataba de una inhibición por ácidos orgánicos, inhibición por peróxido de hidrógeno o inhibición por compuestos de naturaleza proteica (bacteriocinas termolábiles o termoestables).

6.2.5.2. Preparación de las alícuotas

A partir de los tubos Falcón que contenían 35 ml de sobrenadante de *Lactobacillus* spp. con actividad anti-*Gardnerella vaginalis*, con una micropipeta se tomaron 4 alícuotas de 5 ml de sobrenadante y se depositaron en tubos Falcón de 15 ml. Donde, cada alícuota fue tratada y evaluada para descubrir la naturaleza química de la inhibición.

6.2.5.3. Inhibición por ácido láctico

Se tomó la tercera alícuota de 5 ml del sobrenadante de la cepa de *Lactobacillus* con actividad anti-*Gardnerella vaginalis* y se traspasó a un tubo para ajustar su pH a 7,0 con NaOH 1N. Después, se transfirió 1 ml a un tubo Eppendorf rotulado como SN (sobrenadante neutralizado) para posteriormente ensayar la actividad antagónica residual.

6.2.5.4. Inhibición por peróxido de hidrógeno

Se tomó la última alícuota de 5 ml y se procedió a ajustar su pH a 6,5 con NaOH 1N y luego se añadió 200 uL de Peroxidasa (32 µg/ml). Posteriormente, se llevó a incubación durante 2 h a 37°C y se transfirió 1 ml a un tubo Eppendorf para llevarlo al termociclador a 65°C durante 30 minutos y así realizar el ensayo difusión de agar en pocillos y detectar la actividad antagónica.

6.2.5.5. Inhibición por bacteriocinas

La primera alícuota se ajustó a un pH de 7,5 con NaOH 1 N y se traspasó 875 µl de sobrenadante a un tubo Eppendorf, se trató con 625 µl de la enzima Tripsina Sigma (2 mg/ml) para completar un volumen de 1,5 ml. Posteriormente, se incubó por 2 h a 37°C. Este tubo, se rotuló como ST (sobrenadante con tripsina) y fue puesto en un termociclador a 65 ° C durante 30 min. En cambio, la segunda alícuota que contenía 5 ml de sobrenadante sin tratamiento (SST) se dividió en dos tubos Eppendorf, donde el primero se transfirió 1 ml y se rotuló como SC (sobrenadante calentado) para luego, ser llevado al termobloque a 120°C por 20 min, para verificar si se trataban de proteínas termoestables. Por el contrario, la alícuota SST transferida también con 1 ml sirvió como control.

6.2.5.6. Interpretación del efecto inhibitorio

Al cumplirse el tiempo de incubación del ensayo en condiciones estándares (24 h, 37°C, microaerobiosis con 10% de CO₂) en placas por triplicado de agar Mueller Hinton sangre, se procedió a medir el diámetro de la zona de inhibición.

Entonces, cuando no se genera una zona de inhibición se puede deducir que los metabolitos involucrados en SN es el ácido láctico, así como en SP es el peróxido de hidrógeno y para los casos de SC y ST indican presencia de bacteriocinas. Donde, en SC actúan las bacteriocinas termolábiles y el peróxido de hidrógeno. En cambio, en ST actúa bacteriocinas termoestables y el ácido láctico, donde toda la interpretación está representado en la Figura 2.

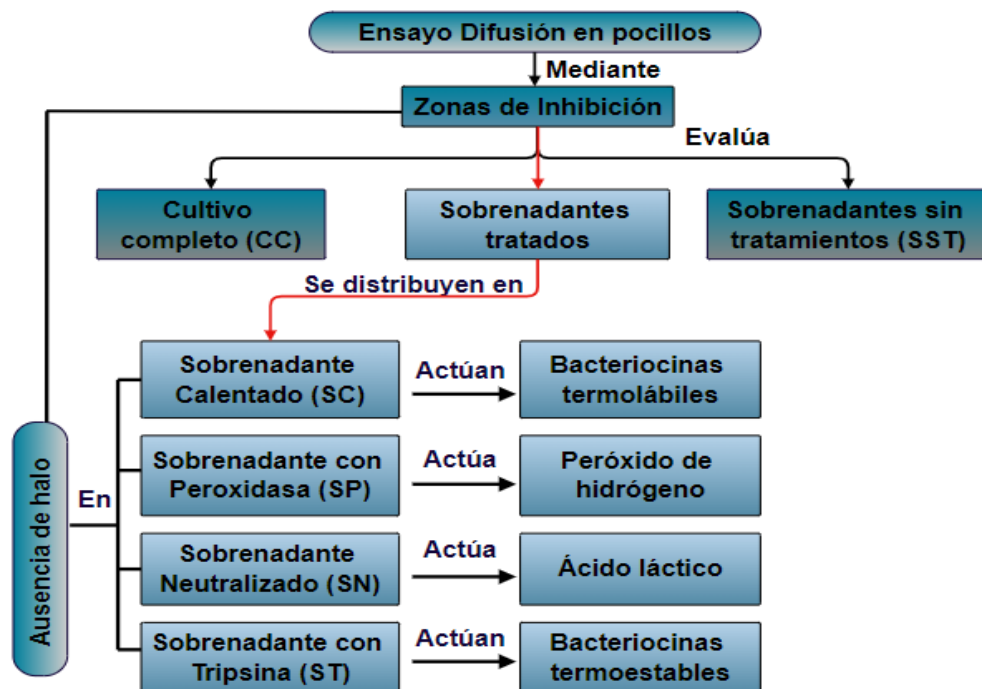


Figura 2. Interpretación de la zona de inhibición del ensayo de difusión de pocillos con sobrenadantes tratados.

6.2.6. Ensayos de cinética

6.2.6.1. Preparación del cultivo inicial

Inicialmente, el sobrenadante de la cepa de *Lactobacillus* se obtuvo a partir de un cultivo de 48 h. Para ello, se preparó una suspensión bacteriana equivalente a McFarland 2 (6×10^8 UFC/ml), en la que se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 min. Por otro lado, para *G. vaginalis* se realizó el mismo procedimiento para obtener un cultivo completo de suspensión bacteriana, de manera que se obtuvieron ambas suspensiones y produce un cultivo inicial (C_i) de 2 ml entre los dos microorganismos. A raíz de esto, se prepararon 2 concentraciones diferentes de C_i , donde la primera se basó en una relación 5:1 (1670 μ l / 330 μ l) y la segunda se llevó a 10:1 (1810 μ l / 190 μ l), es decir, un mayor volumen de las cepas de *Lactobacillus* y el menor correspondió a *G. vaginalis*.

6.2.6.2. Curva de Muerte

Posteriormente, se tomó una alícuota de 100 µl de C_i y se añadió a un tubo Eppendorf que contenía 900 µl de suero fisiológico al 0,9%. De este modo, se realizaron diluciones seriadas hasta completar 10 tubos, donde cada uno se llevó a un volumen total de 1 ml, lo cual, correspondió al tiempo cero. Luego, al finalizar este proceso, C_i se incubó nuevamente por los siguientes tiempos 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 48 horas, respectivamente (Hebel-Gerber et al., 2021).

Con base en lo anterior, con una micropipeta se depositaron 3 alícuotas de 10 µl por cada tubo rotulados de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰ en una placa de agar Mueller Hinton suplementada con 5% de sangre humana y se incubó a 37°C durante 24 horas, en condiciones de microaerobiosis, donde posteriormente se determinó el recuento bacteriano (Hebel-Gerber et al., 2021). Finalmente, el ensayo se realizó por duplicado para cada cepa con actividad anti-*Gardnerella vaginalis* para la determinación de la efectividad de la muerte bacteriana utilizando el criterio de Pearson (Pearson et al., 1980).

6.2.7. Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos se utilizó el programa GraphPad Prism 8 que permitió un análisis de varianza (ANOVA) de una vía al 95% de confianza y la prueba de Tukey para el ensayo de difusión en pocillos (datos con variables independientes realizado por triplicado). Para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos. Por otra parte, en la cinética de muerte los datos son resultado de dos experimentos independientes y los gráficos se realizaron mediante Excel 2010.

7.

