Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

Propiedades probióticas in vitro de lactobacilos aislados de mucosa vaginal de mujeres sanas

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Microbiología

AUTOR

Yndalú Kimberly HUILLCA PARI

ASESOR

Mg. Nelson BAUTISTA CRUZ

Mg. Jorge Andrés BALLÓN ECHEGARAY (Coasesor)

Lima, Perú

2026



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Huillca Y. Propiedades probióticas in vitro de lactobacilos aislados de mucosa vaginal de mujeres sanas [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2026.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Yndalú Kimberly Huillca Pari
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	71079454
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-2279-6524
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Mg. Nelson Bautista Cruz
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10260086
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-0932-2332
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	Mg. Jorge Andrés Ballón Echegaray
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	29518941
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-2765-9273
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Dra. Mirtha Roque Alcarraz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08644654
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Dra. Maria Elena Salazar Salvatierra
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08675623
Miembro del jurado 2	

Nombres y apellidos	Dr. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07760326
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Nelson Bautista Cruz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10260086
Datos de investigación	
Línea de investigación	Ciencias de la Salud
Grupo de investigación	No aplica.
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento.
Ubicación geográfica de la investigación	País: Perú Departamento: Arequipa Provincia: Arequipa Distrito: Arequipa Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Facultad de Medicina Laboratorio de Investigación en Microbiología Molecular Av. Daniel Alcides Carrion s/n Latitud: -16.413011 Longitud: -71.534441
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Febrero 2024 - octubre 2026
URL de disciplinas OCDE	Biología celular, Microbiología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN MICROBIOLOGÍA

Siendo las **12:00 hrs. del 13 de octubre de 2026** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado de tesis, presidido por la Dra. Mirtha Roque Alcarraz e integrado por los siguientes miembros: Mg. Nelson Bautista Cruz (asesor), Dra. María Elena Salazar Salvatierra y el Dr. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **Propiedades probióticas *in vitro* de lactobacilos aislados de mucosa vaginal de mujeres sanas,** presentado por la Bachiller en Ciencias Biológicas **Yndalú Kimberly Huillca Pari.**

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Microbiología.** Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduanda.

A continuación el Jurado de la tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

..... **Muy bueno (18)** .....

Luego la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Ciencias Biológicas **Yndalú Kimberly Huillca Pari**, el Grado Académico de **Magíster en Microbiología.**

Siendo las **01:00** hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las **1:04** hrs. del 13 de octubre de 2026

.....
Dra. Mirtha Roque Alcarraz (P. P. T.C.)
Presidenta

.....
Mg. Nelson Bautista Cruz (P. Asoc, T.C.)
Miembro - Asesor

.....
Dra. María Elena Salazar Salvatierra (P. P, T.C.)
Miembro

.....
Dr. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz (P. Asoc, T.C.)
Miembro

Observaciones:

.....

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE
SAN MARCOS
Universidad del Perú, Decana de América

Anexo 1

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Mg. Nelson Bautista Cruz, en mi condición de asesor acreditado con el Dictamen N° 00008/FFB-UPG/2024 de la tesis, cuyo título es: **Propiedades probióticas *in vitro* de lactobacilos aislados de mucosa vaginal de mujeres sanas,** presentado por la Bach. **Yndalú Kimberly Huillca Pari**, para optar al Grado Académico de Magíster en Microbiología, CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el **05**% de similitud, nivel PERMITIDO para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del Grado Académico de Magíster en Microbiología.

UNMSM Firmado digitalmente por BAUTISTA CRUZ Nelson FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 14.07.2026 16:28:20 -05:00

Lima, 14 de julio de 2026

Firma del asesor

Mg. Nelson Bautista Cruz

DNI: 10260086

* Según corresponda: bachiller, magíster, doctor; título profesional o título de segunda especialidad

La vigencia del presente certificado corresponde a un período de noventa (90) días desde la fecha de su emisión; siempre que no haya observaciones en el texto durante el proceso de revisión por el jurado informante o surja alguna contingencia.

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía constante, por darme fortaleza en los momentos de dificultad y por iluminar cada paso que me permitió culminar esta etapa importante de mi vida profesional.

Con profundo amor y gratitud a mis padres, Hilario Huillca y Antonia Pari, por su esfuerzo, sacrificio y amor incondicional. Gracias por brindarme siempre su apoyo, confianza y comprensión, y por inculcarme valores, disciplina y perseverancia que me permitieron alcanzar esta meta.

A mi hermano, Junior Huillca, por su apoyo, confianza y respaldo incondicional durante todo este proceso, por acompañarme en cada desafío y celebrar conmigo cada avance.