RESULTADOS

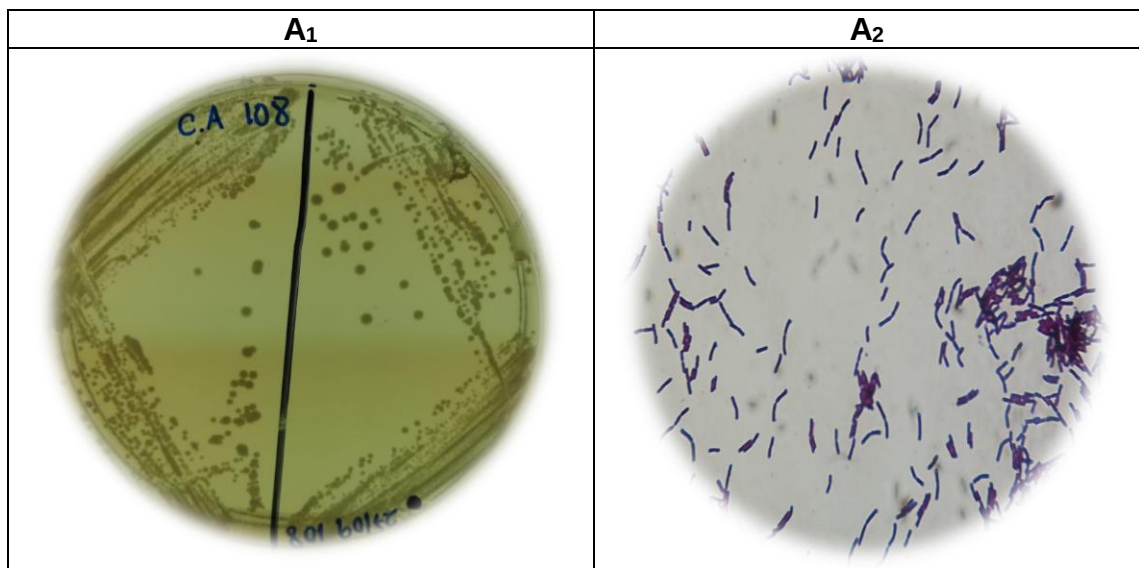
7.1. Activación de cepas bacterianas

Se reactivaron 100 cepas de *Lactobacillus* para conocer su morfología y afinidad tintorial, desde un cepario a -80°C. Para ello, se sembraron en placas de agar MRS mediante siembra de estriado a 37°C por 24 h en condiciones de microaerobiosis (10% CO₂). En paralelo, se realizó siembra en placas de agar Mueller Hinton (5% de sangre humana) para las cepas de *G. vaginalis* con un proceso de incubación de 48 h, en condiciones estándares.

7.2. Identificación de cepas bacterianas

Para una mejor validación se realizó pruebas de identificación bacteriana antes y después de transferir los cultivos. En general, la morfología macroscópica mostró colonias circulares, convexas y con bordes completos, distribuidas de manera uniforme. Sin embargo, tanto el tamaño como la apariencia variaban entre las cepas, siendo visible de cepas translúcidas a otras más opacas.

En contraste, la morfología microscópica presentó cepas de *Lactobacillus* en su mayoría con una estructura bacilar que variaban en tamaño y grosor, con una afinidad tintorial correspondiente a una bacteria Gram positiva, por ejemplo, es el caso de las cepas representadas en la Figura 3, donde **A₁ - A₂**: se identificó a la Cepa L108 con colonias redondas y blanquecinas en el cultivo en placa y para morfología microscópica se presentaron como Gram positivos con estructura y agrupación diplobacilar (alargada y delgados). Asimismo, para **B**: la Cepa de L121, tenía bacilos Gram positivos de tamaño mediano y agrupación en cadena. Por otra parte, para **C**: la Cepa L95 se caracterizó con morfología bacilar sin agrupación, Gram positiva con bacilos cortos y grosor mediano.



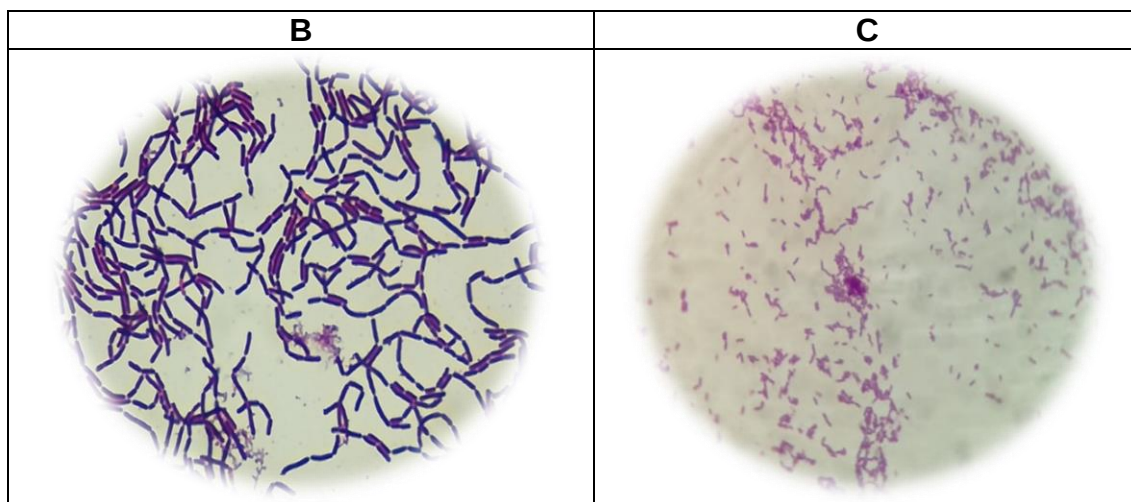


Figura 3. Caracterización microscópica de cepas de *Lactobacillus* mediante tinción de Gram. **A1:** Cultivo L108 en placa agar MRS; **A2:** Cepa L108; **B:** Cepa L121 y **C:** Cepa L95.

En la figura 4, los cultivos de *G. vaginalis* se identificaron por morfología macroscópica y microscópica (tinción de Gram). En relación a las características macroscópicas, se presentaron colonias puntiformes, β -hemolíticas en placas de agar sangre, de color grisáceo brillante (**A**). Por su parte, en el frotis con tinción de Gram del microbioma vaginal, se encontró células claves (Clue cells) que es característico de la presencia de la bacteria *G. vaginalis*. Por último, se realizó una observación microscópica para las colonias aisladas y se encontró bacterias pleomórficas y una variación de la afinidad tintorial Gram (positivo y negativo).

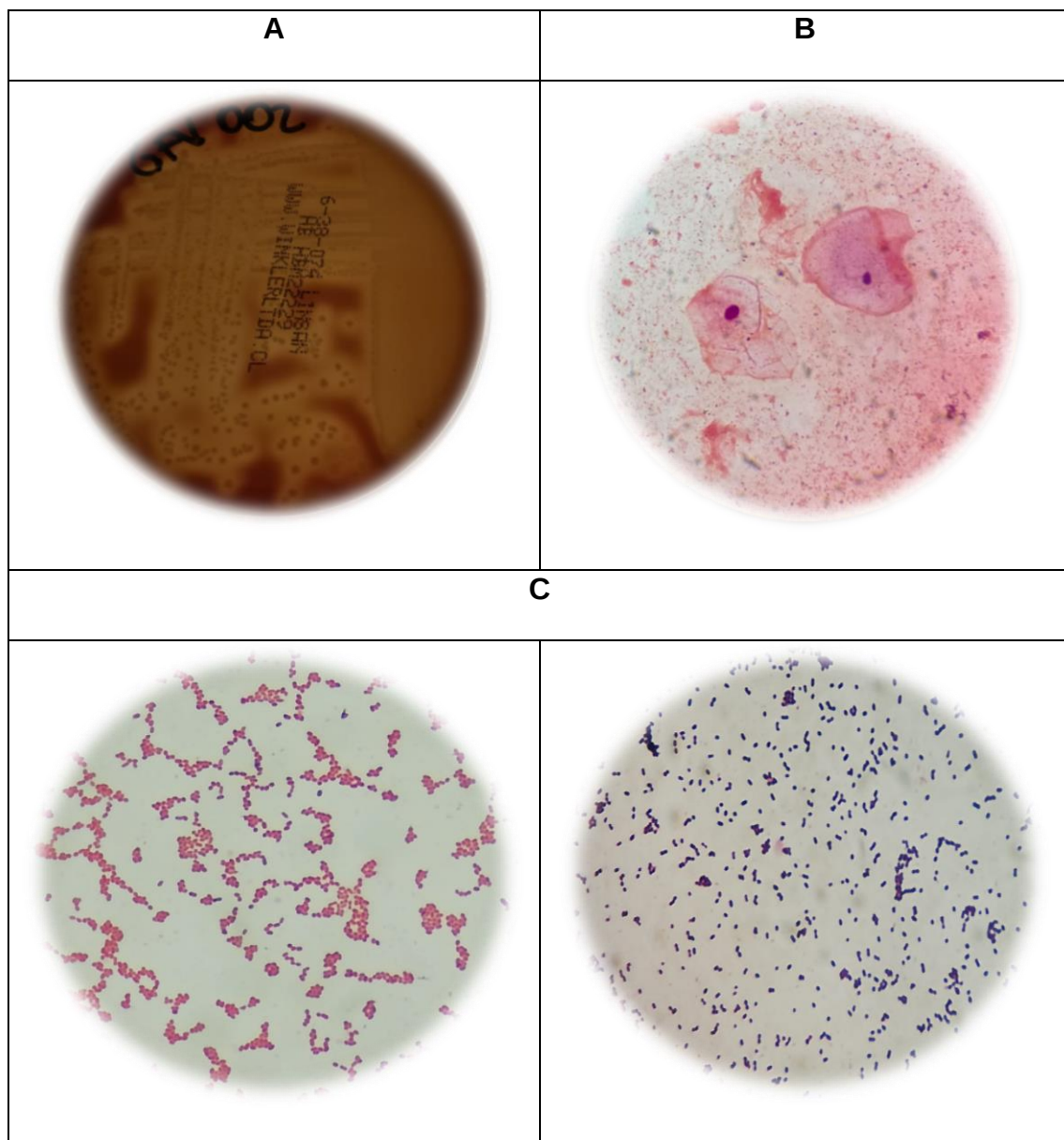


Figura 4. Caracterización macroscópica y microscópica de cepas de *G. vaginalis* mediante tinción de Gram. **A:** Cultivo en agar sangre (colonias puntiformes, β -hemolíticas); **B:** Frotis y tinción de microbioma vaginal con células epiteliales clave (clue cells); y **C:** Cepas pleomórficas de *G. vaginalis* Gram negativa y positiva, respectivamente.