A mis abuelos, Mario Pari y Paula Quispe, presentes siempre en mi corazón, por sus enseñanzas, amor y ejemplo de vida, que continúan guiando cada uno de mis pasos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Ballón, decano de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, por haberme dado la oportunidad de colaborar y desarrollar proyectos de investigación, desde la gestión hasta la ejecución técnica. Además de ser mi mentor en mi trayectoria como profesional. Asimismo, por coasesorarme en la realización del presente trabajo de investigación.

Al Dr. Nelson Bautista por haberme dado la oportunidad de ser su asesorada en la realización del presente trabajo de investigación, así como haberme tenido toda la paciencia y por haberme compartido sus conocimientos científicos.

A la Dra. Ada Del Carpio, Dr. Luis Lizárraga y Dra. Sandra Condori por guiarme en la realización del presente trabajo de investigación autofinanciado que deriva del proyecto "Caracterización del microbioma vaginal peruano y aislamiento de lactobacilos con potencial probiótico" con contrato de financiamiento N° IBA-IB-47-2020-UNSA.

A Luciana Valderrama, Arian Becerra, Gerardo Delgado, Manuel Sánchez, Joaquín Cáceres, Rodrigo Suarez, Andrew Velásquez, Smith Ollachica, Ana María Ahuate y demás miembros del Laboratorio de Investigación en Microbiología Molecular quienes me apoyaron en la ejecución técnica del presente trabajo de investigación.

ÍNDICE

RESUMEN ..... **iii**

ABSTRACT ..... **iii**

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN **1**

1.1 Objetivo general 2

1.2 Objetivos específicos 2

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO **3**

2.1 Antecedentes **3**

2.2 Aspectos teóricos **5**

2.2.1 Microbioma vaginal 5

2.2.2 Lactobacilos 6

2.2.3. Probióticos 6

2.2.4 Identificación de bacterias mediante MALDI-TOF MS 7

2.2.5 Potencial probiótico de lactobacilos 8

2.2.6 Seguridad 8

2.2.7 Eficacia 9

2.2.8 Actividad antimicrobiana 15

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA **18**

3.1. Tipo y diseño de investigación **18**

3.2 Consideraciones éticas **18**

3.3 Unidad de análisis **18**

3.4 Población de estudio **18**

3.5 Muestra y tamaño de muestra **18**

3.6 Técnicas o instrumentos de recolección de la información o de datos **18**

3.6.1 Identificación de las bacterias aisladas de hisopados vaginales mediante MALDI-TOF MS 18

3.6.1.1 Recolección de muestras 18

3.6.1.2 Reactivación y preservación de cepas 18

3.6.1.3 Descripción morfofenotípica 19

3.6.1.4 Identificación de lactobacilos mediante MALDI-TOF MS 19
3.6.2 Evaluación de la seguridad de los lactobacilos aislados 19
3.6.2.1 Actividad catalasa 19
3.6.2.2 Actividad hemolítica 19
3.6.2.3 Actividad gelatinasa 19
3.6.2.4 Susceptibilidad a los antibióticos 20
3.6.3 Evaluación de la eficacia de los lactobacilos aislados 20
3.6.3.5 Tolerancia a pH ácido 21
3.6.3.6 Capacidad de auto-agregación y co-agregación 21
3.6.4 Evaluación la actividad antimicrobiana de lactobacilos 22
3.6.4.1 Actividad antibacteriana 22
3.6.4.2 Actividad antifúngica 22
3.7 Procesamiento de la información o de datos 23
CAPÍTULO IV. RESULTADOS 24
4.1 Identificación de las bacterias aisladas de hisopados vaginales mediante MALDI-TOF MS 24
4.2 Evaluación de la seguridad de los lactobacilos aislados 26
4.3 Evaluación de la eficacia de los lactobacilos aislados 30
4.4 Evaluación la actividad antimicrobiana de lactobacilos aislados 39
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN 42
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES 47
CAPITULO VII. RECOMENDACIONES 48
CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 49
CAPÍTULO IX. ANEXOS 59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Géneros de bacterias ácido-lácticas y sus características diferenciales 11
Tabla 2. Distribución taxonómica de los microorganismos identificados mediante MALDI-TOF MS 25
Tabla 3. Determinación de la actividad catalasa, hemolítica y gelatinasa de los lactobacilos aislados 26
Tabla 4. Resumen del perfil de susceptibilidad de los lactobacilos a antibióticos 28
Tabla 5. Lactobacilos no resistentes a antibióticos 29
Tabla 6. Evaluación cualitativa de producción de ácido láctico en diferentes medios de cultivo 30
Tabla 7. Medición de pH después de 24, 48 y 72 horas de incubación 31
Tabla 8. Descripción de los resultados del cultivo de lactobacilos en agar diferencial para bacterias lácticas 32
Tabla 9. Tolerancia a pH ácido (4, 5 y 6) después de 24 h de incubación 33
Tabla 10. Tolerancia a pH ácido (4, 5 y 6) después de 48 h de incubación. 34
Tabla 11. Porcentaje de auto-agregación de lactobacilos 35
Tabla 12. Porcentaje de co-agregación de lactobacilos contra *E. coli* ATCC 25922 36
Tabla 13. Porcentaje de co-agregación de lactobacilos contra *S. agalactiae* ATCC 12386 37
Tabla 14. Porcentaje de co-agregación de lactobacilos contra *G. vaginalis* ATCC 49145 38
Tabla 15. Porcentaje de co-agregación de lactobacilos contra *C. albicans* ATCC 10231 39
Tabla 16. Actividad antibacteriana de lactobacilos contra cepas patógenas 40
Tabla 17. Actividad antifúngica de lactobacilos contra *C. albicans* 41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de los probióticos que regulan la microbiota vaginal..... 7
Figura 2. Rutas metabolicas de bacterias ácido-lácticas homofermentativas y heterofermentativas 12
Figura 3. Proceso y mecanismos moleculares de la agregación de *Lactobacillus* 14
Figura 4. Sustancias antimicrobianas producidad por bacterias ácido-lácticas..... 15
Figura 5. Tinción de Gram de las cepas de lactobacilos aislados A. *L. acidophilus/gasseri*, B. *L. crispatus*, C. *L. jensenii*, D. *L. reuteri*, E. *L. rhamnosus*, F. *Lactobacillus* sp. 24

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar las propiedades probióticas *in vitro* de lactobacilos aislados de la mucosa vaginal de mujeres sanas. A partir de 102 hisopados vaginales se obtuvieron 569 aislados bacterianos, los cuales fueron identificados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF MS. La seguridad se determinó mediante la actividad catalasa, hemolítica, gelatinasa y susceptibilidad a siete antibióticos. La eficacia se evaluó mediante la medición del pH de fermentación, producción de ácidos orgánicos en medios con púrpura de bromocresol y carbonato de calcio, tolerancia a pH ácido y capacidad de auto-agregación. La co-agregación y actividad antimicrobiana se evaluó frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386, *Gardnerella vaginalis* ATCC 49145 y *Candida albicans* ATCC 10231. A partir de las muestras, se identificaron 248 cepas correspondientes a seis especies de lactobacilos, entre las que predominó *Lactobacillus crispatus* (81,05%), seguida de *L. gasseri/acidophilus* (8,47%), *L. jensenii* (4,84%), *Lactobacillus* sp. (4,03%), *L. reuteri* (0,81%) y *L. rhamnosus* (0.81%). El 94,76% fueron negativos a las pruebas de actividad catalasa, hemolítica y gelatinasa. El 91,49% de las cepas presentó resistencia a ciprofloxacino y solo 13 cepas fueron susceptibles a todos los antibióticos ensayados. Las cepas de *L. crispatus* TPV-097 y TPV-098 presentaron los valores de pH más bajos a las 72 horas. Asimismo, la cepa *L. acidophilus/gasseri* TPV-422 presentó la mayor tolerancia a pH 4. La capacidad de autoagregación fue mayor en cepas de *L. crispatus* (TPV-171 y TPV-097). Finalmente, los lactobacilos presentaron capacidad de co-agregación y actividad antimicrobiana frente a patógenos como *S. agalactiae*, *G. vaginalis* y *C. albicans*. En conclusión, los lactobacilos aislados de la mucosa vaginal de mujeres sanas presentaron potencial probiótico evaluado *in vitro*, con un perfil de seguridad adecuado y actividad antimicrobiana frente a patógenos causantes de infecciones vaginales. Los cuales pueden ser usados para desarrollar un producto probiótico peruano para la prevención y manejo de la vaginosis bacteriana y candidiasis vulvovaginal en la población.