Adicionalmente, se realizó las pruebas de catalasa y citocromo de oxidasa que resultaron negativas, que junto a las características morfológicas que se obtuvieron son enfatizado en la Tabla I.

Tabla I. Características relevantes de la identificación bacteriana.

	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
Macroscópica	Colonias blancas, redondas y pequeñas	Colonias redondas, puntiformes y pequeñas
Tinción Gram	Gram positivos	Gram negativos Gram variable
Pruebas bioquímicas	Catalasa (-) Citocromo oxidasa (-)	Catalasa (-) Citocromo oxidasa (-)

Fuente: Elaboración propia.

7.3. Determinación de la actividad antimicrobiana

7.3.1. Difusión en pocillos

El ensayo de difusión en pocillos permitió evaluar el cultivo completo y el sobrenadante no tratado de 100 cepas de *Lactobacillus* para determinar el efecto inhibitorio contra *G. vaginalis*, mediante la lectura de halos de inhibición.

En relación a los resultados, únicamente 16 cepas de *Lactobacillus* mostraron actividad anti-*Gardnerella vaginalis*, que según el criterio de Gaudana las cepas que presentaron una inhibición fuerte (++), tenían una zona de inhibición mayor a 2 mm y menor a 5 mm. En cambio, para una inhibición ligera (+), oscilaban en un rango de 1 a 2 mm.

En la Tabla II se muestra el análisis del cultivo completo (CC), donde 8 cepas presentaron una inhibición fuerte y las restantes poseían una inhibición ligera. Asimismo, se exhibe el sobrenadante sin tratamiento (SST), en el cual, 9 cepas de *Lactobacillus* pertenecían a la clasificación de inhibición ligera y en las restantes no hubo inhibición. Es decir, se descartaron las cepas que no mostraron actividad en el sobrenadante y, a su vez, las que tenían actividad fuerte en el cultivo completo, ya que no es de interés analizar la actividad de la bacteria, sino de sus metabolitos.

Tabla II. Actividad antimicrobiana del cultivo completo (CC) y sobrenadante sin tratamiento (SST) de *Lactobacillus* contra la cepa de *G. vaginalis*.

Promedio de halos de inhibición (mm) $\pm$ SD				
CÓDIGO CEPAS	CC X $\pm$ SD	CLASIFICACIÓN DE GAUDANA (CC)	SST X $\pm$ SD	CLASIFICACIÓN DE GAUDANA (SST)
979C	2,0 $\pm$ 0	+	1,7 $\pm$ 0,58	+
25A	2,0 $\pm$ 0	+	1,3 $\pm$ 0,58	+
28	3,3 $\pm$ 1,2	++	2,0 $\pm$ 0	+
69	2,7 $\pm$ 1,2	++	0 $\pm$ 0	-
89	2 $\pm$ 0	+	0 $\pm$ 0	-
90	2,7 $\pm$ 1,2	++	0 $\pm$ 0	-
91	3,7 $\pm$ 1,2	++	0 $\pm$ 0	-
95	2,7 $\pm$ 1,5	++	2,0 $\pm$ 1,0	+
100	2,0 $\pm$ 0	+	1,7 $\pm$ 0,58	+
105	2,0 $\pm$ 0	+	1,7 $\pm$ 0,58	+
108	3,0 $\pm$ 1,0	++	1,7 $\pm$ 0,58	+
113	2,0 $\pm$ 0	+	0 $\pm$ 0	-
114	3,3 $\pm$ 1,2	++	0 $\pm$ 0	-
115	3,3 $\pm$ 1,2	++	0 $\pm$ 0	-
118	3,3 $\pm$ 1,2	++	2,0 $\pm$ 0	+
121	2,0 $\pm$ 0	+	1,7 $\pm$ 0,58	+

Como se observa en la Tabla II, los resultados expresan como el promedio (X) de los halos de inhibición menos el tamaño del pocillo (6 mm) $\pm$ la desviación estándar (SD) correspondiente a 3 ensayos independientes. Fuente: Elaboración propia.

En la figura 5 se muestran variaciones de la zona de inhibición que generaron 9 cepas de *Lactobacillus* con actividad anti-*Gardnerella vaginalis*, los cuales, bordearon entre 7 a 10 mm de diámetro, registrado por el cultivo completo como el sobrenadante sin tratamiento. Por lo tanto, no existe diferencia significativa en la capacidad inhibitoria entre las cepas probadas hacia el patógeno.

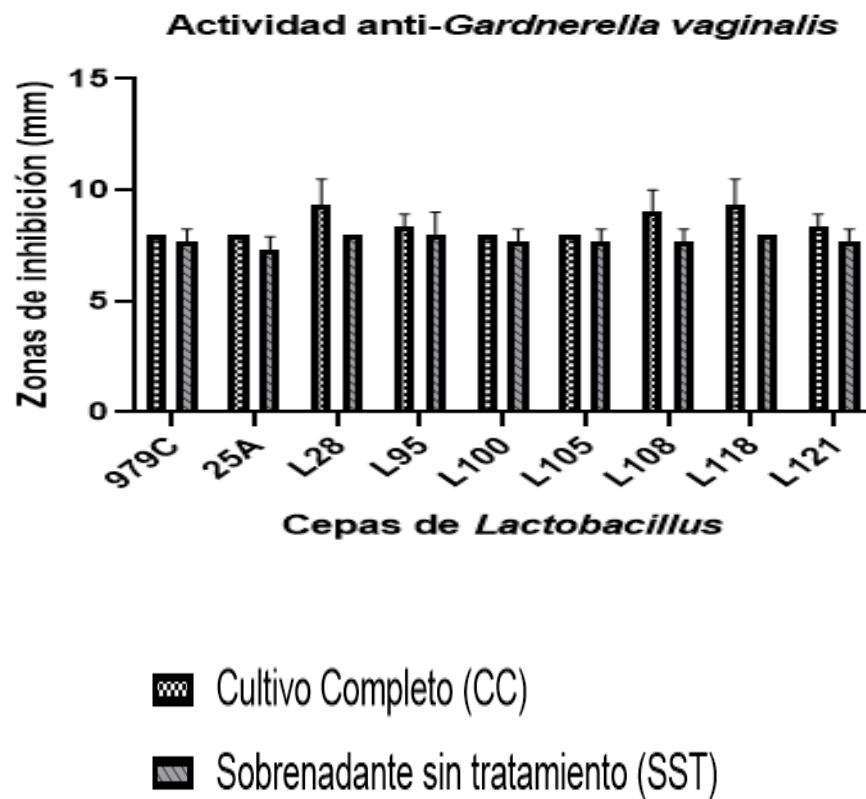
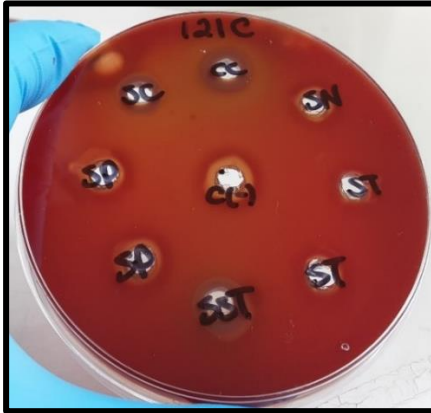


Figura 5. Zonas de inhibición (mm) de cepas con Actividad anti-*Gardnerella vaginalis* del cultivo completo y sobrenadante sin tratamiento. En el ensayo indicó diferencias estadísticamente no significativas (prueba de Tukey, $p \geq 0,05$) entre los grupos CC y SST. Fuente: elaboración propia.

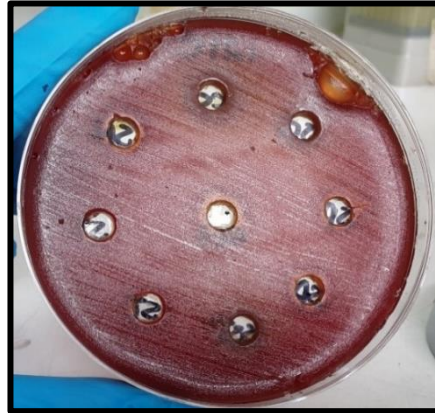
7.3.2. Difusión en pocillos con sobrenadantes tratados

El ensayo de difusión en pocillos con sobrenadantes tratados proporcionó los mecanismos de actividad que generaron las cepas de *Lactobacillus*. En consecuencia, se seleccionó 3 cepas (L121, L108 y L95) y se evaluó en el ensayo con un control negativo (C-: caldo MRS), el sobrenadante neutralizado (SN: pH 7). Por otra parte, para el sobrenadante pH 6,5 tratado con peroxidasa (SP) y el sobrenadante pH 7,5 tratado con tripsina (ST) se llevaron a condiciones de microaerobiosis a 37°C por 2 h y luego, al termobloque (65°C por 30 min), el cultivo completo (CC: sin centrifugado), el sobrenadante sin tratamiento (SST: 13.000 rpm por 1 min) y el sobrenadante calentado (SC: 120°C por 20 min). Por otra parte, la figura 3, se muestra las placas con los pocillos de sobrenadantes tratados respecto a las 3 cepas seleccionadas, que se representaron de la siguiente forma: **A₁ - A₂**: Cepa L121, **B₁ - B₂**: Cepa de L108 y **C₁ - C₂**: Cepa L95.

A₁



A₂



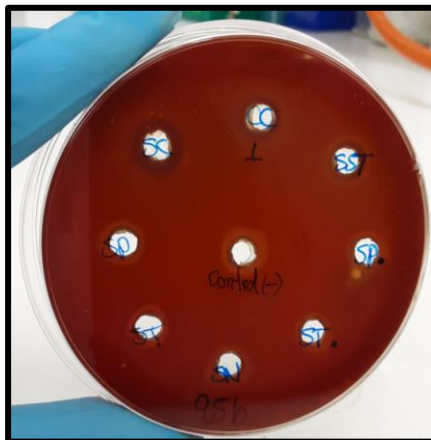
B₁



B₂



C₁



C₂

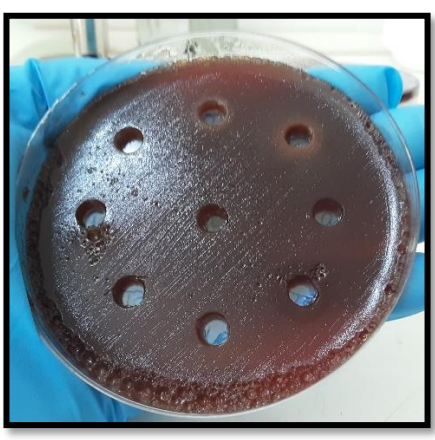


Figura 6. Ensayo de difusión en pocillos con sobrenadantes tratados para las cepas de *Lactobacillus* que presentaron actividad anti-*G. vaginalis* en placas de agar Mueller Hinton (5% sangre humana). **A₁ y A₂:** L121, **B₁ y B₂:** L108, **C₁ y C₂:** L95.

En relación con la Tabla III, los resultados están expresados como el promedio de halos de inhibición menos el tamaño del pocillo (6mm) $\pm$ la desviación estándar (SD) correspondiente a 3 ensayos independientes de difusión en pocillos con sobrenadantes tratados.

Tabla III. Actividad antimicrobiana exhibida por sobrenadantes de *Lactobacillus* tratados contra la cepa de *Gardnerella vaginalis*.

Promedio de Halos de inhibición (mm) $\pm$ SD							
Cepas	C-	SN	SP	ST	CC	SST	SC
<i>Lactobacillus</i>							
L121	0	0	0	0	2,7 $\pm$ 0,58	1,7 $\pm$ 0,58	1,3 $\pm$ 0,58
L108	0	0	0	0	3,0 $\pm$ 0	1,7 $\pm$ 0,58	1,3 $\pm$ 0,58
L95	0	0	0	0	2,3 $\pm$ 0,58	1,7 $\pm$ 0,58	1,3 $\pm$ 0,58

C-: Control negativo, **SN:** Sobrenadante neutralizado a pH 7, **SP:** Sobrenadante pH 6,5 tratado con peroxidasa, **ST:** Sobrenadante pH 7,5 tratado con tripsina, **CC:** Cultivo completo; **SST:** Sobrenadante sin tratamiento y **SC:** Sobrenadante calentado a 120°C por 20 min. En condiciones estándares a 37°C incubadas por 24 h en microaerobiosis.

En la figura 7 se representó la actividad del sobrenadante de las cepas L121, L108 y L95. Con ellas, se logró identificar el mecanismo de acción que produce el efecto inhibitorio sobre *G. vaginalis*. Donde, SN dio a conocer que la principal interacción está mediada por ácido láctico, a diferencia de SP que el metabolito causante del efecto fue el peróxido de hidrógeno y de manera particular, ST está definido por 2 mecanismos (ácido láctico y bacteriocinas termoestables). En otras palabras, al no presentaron halos de inhibición (0 mm), se consideró que presentaron cada uno de los mecanismos descritos. Además, se observó la relación entre SST y SC que demostró una mínima variación ($p \geq 0,05$), dando a entender que la interacción también está dada por H_2O_2 ya que es termolábil, lo que implica que la actividad estuvo mediada por los 3 agentes antimicrobianos mencionados.

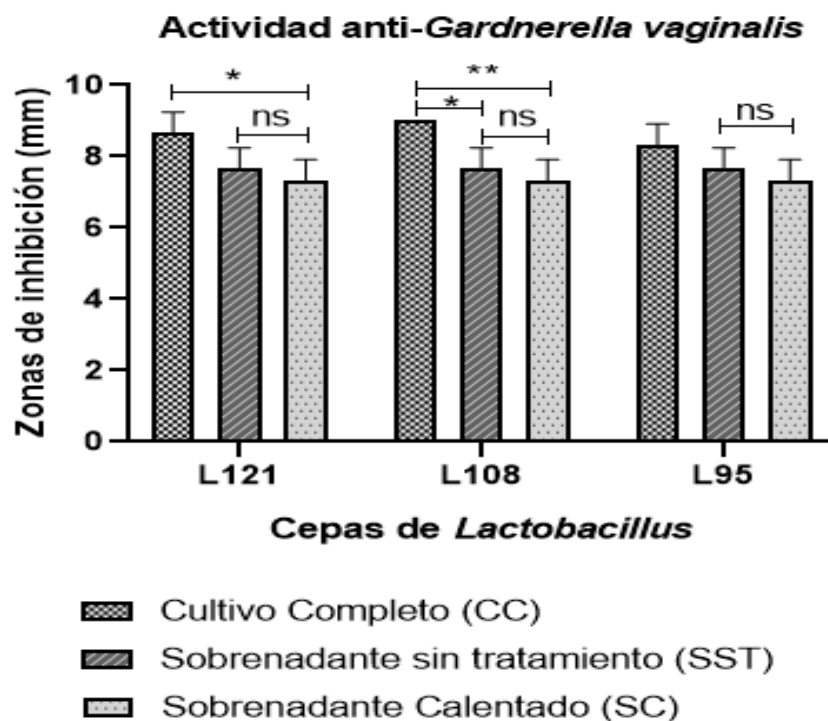


Figura 7. Zonas de inhibición (mm) de cepas *Lactobacillus* con potencial efecto inhibitorio sobre *G. vaginalis* en sobrenadantes tratados y sin tratamiento. En el ensayo respectivo: (ns) señala que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de SST y SC. (*); (**) indica diferencias estadísticamente significativas entre CC y SST. Fuente: Elaboración propia.

7.4. Cinética de inhibición

7.4.1. Cinética de muerte

La cinética de inhibición implicó evaluar cepas probióticas seleccionadas con actividad anti-*Gardnerella vaginalis* a lo largo de intervalos de tiempo para estudiar el comportamiento de la cepa bacteriana, utilizando una curva de muerte.

La tabla IV muestra la cinética de muerte de *G. vaginalis*, los resultados están expresados a partir de la cepa promedio de *G. vaginalis* (control) obtenidos en unidades formadoras de colonias por mililitros (UFC/ml), de acuerdo con la técnica de recuento bacteriano por microgota, que corresponde a 2 ensayos independientes a partir de un inóculo inicial McFarland 2.

Tabla IV. Recuento bacteriano de la cepa *Gardnerella vaginalis* en condiciones de máximo de crecimiento (McFarland 2).

Tiempo (h)	UFC/ml B1	UFC/ml B2	X(UFC/ml)	Log (UFC/ml)
0	5,00 E+09	5,67 E+08	2,78 E+09	9,44
2	1,33 E+09	1,47 E+09	1,40 E+09	9,15
4	2,00 E+09	1,20 E+09	1,60 E+09	9,20
6	3,00 E+09	1,60 E+09	2,30 E+09	9,36
8	2,67 E+09	2,43 E+09	2,55 E+09	9,41
12	4,00 E+09	2,47 E+09	3,23 E+09	9,51
16	2,83 E+09	2,43 E+09	2,63 E+09	9,42
24	2,83 E+09	2,27 E+09	2,55 E+09	9,41
48	4,00 E+08	5,67 E+08	4,83 E+08	8,68

A partir de la Tabla V y la Tabla VI se muestran las 3 cepas de *Lactobacillus* (L121, L108 y L95) expresados como el promedio de unidades formadoras de colonias por mililitros (UFC/ml), observadas según la técnica de recuento bacteriano, en cual, corresponde a 2 réplicas independientes probadas a una concentración específica de (5:1) y (10:1), respectivamente.

Tabla V. Recuento bacteriano de las cepas de *Lactobacillus* con efecto inhibitorio sobre *Gardnerella vaginalis* a una concentración (5:1).

Cepas de <i>Lactobacillus</i> concentración (5:1)			
	L121	L108	L95
Tiempo (h)	Promedio (UFC/ml)	Promedio (UFC/ml)	Promedio (UFC/ml)
0	5,83 E+08	5,23 E+08	2,70 E+08
4	2,65 E+07	1,31 E+07	1,73 E+07
8	1,32 E+07	1,83 E+07	2,07 E+06
12	5,18 E+06	3,53 E+06	4,77 E+06
16	7,83 E+06	5,53 E+06	6,88 E+06
20	9,17 E+06	8,00 E+06	6,17 E+06
24	1,38 E+07	7,62 E+06	1,07 E+07
48	8,00 E+06	2,75 E+06	4,23 E+06

Tabla VI. Recuento bacteriano de las cepas de *Lactobacillus* con efecto inhibitorio sobre *Gardnerella vaginalis* a una concentración (10:1).