Palabras clave: microbiota vaginal, probióticos, bacterias ácido-lácticas, *Lactobacillus crispatus*

ABSTRACT

This study evaluated the *in vitro* probiotic properties of lactobacilli isolated from the vaginal mucosa of healthy women. A total of 569 bacterial isolates were obtained from 102 vaginal swabs and identified using MALDI-TOF mass spectrometry. Safety was assessed based on catalase, hemolytic, and gelatinase activity, as well as susceptibility to seven antibiotics. Efficacy was evaluated by measuring fermentation pH, organic acid production in media containing bromocresol purple and calcium carbonate, tolerance to acidic pH, and auto-aggregation capacity. Co-aggregation and antimicrobial activity were tested against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386, *Gardnerella vaginalis* ATCC 49145, and *Candida albicans* ATCC 10231. From the samples, 248 strains belonging to six *Lactobacillus* species were identified; *Lactobacillus crispatus* was the most prevalent (81.05%), followed by *L. gasseri/acidophilus* (8.47%), *L. jensenii* (4.84%), *Lactobacillus* sp. (4.03%), *L. reuteri* (0.81%), and *L. rhamnosus* (0.81%). Of these, 94.76% of the isolates tested negative for catalase, hemolytic, and gelatinase activity tests. Resistance to ciprofloxacin was observed in 91.49% of the strains, and only 13 strains were susceptible to all tested antibiotics. Strains *L. crispatus* TPV-097 and TPV-098 showed the lowest pH values at 72 hours. Additionally, strain *L. acidophilus/gasseri* TPV-422 exhibited the highest tolerance to pH 4. Auto-aggregation capacity was highest in *L. crispatus* strains (TPV-171 and TPV-097). Finally, the lactobacilli demonstrated co-aggregation capacity and antimicrobial activity against pathogens such as *S. agalactiae*, *G. vaginalis*, and *C. albicans*. In conclusion, the lactobacilli isolated from the vaginal mucosa of healthy women exhibited probiotic potential as evaluated in vitro along with a suitable safety profile and antimicrobial activity against pathogens that cause vaginal infections. These strains could be used to develop a Peruvian probiotic product to prevent and manage bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis in the population.

Keywords: vaginal microbiota, probiotics, lactic acid bacteria, *Lactobacillus crispatus*

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El microbioma vaginal es un ecosistema compuesto por bacterias, virus y microorganismos eucariotas. Es una pieza clave para la salud reproductiva (1), porque previene el sobrecrecimiento patógeno, modulando la inmunidad local y produciendo sustancias que reducen el pH vaginal (2,3). La microbiota vaginal está compuesta predominantemente por especies de *Lactobacillus* (*L. iners, L. gasseri, L. crispatus* y *L. jensenii*) (3).

Las infecciones vaginales pueden ser causadas por bacterias, hongos y/o parásitos como consecuencia de un desequilibrio en el ecosistema vaginal, también denominado disbiosis vaginal (4). Estas se clasifican en vaginitis o vaginosis bacteriana (VB), candidiasis vulvovaginal (VVC) y tricomoniasis (TV). En el Perú la VB tiene una prevalencia de 40-50%, VVC del 20-25% y TV del 15-20%, lo cual ocasiona una morbilidad significativa y estrés psicológico en las mujeres y aumenta el riesgo de otras infecciones genitourinarias. Asimismo, el diagnóstico de estos sigue siendo sindrómicos o empíricos y muchas veces el tratamiento es ineficaz o retrasado, ocasionando que la infección se prolongue y aumente el uso de antimicrobianos (5).

A pesar del aumento del uso de los probióticos para el tratamiento de infecciones, aún no se ha determinado la dosis adecuada, el probiótico específico ni la duración óptima. Además, se han reportado limitaciones potenciales de las propiedades de los probióticos comerciales relacionadas con la cepa de probióticos (toxigenicidad, patogenicidad o resistencia a los antibióticos), la calidad del producto o la administración de probióticos (6).

Los lactobacilos son las bacterias probióticas más investigadas, puesto que se los considera como microorganismos GRAS (General Recognized As Safe, por sus siglas en inglés) (7). Además, son potencialmente prometedores para proteger el ambiente vaginal porque producen ácido láctico, favoreciendo mantener el pH ácido y contribuyen a la inhibición patógena (4). Asimismo, el efecto de los probióticos en la salud del tracto reproductivo femenino aún sigue en estudio. Se debe considerar que hay variación de la microbiota vaginal entre los grupos étnicos y que no todas las especies de lactobacilos vaginales son igualmente protectoras (8).

En el Perú, las investigaciones sobre el aislamiento y caracterización de probióticos en su mayoría son de alimentos o bebidas fermentadas, sin embargo, estos no cuentan con la evaluación extensa de la seguridad y eficacia para su uso alimentario, industrial y terapéutico. La identificación de las cepas de probióticos, caracterización y evaluación de

su eficacia y seguridad permitirá obtener lactobacilos como probióticos potenciales para su consumo humano, tratamiento de infecciones vaginales, reducir el consumo de antimicrobianos mejorando así la calidad de vida de la población. Este proyecto tiene como objetivo evaluar las propiedades probióticas *in vitro* de los lactobacilos aislados de mucosa vaginal de mujeres sanas.