Cepas de <i>Lactobacillus</i> concentración (10:1)			
	L121	L108	L95
Tiempo (h)	Promedio (UFC/ml)	Promedio (UFC/ml)	Promedio (UFC/ml)
0	2,75 E+08	1,93 E+08	2,42 E+08
4	9,20 E+06	6,25 E+06	8,17 E+06
8	8,08 E+06	5,10 E+06	7,17 E+06
12	4,13 E+06	4,67 E+06	6,83 E+06
16	7,00 E+06	5,65 E+06	8,17 E+06
20	7,83 E+06	5,33 E+06	3,68 E+06
24	1,30 E+07	1,30 E+07	4,07 E+06
48	6,33 E+06	7,17 E+06	7,48 E+06

En la figura 8 contiene incorporada la cinética de muerte de *G. vaginalis* expresada en UFC/ml a diferentes intervalos de tiempo como control. Además, se comparó a qué concentración de sobrenadante de las cepas *Lactobacillus* fue eficaz para inhibir el inóculo de *G. vaginalis*, con los datos mencionados anteriormente (Tablas IV, V y VI). Donde se evalúa en **A**: Cepa L121, **B**: Cepa L108 y **C**: Cepa L95.

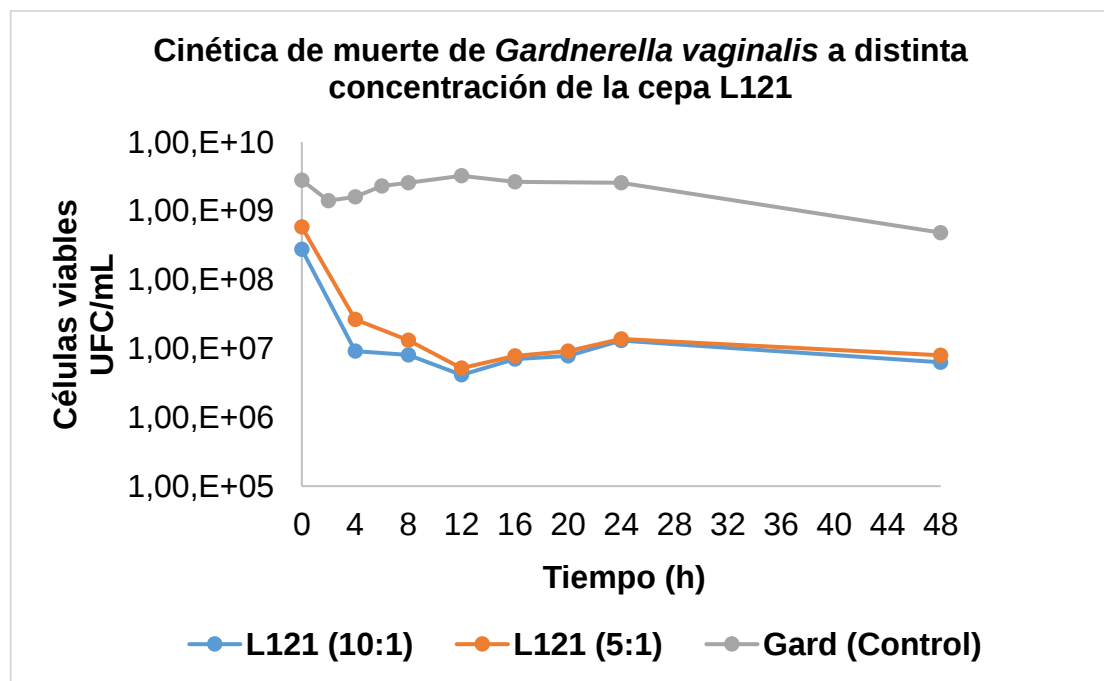


Figura 8 (A). Cinética de muerte de *Gardnerella vaginalis* cuando se varía la concentración de la cepa L121.

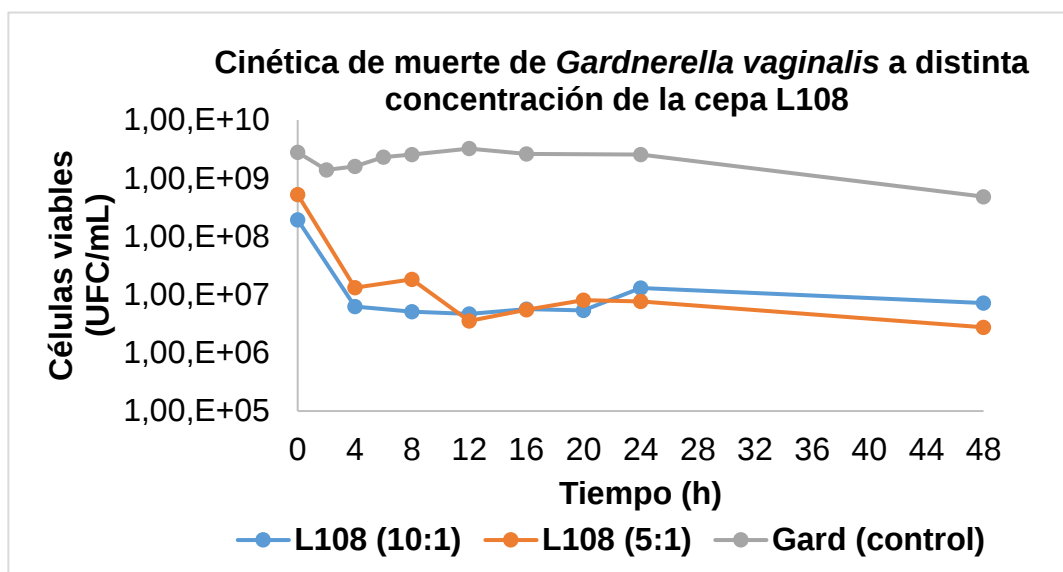


Figura 8 (B). Cinética de muerte de *Gardnerella vaginalis* cuando se varía la concentración de la cepa L108.

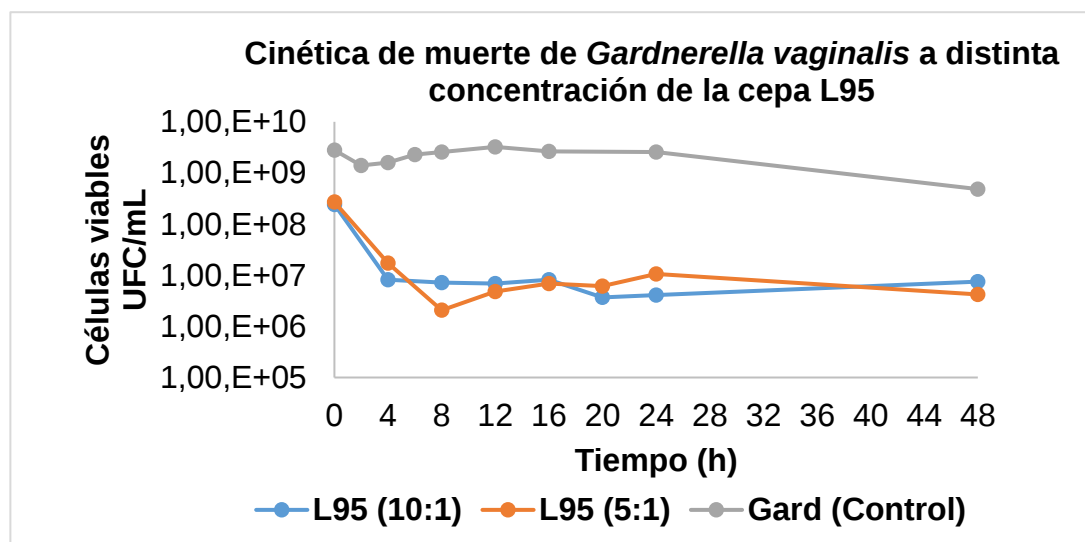


Figura 8 (C). Cinética de muerte de *Gardnerella vaginalis* cuando se varía la concentración de la cepa L95.

En la Tabla VII se indican los resultados expresados en porcentajes de la mortalidad de las cepas de *Lactobacillus* para comparar cuál concentración condujo a una inhibición más efectiva.

Las tres cepas bacterianas, obtuvieron un mayor porcentaje de mortalidad en la concentración (5:1). Donde, en la cepa L108 tuvo una mejor tendencia al criterio de Pearson, seleccionándola como una alternativa probiótica.

Tabla VII. Mortalidad de cepas de *Lactobacillus* con actividad anti-*Gardnerella vaginalis* exhibida a distintas concentraciones.

Cepas de <i>Lactobacillus</i>	% Mortalidad a Concentración (5:1)	% Mortalidad a Concentración (10:1)
L121	98,63	97,70
L108	99,47	96,29
L95	98,43	96,90

Fuente: Elaboración propia.

A nivel mundial se considera que hay un aumento sustancial de la vaginosis bacteriana con predominio de bacterias anaeróbicas (Saraf et al., 2021) como es el caso de las cepas de *G. vaginalis*, que se ha demostrado una alta resistencia a antibióticos como el metronidazol (Morselli et al., 2023; Zhang et al., 2022). En Chile, no hay estudios actualizados sobre la prevalencia de VB, sin embargo, lo anunciado en el año 2006 se clasifica como una tasa elevada (Perinatal, 2015). Esto indica que se deben hallar nuevos enfoques terapéuticos, que complementen de forma trascendental el empleo de antibióticos para el tratamiento y disminución de la afección de la microbiota vaginal.