1.1 Objetivo general

Evaluar las propiedades probióticas *in vitro* de los lactobacilos aislados de mucosa vaginal de mujeres sanas.

1.2 Objetivos específicos

- Identificar las bacterias aisladas de hisopados vaginales mediante MALDI-TOF MS.
- Evaluar la seguridad de los lactobacilos aislados mediante la actividad catalasa, actividad hemolítica, actividad gelatinasa y susceptibilidad a antibióticos.
- Evaluar la eficacia de los lactobacilos aislados mediante los ensayos de producción de ácido láctico, cultivo en MRS con púrpura de bromocresol y carbonato de calcio, tipo de fermentación en bacterias lácticas, medición de pH después de incubación, tolerancia a pH ácido, autoagregación y coagregación.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de lactobacilos contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386, *Gardnerella vaginalis* ATCC 49145 y *Candida albicans* ATCC 10231.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Aslim y Kilic, evaluaron algunas propiedades probióticas de lactobacilos aislados de la vagina de mujeres sanas. Recolectaron hisopados vaginales de 19 mujeres turcas sanas, obteniendo 58 cepas de *Lactobacillus* spp. *L. gasseri* fue la especie predominante (21%), seguida de *L. vaginalis* y *L. acidophilus* (16% cada una). Determinaron la capacidad de producción de ácido láctico y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), así como la actividad antimicrobiana frente a *E. coli* ATCC 11230, *S. aureus* ATCC 2392, *P. aeruginosa* ATCC 29212 y *S. enterica serovar enteritidis* RSKK 171. Los valores de pH inducidos por las cepas oscilaron entre 1,00 y 2,15, y la acidez titulable entre 0,27 y 1,33%. La producción de H_2O_2 varió entre 1,01 y 15,50 µg/mL. Solo 10 de las 58 cepas inhibieron a todos los patógenos evaluados, siendo *P. aeruginosa* el más sensible y *E. coli* el más resistente. Concluyeron que nuevas cepas de *Lactobacillus* spp. aisladas de la vagina de mujeres sanas constituyen candidatos prometedores para el desarrollo de productos probióticos (9).

Balzaretti et al. evaluaron la cepa *L. paracasei* LPC-S01, aislada de secreción vaginal, la cual es incluida en preparaciones probióticas comerciales de uso tópico, con el fin de evaluar si posee propiedades como probiótico gastrointestinal. Reportaron que, en comparación con las cepas de referencia *L. paracasei* Shirota y DG, LPC-S01 presentó tolerancia equivalente a la bilis, capacidad similar para reducir la activación del NF-κB en células Caco-2, y tolerancia y adhesión superiores frente al jugo gástrico y a las células epiteliales Caco-2, respectivamente. Indicaron además que la cepa es susceptible a los antibióticos señalados por la EFSA (European Food Safety Authority) y no produce aminas biogénicas. Concluyeron que el aislado vaginal LPC-S01 posee propiedades funcionales y de seguridad que respaldan su uso oral con posibles aplicaciones intestinales y vaginales (10).

Parolin et al. identificaron lactobacilos vaginales con actividad antifúngica frente a *Candida* spp. y caracterizaron sus mecanismos de acción. Reclutaron quince mujeres premenopáusicas, de quienes aislaron cepas de *L. crispatus*, *L. gasseri* y *L. vaginalis*, identificadas mediante secuenciación del gen 16S rRNA. La actividad antifúngica fue evaluada mediante microdilución en caldo, reportaron el efecto más amplio en cepas de *L. crispatus* y *L. vaginalis*, las cuales inhibieron a todos los aislados de *C. albicans* y *C. lusitaniae* evaluados. Plantearon que la inhibición de las histonas desacetilasas sustentan dicha actividad antifúngica (11).

Nami et al. identificaron y caracterizaron el potencial probiótico de bacterias ácido-lácticas aisladas de hisopados vaginales de mujeres iraníes sanas. De 88 cepas obtenidas,

seleccionaron 45 aislados Gram positivos y catalasa negativos, clasificados mediante ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) y secuenciación 16S como *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Lactococcus*. Indicaron que todos los aislados mantuvieron viabilidad a pH 3,0 y en sales biliares, con supervivencia superior al 50%. Reportaron que las cepas con mayor actividad frente a *G. vaginalis* correspondieron a *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei* y *Lactococcus lactis* (12).