Dentro de las potenciales soluciones emergentes, existen diversos antecedentes que han demostrado el rol de probióticos contra la vaginosis bacteriana. Sin embargo, aún se sigue investigando sobre los efectos inhibitorios para *G. vaginalis*. De hecho, la participación de los metabolitos que secretan los *Lactobacillus* son determinantes para proyecciones futuras, puesto que ayudan a controlar las condiciones de acidez del microbioma vaginal (Chetwin et al., 2019; H. Kim et al., 2021; J. Y. Kim et al., 2023; B. Mohankumar et al., 2022; Scillato et al., 2021; Zheng et al., 2021).

Una estrategia alternativa para el tratamiento de vaginosis bacteriana, es el uso de probióticos. Por este motivo, la búsqueda de nuevas cepas de *Lactobacillus* para este estudio, es determinante para el tratamiento de VB, en particular, con efecto inhibitorio en *G. vaginalis*. Es fundamental el solo hecho de tener una microbiota vaginal equilibrada y, las bacterias que ejercen ese rol son los *Lactobacillus*, que han sido investigado ampliamente, por su efecto antimicrobiano con actividad dada por metabolitos como el ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Chetwin et al., 2019; Herrera, 2021; Huang et al., 2023; Oldak et al., 2017; Perez et al., 2018; Prabhurajeshwar & Chandrakanth, 2019).

En este estudio que se realizó se ha planteado que el efecto inhibitorio de las cepas de *Lactobacillus* está dado por los 3 mecanismos de acción mencionados anteriormente, lo cual, se ha orientado principalmente al ácido láctico; metabolito que ayuda a mantener la acidez, y a su vez, el equilibrio en la microbiota vaginal. Tal es su importancia que según Huang et al. (2023) expuso que el ácido láctico previene el incremento de bacterias oportunistas como es el caso de *G. vaginalis* y con ello, la VB causada por este patógeno mediante cepas de *Lactobacillus rhamnosus*.

En este trabajo, se cumplió el propósito de evaluar 100 cepas de *Lactobacillus* mediante la reactivación de cepario, de tal modo, que la identificación macroscópica y microscópica tienen un papel importante para determinar si las cepas se acercan a los estándares de una cepa probiótica. Para ello la revisión de la siguiente literatura aborda las condiciones que una cepa probiótica debe alcanzar (de Melo Pereira et al., 2018; Han & Ren, 2021; Hanson et al., 2016). En base a lo que se encontró, 90 cepas cumplían con lo descrito, por lo cual, se seleccionaron para la búsqueda del efecto de inhibición para el patógeno *G. vaginalis* mediante en ensayos de difusión en pocillos.

Con el respaldo de los resultados obtenidos, la inhibición bacteriana de las diferentes cepas de *Lactobacillus* probadas sobre *G. vaginalis* destacó una actividad. Sin embargo, no hay diferencias significativas entre las dieciséis cepas de *Lactobacillus* evaluadas por el ensayo de difusión de pocillos. Pese a todo, se comprobó bajo el criterio Gaudana et al. (2010) que 9 cepas del cultivo completo (CC) presentaban inhibición fuerte y las cepas restantes obtuvieron actividad ligera. Por lo tanto, al descartarse un gran rango de cepas se decidió realizar el mismo ensayo, pero con el sobrenadante para verificar si la actividad estaba dada por los metabolitos propuestos. Por otra parte, las cepas que no se obtuvieron actividad, variaban entre cero a 1 mm en las medidas observadas en el pocillo.

En conformidad con los datos arrojados, la aplicación del ensayo en pocillos con sobrenadantes tratados tuvo la finalidad de encontrar el mecanismo de las cepas de *Lactobacillus* que presentaron un efecto inhibitorio. Particularmente, se determinaron las cepas que presentaron actividad tanto en el cultivo completo como en el sobrenadante del ensayo anterior. Demostrando, que la actividad, de las cepas está dada por ácido láctico y peróxido de hidrógeno principalmente.

Con respecto a la literatura revisada, el ácido láctico contribuye de manera eficaz a la eubiosis de la microbiota, generando condiciones adecuadas para las especies de *Lactobacillus* y garantiza su predominio en la edad fértil de una mujer (Pendharkar et al., 2023). En cambio, el peróxido de hidrógeno que se caracteriza por ser un buen oxidante, puede tener un buen protagonismo frente a una disbiosis o ser el responsable de ella, lo cual se menciona en los siguientes artículos (Kalia et al., 2020; O'Hanlon et al., 2011). Entonces, se señala que la mejor interacción de las cepas de *Lactobacillus* se genera mediante ácido láctico sobre *G. vaginalis*. En otras palabras, faltó realizar un ensayo cuantitativo de qué concentración de ácido láctico obtuvo cada cepa con la actividad anti-*Gardnerella vaginalis*, que se han sugerido algunas investigaciones (García et al., 2017; Huang et al., 2023). De esta forma, las 3 cepas obtenidas (L95, L108 y L121) bajo el ensayo de difusión de pocillos con sobrenadantes tratados no arrojaron resultados estadísticamente significativos mediante la prueba de Tuckey.

Sin embargo, los análisis comparativos de los resultados obtenidos en esta investigación, les faltó la caracterización de las cepas de *Lactobacillus* para obtener un contraste más cercano a lo mencionado por otros autores.

Hoy en día se ha demostrado que la eficacia de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* es un potencial candidato para las vaginosis bacteriana y se está probando frente a *Gardnerella vaginalis* (Huang et al., 2023; Miquel et al., 2022) y otros patógenos de espectro vaginal. Donde, Huang et al. (2023) expone por el método de difusión en pocillos la evaluación de agentes antimicrobianos. Por otra parte, hay un estudio reciente que muestra que la inhibición de biopelículas de *G. vaginalis* mediante *L. iners*, aunque no está esclarecido si esta especie tiene un rol de acción completamente beneficioso para la salud vaginal (L. Li et al., 2023). Desde este punto de vista, no se ha encontrado un probiótico específico para *G. vaginalis*, lo que indicaría que se debe seguir incursionando en los *Lactobacillus*.

En relación a la cinética de inhibición (curva de muerte) determinada sobre la actividad anti-*Gardnerella vaginalis*, se realizó un duplicado por cada cepa de *Lactobacillus* y los parámetros cinéticos son independientes entre sí. Esta técnica permite comparar la eficacia de las cepas que poseen actividad anti- *Gardnerella vaginalis* mediante el recuento por microgotas. (García et al., 2017).

En esta perspectiva, se logra obtener un resultado de eficacia expuesto en la Tabla VII donde se muestra la mortalidad expresado en porcentajes con valores de 98,43%, 99,47% y 98,63%, respectivamente. En el artículo reportado por Pearson et al. (1980), consta que se debe cumplir un 99,99% de eficacia para considerar una muerte bacteriana. En base a esto, encontrar cepas con actividad anti-*Gardnerella vaginalis* mediante concentraciones elevadas de sobrenadante fue una gran desventaja. Dado que, hubiese sido interesante identificar cepas con una actividad antimicrobiana muy fuerte en el sobrenadante y así obtener un resultado de eficacia óptimo y no darle ventaja a la cepa de *Lactobacillus* frente a la del patógeno.

En este contexto, se demuestra que los resultados obtenidos en esta investigación no lograron una muerte para la cepa de *Gardnerella vaginalis*. Sin embargo, la actividad de las cepas de *Lactobacillus* (L95, L108 y L121) son idóneas para considerarlo como una futura cepa probiótica con efecto inhibitorio para el patógeno de *G. vaginalis*.

Eventualmente, el aumento de vaginosis bacteriana en mujeres de edad reproductiva ha generado preocupación por las altas tasas de resistencia de antibióticos, particularmente, por metronidazol y clindamicina, que actualmente son el principal tratamiento para *G. vaginalis* y que no son completamente satisfactorios (T. Li et al., 2020). Entonces, el uso excesivo de antibióticos conduce a infecciones recurrentes (Webb, 2021), en el cual, alrededor de un 70% de la población presenta vaginosis bacteriana, donde un 95% de los pacientes tiene dominio de *G. vaginalis* en su microbioma vaginal (J. Y. Kim et al., 2023). En estos casos, el tratamiento sugerido pierde la eficacia después de una vaginosis bacteriana recurrente, lo que conlleva a sugerir nuevos blancos terapéuticos.

Finalmente, los probióticos se han integrado como nuevas estrategias de prevención para la vaginosis bacteriana, siendo una búsqueda oportuna en combatir la disbiosis mediante el fortalecimiento del microbioma vaginal, ayudando a disminuir la incidencia de *G. vaginalis* y otras bacterias patógenas. De hecho, en la actualidad el tratamiento combinado de antibióticos y probióticos es la modalidad que propicia una tendencia asertiva en la reducción de la recurrencia bacteriana en la microbiota vaginal.

9.

CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

A partir de la evidencia entregada por este estudio, se encontraron 3 cepas de *Lactobacillus* (L95, L108 y L121) con actividad anti-*Gardnerella vaginalis*. En el cual, las cepas lideran los 3 mecanismos planteados, es decir, son aptas en la producción de ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, que según con los resultados esperados se cumple con lo estipulado en la hipótesis y, asimismo, con los objetivos específicos 2 y 3. Por lo tanto, con respecto a las 3 cepas mencionadas no hubo diferencias significativas para el ensayo de difusión en pocillos con sobrenadantes tratados.