Pino et al. detectaron lactobacilos vaginales como candidatos a probióticos a partir de 261 cepas aisladas de la vagina de mujeres sanas. Evaluaron la seguridad mediante actividad hemolítica, susceptibilidad a antibióticos y actividad BSH, junto con propiedades funcionales como tolerancia al pH bajo y a sales biliares, hidrofobicidad, auto-coagregación, adhesión epitelial y producción de ácido láctico. Identificaron 7 cepas de *L. rhamnosus*, *L. helveticus* y *L. salivarius* que cumplieron los criterios evaluados. Concluyeron que el ecosistema vaginal constituye una fuente de candidatos probióticos para fórmulas funcionales orientadas a la eubiosis gastrointestinal y vaginal (13).

Er et al., examinaron la actividad antifúngica de bacterias ácido-lácticas aisladas de la vagina de 30 mujeres sanas. Las cepas fueron identificadas mediante MALDI-TOF MS, correspondieron a *L. crispatus*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. pentosus* y *L. plantarum*. Reportaron que estas cepas exhibieron actividad antifúngica variable frente a *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* y concluyeron que constituyen candidatos prometedores como probióticos frente a la candidiasis vaginal (14).

Hadiza Umar et al., evaluaron la actividad antimicrobiana y la seguridad de cepas de lactobacilos aisladas de la región anogenital de 52 mujeres sanas. De 62 cepas identificadas mediante secuenciación del ADNr 16S, reportaron que *L. delbrueckii* 45E y *L. reuteri* 29A y 29B presentaron la mayor actividad inhibidora. Indicaron que ensayos adicionales de hemólisis, susceptibilidad a antibióticos, cuantificación de ácido D/L-láctico y producción de H_2O_2 e hidrolisis de sales biliares señalaron a *L. reuteri* 29B como el candidato probiótico más prometedor, confirmando la factibilidad de aislar probióticos de la región anogenital (15).

Tajdozian et al., evaluaron la eficacia de *Lactobacillus fermentum* aislado de la vagina de una mujer sana contra infecciones por *Klebsiella* resistentes a carbapenems en modelos murinos. Reportaron que esta cepa redujo la pérdida de peso corporal, la mortalidad y el recuento de *Klebsiella* en los ratones tratados. Concluyeron que *L. fermentum* posee actividad antibacteriana con potencial terapéutico frente a estas infecciones (16).

Asadi et al., examinaron las propiedades probióticas de *Lactobacillus* spp. aislado de la vagina de mujeres sanas frente a patógenos vaginales. De 80 cepas con tolerancia a pH ácido y sales biliares, reportaron que cinco de ellas presentaron un patrón aceptable de susceptibilidad a antibióticos y actividad antimicrobiana frente a diversos patógenos bacterianos. Indicaron además que estas cepas produjeron ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno, sin actividad hemolítica, y con capacidad de hidrofobicidad, autoagregación y coagregación (17).

Chinchay et al., evaluaron la actividad inhibitoria del sobrenadante de cuatro cepas de *Lactobacillus* spp. aisladas de secreciones vaginales de mujeres jóvenes de Jaén, Perú, frente a especies de *Candida*. Mediante difusión en disco, reportaron que la cepa L3 presentó halos de inhibición de hasta 10 mm frente a *C. albicans* y *C. glabrata*, sin actividad frente a *C. krusei*. Concluyeron que el efecto inhibitorio depende de la cepa y de la especie de *Candida* evaluada (18).

2.2 Aspectos teóricos

2.2.1 Microbioma vaginal

El microbioma vaginal es un ecosistema dinámico colonizado por una amplia variedad de microorganismos que residen en la vagina, la cual cumple un rol en la salud de las mujeres en general y en las mujeres en edad reproductiva específicamente. Además, esta presenta fluctuaciones notables a lo largo del tiempo y entre individuos (19).

La microbiota vaginal está compuesta por varias especies bacterianas, que pueden variar entre individuos. Sin embargo, una microbiota vaginal saludable es un ambiente de baja diversidad y típicamente está dominada por especies de *Lactobacillus*. Para representar de manera más clara la composición de la microbiota vaginal, se ha definido diferentes tipos de estado de comunidad (CST, por sus siglas en inglés community state types), donde el CST I está dominado por *Lactobacillus crispatus*, el CST II por *L. gasseri*, el CST III por *L. iners* y el CST V por *L. jensenii*. En cambio, el CST IV no está dominado por *Lactobacillus*, sino que incluye especies anaerobias como *Gardnerella vaginalis* y *Prevotella* spp., y se subdivide en CST IV-A, IV-C y IV-D según la especie dominante (20).

Los niveles hormonales, especialmente el estrógeno, influyen en la dinámica del microbioma vaginal al aumentar la disponibilidad de glucógeno, lo que favorece cambios en su composición a lo largo de la vida de las mujeres. Factores como la etnicidad, la actividad sexual, la edad y el estilo de vida también impactan en la microbiota. Durante las diferentes etapas de la vida femenina, desde la infancia y la pubertad hasta la edad

reproductiva y la menopausia, los niveles de estrógeno se correlacionan con la abundancia de *Lactobacillus* spp. y el pH vaginal. En mujeres en edad reproductiva, se observan predominantemente los CST I, III y IV, mientras que el CST V es poco común (19).

2.2.2 Lactobacilos

Son bacterias Gram positivas, anaerobios aerotolerantes, no esporulantes, inmóviles, con forma de bacilos e incluso coco-bacilos y son el género más grande del grupo de bacterias del ácido láctico (15).

Los lactobacilos constituyen una gran parte de la microbiota humana y se han reportado 33 géneros y ~300 especies (260 de ellas del antiguo género *Lactobacillus*), se encuentra entre los microorganismos más activamente estudiados con potencial probiótico (21). El género *Lactobacillus* es el más representativo dentro de las bacterias del ácido láctico (BAL), desempeña un papel clave en los procesos metabólicos que transforman carbohidratos en ácido láctico. Según sus características metabólicas los lactobacilos se clasifican en tres grupos: el grupo homofermentativo obligatorio, que produce ácido láctico como principal subproducto de la fermentación (*L. acidophilus* y *L. salivarius*), grupo heterofermentativo facultativo, que bajo ciertas condiciones genera ácido láctico, etanol o ácido acético y dióxido de carbono (*L. casei* y *L. plantarum*) y el grupo heterofermentativo obligado, que produce de forma continua dióxido de carbono, ácido láctico y etanol o ácido acético (*L. reuteri* y *L. fermentum*) (22).

Se ha identificado una amplia gama de sustancias inhibidoras similares a bacteriocinas (BLIS) que incluyen ácidos grasos volátiles, péptidos y moléculas con actividad antimicrobiana. Estas sustancias son excretadas por las BAL durante su crecimiento en diversos medios, mostrando actividad específica contra patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* y enterobacterias (*Escherichia coli, Salmonella* spp.*, Klebsiella* spp.). Además, compuestos como alcoholes, diacetil, peróxido de hidrógeno, lactonas, reuterina, ácido feniláctico y exopolisacáridos que han demostrado propiedades antimicrobianas y antimicóticas en estudios recientes (Tabla 1) (21). Los lactobacilos constituyen los microorganismos predominantes en la microbiota vaginal de mujeres en edad fértil, desempeñando un papel crucial en la protección al inhibir el desarrollo de bacterias patógenas mediante la síntesis de ácido láctico, ácidos grasos, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y bacteriocinas (23).

2.2.3. Probióticos

Son microorganismos vivos no patógenos que cuando se administran en cantidades adecuadas, afectan beneficiosamente la salud del huésped (13). Se emplean de manera

continua para favorecer la homeostasis de la microbiota interna y preservar la salud del intestino humano. Esto contribuye a disminuir la presencia de bacterias perjudiciales que no toleran ambientes ácidos, mientras fomenta el crecimiento de bacterias beneficiosas adaptadas a dichas condiciones (Figura 1), logrando así un equilibrio en la microbiota (24).