A raíz de lo anterior, se enfatiza en conocer la efectividad de la cinética de inhibición de la actividad presentada por las cepas de *Lactobacillus* y dando a conocer el estrecho margen de porcentaje, la cepa L108 en una concentración (5:1) presenta un 99,47% de mortalidad, lo que se considera efectivo, pero no alcanza con el porcentaje estipulado del criterio de Pearson (99,99%), para plantearse una muerte para *Gardnerella vaginalis*.

Para una mayor caracterización de las cepas, se recomienda realizar técnicas moleculares como la identificación de PCR del gen 16S para garantizar la identificación de las especies de dichas cepas. Además, es necesario evaluar una menor concentración de los *Lactobacillus*, que, en paralelo otorgará una estandarización y que sea significativamente competente frente a un antibiótico.

Los resultados obtenidos en la cinética de *Gardnerella* son preliminares, puesto que solo es un acercamiento al desarrollo de nuevas estrategias que reemplazaría el uso de antibióticos. Por esta razón, se debe profundizar en las investigaciones de cepas probióticas ya que pueden ser de gran ayuda en la producción de metabolitos que aportan al microbioma equilibrio frente a una disbiosis.

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo pueden ser evaluados frente a otros patógenos y así, permitirían concluir si estas cepas de *Lactobacillus* pueden ser candidatas para el desarrollo de un probiótico formulado contra otros patógenos del microbioma vaginal.

- Abou Chacra, L., Fenollar, F., & Diop, K. (2021). Bacterial Vaginosis: What Do We Currently Know? *Front Cell Infect Microbiol*, 11, 672429. doi:10.3389/fcimb.2021.672429
- Akgül, T., & Karakan, T. (2018). The role of probiotics in women with recurrent urinary tract infections. *Turk J Urol*, 44(5), 377-383. doi:10.5152/tud.2018.48742
- Bagnall, P., & Rizzolo, D. (2017). Bacterial vaginosis: A practical review. *Journal of the American Academy of PAs*, 30(12), 15-21. doi:10.1097/01.JAA.0000526770.60197.fa
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. doi:https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005
- Chetwin, E., Manhanzva, M. T., Abrahams, A. G., Froissart, R., Gamiieldien, H., Jaspan, H., Jaumdally, S. Z., Barnabas, S. L., Dabee, S., Happel, A. U., Bowers, D., Davids, L., Passmore, J. S., & Masson, L. (2019). Antimicrobial and inflammatory properties of South African clinical Lactobacillus isolates and vaginal probiotics. *Sci Rep*, 9(1), 1917. doi:10.1038/s41598-018-38253-4
- Coudray, M., & Madhivanan, P. (2020). Bacterial vaginosis-A brief synopsis of the literature. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 245, 143-148. doi:10.1016/j.ejogrb.2019.12.035
- de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Magalhães Júnior, A. I., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnol Adv*, 36(8), 2060-2076. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.09.003
- Díaz, V. (2020). *Desarrollo de controles positivos para la detección molecular de microorganismos de transmisión sexual de difícil crecimiento in vitro*. (Licenciatura Tesis de Licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla,

- Fernández, L., & Castillo, M. (2007). *Lactobacillus spp: importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora*: Editorial Universitaria.
- García, A., Navarro, K., Sanhueza, E., Pineda, S., Pastene, E., Quezada, M., Henríquez, K., Karlyshev, A., Villena, J., & González, C. (2017). Characterization of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C, a probiotic strain with a potent anti-*Helicobacter pylori* activity. *Electronic Journal of Biotechnology*, 25, 75-83. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.11.008>
- Gaudana, S. B., Dhanani, A. S., & Bagchi, T. (2010). Probiotic attributes of *Lactobacillus* strains isolated from food and of human origin. *British Journal of Nutrition*, 103(11), 1620-1628. doi:10.1017/S0007114509993643
- Goldstein, E. J. C., Tyrrell, K. L., & Citron, D. M. (2015). *Lactobacillus* Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases*, 60(suppl_2), S98-S107. doi:10.1093/cid/civ072
- Han, Y., & Ren, Q.-I. (2021). Does probiotics work for bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis. *Current Opinion in Pharmacology*, 61, 83-90. doi:<https://doi.org/10.1016/j.coph.2021.09.004>
- Hanson, L., VandeVusse, L., Jermé, M., Abad, C., & Safdar, N. (2016). Probiotics for Treatment and Prevention of Urogenital Infections in Women: A Systematic Review. *Journal of Midwifery & Women's Health*, 61(3), 339-355. doi:<https://doi.org/10.1111/jmwh.12472>
- Hebel-Gerber, S., García-Cancino, A., Urbina, A., Simirgiotis, M. J., Echeverría, J., Bustamante-Salazar, L., Sáez-Carrillo, K., Alarcón, J., & Pastene-Navarrete, E. (2021). Chilean Rhubarb, *Gunnera tinctoria* (Molina) Mirb. (Gunneraceae): UHPLC-ESI-Orbitrap-MS Profiling of Aqueous Extract and its Anti-*Helicobacter pylori* Activity. *Frontiers in Pharmacology*, 11. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2020.583961>
- Hernández, A. (2017). *Comparación entre los métodos de Amsel, Nugent, Ison-Hay para el diagnóstico de vaginosis bacteriana en el Hospital Regional ISSSTE Puebla*. (Tesis de Licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla México. Retrieved from <https://hdl.handle.net/20.500.12371/13290>

- Herrera, L. (2021). *Vaginosis Bacteriana. Tratamiento con ácido láctico vs metronidazol en pacientes ginecológicas en el Hospital de Ginecología y Obstetricia del Instituto materno infantil del Estado de México de Abril a Septiembre de 2019.* (Especialidad). Universidad Autónoma del Estado de México, México. Retrieved from <http://hdl.handle.net/20.500.11799/111312>
- Huang, Y.-P., Shi, J.-Y., Luo, S.-C., Xu, S.-Y., Zhang, J.-D., Molnár, I., Yang, Q.-Q., & Zhang, B.-B. (2023). Antimicrobial Substances and Mechanisms of *Lactobacillus rhamnosus* against *Gardnerella vaginalis*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 15(2), 400-410. doi:10.1007/s12602-022-10019-5
- Hyemin, K., YongGyeong, K., & Chang-Ho, K. (2021). In Vivo Confirmation of the Antimicrobial Effect of Probiotic Candidates against *Gardnerella vaginalis*. *Microorganisms*, 9(8). doi:10.3390/microorganisms9081690
- Kalia, N., Singh, J., & Kaur, M. (2020). Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: a critical review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 19(1), 5. doi:10.1186/s12941-020-0347-4
- Kim, H., Kim, Y., & Kang, C. H. (2021). In Vivo Confirmation of the Antimicrobial Effect of Probiotic Candidates against *Gardnerella vaginalis*. *Microorganisms*, 9(8). doi:10.3390/microorganisms9081690
- Kim, J. Y., Moon, E. C., Kim, J. Y., Kim, H. J., Heo, K., Shim, J. J., & Lee, J. L. (2023). *Lactobacillus helveticus* HY7801 ameliorates bacterial vaginosis by inhibiting biofilm formation and epithelial cell adhesion of *Gardnerella vaginalis*. *Food Sci Biotechnol*, 32(4), 507-515. doi:10.1007/s10068-022-01208-7
- Knapp, S. (2020). *Gardnerella Vaginalis*. Retrieved from <https://biologydictionary.net/gardnerella-vaginalis/>
- Lehtoranta, L., Hibberd, A. A., Reimari, J., Junnila, J., Yeung, N., Maukonen, J., Crawford, G., & Ouwehand, A. C. (2020). Recovery of Vaginal Microbiota After Standard Treatment for Bacterial Vaginosis Infection: An Observational Study. *Microorganisms*, 8(6). doi:10.3390/microorganisms8060875
- Li, L., Zhang, J., Zhou, L., Shi, H., Mai, H., Su, J., Ma, X., & Zhong, J. (2023). The First Lanthipeptide from *Lactobacillus iners*, Inecin L, Exerts High Antimicrobial Activity against Human Vaginal Pathogens. *Appl Environ Microbiol*, 89(3), e0212322. doi:10.1128/aem.02123-22

- Li, T., Zhang, Z., Wang, F., He, Y., Zong, X., Bai, H., & Liu, Z. (2020). Antimicrobial Susceptibility Testing of Metronidazole and Clindamycin against *Gardnerella vaginalis* in Planktonic and Biofilm Formation. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2020, 1361825. doi:10.1155/2020/1361825
- Li, Y., Jiang, Y., Lessing, D. J., & Chu, W. (2022). Exploring of probiotic potential vaginal lactobacillus isolates from healthy women against *Gardnerella vaginalis* and *Caenorhabditis elegans* model testing. *Journal of Applied Microbiology*, 133(3), 1392-1401. doi:https://doi.org/10.1111/jam.15643
- Lyra, A., Ala-Jaakkola, R., Yeung, N., Datta, N., Evans, K., Hibberd, A., Lehtinen, M. J., Forssten, S. D., Ibarra, A., Pesonen, T., Junnila, J., Ouwehand, A. C., Baranowski, K., Maukonen, J., Crawford, G., & Lehtoranta, L. (2023). A Healthy Vaginal Microbiota Remains Stable during Oral Probiotic Supplementation: A Randomised Controlled Trial. *Microorganisms*, 11(2). doi:10.3390/microorganisms11020499
- Martín, R., Soberón, N., Vázquez, F., & Suárez, J. (2008). La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(3), 160-167. doi:https://doi.org/10.1157/13116753
- Martínez, J., Vargas, A., Pérez, T., Encío, I. J., Cabello, M., & Barajas, M. (2021). Human Microbiota Network: Unveiling Potential Crosstalk between the Different Microbiota Ecosystems and Their Role in Health and Disease. *Nutrients*, 13(9). doi:10.3390/nu13092905
- Merchán, K., León, A., Valero, N., Quiroz, V., & Álava, M. (2020). Vaginosis bacteriana en mujeres ecuatorianas en edad reproductiva epidemiología y efectividad de los criterios diagnósticos. *Dominio de las Ciencias*, 6, 236-265.
- Miquel, S., Verlaquet, J., Garcin, S., Bertran, T., Evrard, B., Forestier, C., & Varelle-Delarbre, M. (2022). *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35 Stimulates Epithelial Vaginal Defenses upon *Gardnerella vaginalis* Infection. *Infect Immun*, 90(9), e0030922. doi:10.1128/iai.00309-22
- Mohankumar, B., Shandil, R. K., Narayanan, S., & Krishnan, U. M. (2022). Vaginosis: Advances in new therapeutic development and microbiome restoration. *Microbial Pathogenesis*, 168. doi:10.1016/j.micpath.2022.105606

- Mohankumar, B., Shandil, R. K., Narayanan, S., & Krishnan, U. M. (2022). Vaginosis: Advances in new therapeutic development and microbiome restoration. *Microbial Pathogenesis*, 168, 105606. doi:<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105606>
- Morselli, S., Salvo, M., Foschi, C., Lazzarotto, T., Ambretti, S., & Marangoni, A. (2023). Characterization of Gardnerella vaginalis isolates: correlations among clades, biofilm formation and cytokine stimulation. *New Microbiol*, 46(1), 56-59.
- Nader, M., De Gregorio, P., & Silva, J. (2021). Probiotic lactobacilli in formulas and hygiene products for the health of the urogenital tract. *Pharmacology Research & Perspectives*, 9(5), e00787. doi:<https://doi.org/10.1002/prp2.787>
- O'Hanlon, D. E., Moench, T. R., & Cone, R. A. (2011). In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. *BMC infectious diseases*, 11, 200. doi:10.1186/1471-2334-11-200
- Olđak, A., Zielińska, D., Rzepkowska, A., & Kołozyn-Krajewska, D. (2017). Comparison of Antibacterial Activity of Lactobacillus plantarum Strains Isolated from Two Different Kinds of Regional Cheeses from Poland: Oscypek and Korycinski Cheese. *BioMed research international*, 2017, 6820369. doi:10.1155/2017/6820369
- Park, S.-H., Lee, E. S., Park, S. T., Jeong, S. Y., Yun, Y., Kim, Y., Jeong, Y., Kang, C.-H., & Choi, H. J. (2023). Efficacy and Safety of MED-01 Probiotics on Vaginal Health: A 12-Week, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Nutrients*, 15(2). doi:10.3390/nu15020331
- Pearson, R. D., Steigbigel, R. T., Davis, H. T., & Chapman, S. W. (1980). Method of reliable determination of minimal lethal antibiotic concentrations. *Antimicrob Agents Chemother*, 18(5), 699-708. doi:10.1128/aac.18.5.699
- Pendharkar, S., Skafte-Holm, A., Simsek, G., & Haahr, T. (2023). Lactobacilli and Their Probiotic Effects in the Vagina of Reproductive Age Women. *Microorganisms*, 11(3). doi:10.3390/microorganisms11030636
- Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2018). Circular and Leaderless Bacteriocins: Biosynthesis, Mode of Action, Applications, and Prospects. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.02085

- Perinatal, G. (2015). Subsecretaría de Salud Pública División Prevención y Control de Enfermedades Departamento de Ciclo Vital. Programa Nacional Salud de la Mujer. Chile. Hallado en: https://www.minsal.cl/sites/default/files/files/GUIA%20PERINATAL_2015_%20PARA%20PUBLICAR.pdf, 13.
- Pessoa, W. F. B., Melgaço, A. C. C., de Almeida, M. E., Ramos, L. P., Rezende, R. P., & Romano, C. C. (2017). In Vitro Activity of Lactobacilli with Probiotic Potential Isolated from Cocoa Fermentation against *Gardnerella vaginalis*. *BioMed research international*, 2017, 3264194. doi:10.1155/2017/3264194
- Pino, A., Bartolo, E., Caggia, C., Cianci, A., & Randazzo, C. L. (2019). Detection of vaginal lactobacilli as probiotic candidates. *Sci Rep*, 9(1), 3355. doi:10.1038/s41598-019-40304-3
- Plummer, E. L., Bradshaw, C. S., Doyle, M., Fairley, C. K., Murray, G. L., Bateson, D., Masson, L., Slifirski, J., Tachedjian, G., & Vodstrcil, L. A. (2021). Lactic acid-containing products for bacterial vaginosis and their impact on the vaginal microbiota: A systematic review. *PLoS One*, 16(2), e0246953. doi:10.1371/journal.pone.0246953
- Prabhurajeshwar, C., & Chandrakanth, K. (2019). Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria in-vitro by probiotic Lactobacilli strains isolated from commercial yoghurt. *Clinical Nutrition Experimental*, 23, 97-115. doi:10.1016/j.yclnex.2018.10.001
- Qian, Z., Zhu, H., Zhao, D., Yang, P., Gao, F., Lu, C., Yin, Y., Kan, S., & Chen, D. (2021). Probiotic Lactobacillus sp. Strains Inhibit Growth, Adhesion, Biofilm Formation, and Gene Expression of Bacterial Vaginosis-Inducing *Gardnerella vaginalis*. *Microorganisms*, 9(4). doi:10.3390/microorganisms9040728
- Rajab, S., Tabandeh, F., Shahraky, M. K., & Alahyaribeik, S. (2020). The effect of lactobacillus cell size on its probiotic characteristics. *Anaerobe*, 62, 102103. doi:https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.102103
- Sacoto, J. (2014). *Gardnerella vaginalis*, en pacientes con vaginosis bacteriana, que acuden a la consulta ginecológica en el Hospital de Girón, durante el período enero - junio del 2014. (Tesis de Maestría). Universidad de Guayaquil, Ecuador. Retrieved from <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/46423>

- Sanchez, I. (2018). *Evaluación del Score Nugent para el diagnóstico de Gardnerella Vaginalis en gestantes atendidas en el policlínico EsSalud Juliaca, 2017 - 2018*. (Licenciatura Tecnología Médica). Universidad Alas Peruanas, Perú.
- Saraf, V., Sheikh, S., Ahmad, A., Gillevet, P., Bokhari, H., & Javed, S. (2021). Vaginal microbiome: normalcy vs dysbiosis. *Archives of Microbiology*, 203(7), 3793-3802. doi:10.1007/s00203-021-02414-3
- Scillato, M., Spitale, A., Mongelli, G., Privitera, G. F., Mangano, K., Cianci, A., Stefani, S., & Santagati, M. (2021). Antimicrobial properties of Lactobacillus cell-free supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens. *Microbiologyopen*, 10(2), e1173. doi:10.1002/mbo3.1173
- Tachedjian, G., Aldunate, M., Bradshaw, C. S., & Cone, R. A. (2017). The role of lactic acid production by probiotic Lactobacillus species in vaginal health. *Research in Microbiology*, 168(9), 782-792. doi:https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.04.001
- Vodstrcil, L. A., Muzny, C. A., Plummer, E. L., Sobel, J. D., & Bradshaw, C. S. (2021). Bacterial vaginosis: drivers of recurrence and challenges and opportunities in partner treatment. *BMC Medicine*, 19(1), 194. doi:10.1186/s12916-021-02077-3
- Webb, L. (2021). Probiotics for preventing recurrent bacterial vaginosis. *Jaapa*, 34(2), 19-22. doi:10.1097/01.Jaa.0000731484.81301.58
- Zhang, K., Lu, M., Zhu, X., Wang, K., Jie, X., Li, T., Dong, H., Li, R., Zhang, F., & Gu, L. (2022). Antibiotic resistance and pathogenicity assessment of various Gardnerella sp. strains in local China. *Front Microbiol*, 13, 1009798. doi:10.3389/fmicb.2022.1009798
- Zheng, N., Guo, R., Wang, J., Zhou, W., & Ling, Z. (2021). Contribution of Lactobacillus iners to Vaginal Health and Diseases: A Systematic Review. *Front Cell Infect Microbiol*, 11, 792787. doi:10.3389/fcimb.2021.792787
- Zhu, B., Tao, Z., Edupuganti, L., Serrano Myrna, G., & Buck Gregory, A. (2022). Roles of the Microbiota of the Female Reproductive Tract in Gynecological and Reproductive Health. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 86(4), e00181-00121. doi:10.1128/mmbr.00181-21

11.

ANEXOS

11.1. Manejos de desechos biológicos

Los desechos biológicos generados serán almacenados correctamente de acuerdo al protocolo especificado por el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana. Posteriormente, el procedimiento que realice la empresa MATPEL se rige según reglamentos de manejos de residuos peligrosos otorgados por la Universidad de Concepción.