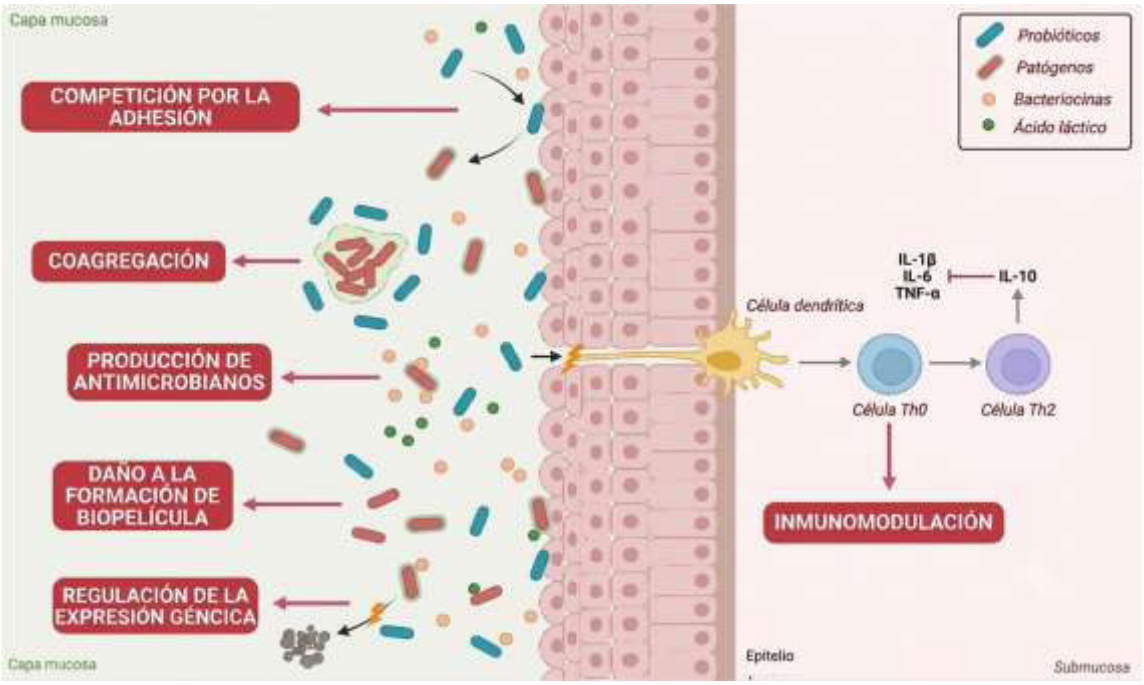


Figura 1. Mecanismo de los probióticos que regulan la microbiota vaginal (25).

2.2.4 Identificación de bacterias mediante MALDI-TOF MS

La espectrometría de masas con desorción/ionización asistida por matriz y tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) es una técnica analítica rápida y sensible para la identificación y caracterización microbiana. Se basa en la medición de la masa de las moléculas de muestra ionizadas, que son desorbidas mediante pulsos láser cortos, luego de ser cristalizadas con un ácido orgánico de bajo peso molecular (26). Se fundamenta en el uso de una base de datos de espectros proteicos, principalmente de proteínas ribosomales altamente expresadas. El procesamiento consta en la aplicación directa de una colonia microbiana sobre la placa (slide MS), seguido de la adición de una matriz y su cristalización a temperatura ambiente. Entre las matrices utilizadas en MALDI-TOF MS se encuentran el ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA), el ácido sinapínico y el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), utilizadas para diversos analitos, como péptidos, glicopéptidos y carbohidratos. En la identificación de bacterias se emplea principalmente CHCA, debido a que favorece la obtención de espectros de proteínas ribosomales (26,27).

Esta técnica ha revolucionado la microbiología clínica, permitiendo una identificación rápida de bacterias, hongos y marcadores de resistencia antimicrobiana, con una ventaja principal, la reducción del tiempo necesario para obtener resultados, pasando de 24-48 horas con métodos convencionales a solo unos minutos. La versatilidad de MALDI-TOF MS permite que se adapte a las necesidades de cada laboratorio, lo que ha impulsado el desarrollo de software y bases de datos para mejorar la identificación de bacterias anaerobias y hongos, similar a lo que ya se ha logrado con bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Sin embargo, existen limitaciones, como la dificultad para distinguir entre especies similares, como *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus mitis/oralis* o entre *E. coli* y *Shigella* sp. La robustez de la identificación depende de la riqueza de las bases de datos (26,28).

En el entorno clínico, los espectrómetros de masas más comercializados son el sistema Andromas (París, Francia), el Microflex LT (Bruker Daltonics, Heidelberg, Alemania, en colaboración con Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), VITEK® MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). No obstante hay otros sistemas como Axima (Shimadzu, Japón) y MicroIDSys (ASTA, Corea del Sur) (29).

2.2.5 Potencial probiótico de lactobacilos

Se define como la capacidad de ciertos microorganismos para tolerar condiciones de estrés y sobrevivir en el tracto gastrointestinal, así como adherirse y colonizar, al menos de forma temporal, el epitelio intestinal (30).

2.2.6 Seguridad

La seguridad en el contexto de la evaluación del potencial probiótico se define como la garantía de que los microorganismos viables utilizados como probióticos no representan riesgos para la salud del huésped. Esto implica evaluar la ausencia de genes de resistencia a antibióticos transferibles, la estabilidad genética, la falta de actividades tóxicas o patogénicas y la compatibilidad metabólica con el organismo humano. Mediante pruebas *in vitro*, modelos animales, análisis genómicos y toxicológicos (31).

2.2.6.1 Actividad catalasa

La catalasa es una enzima presente en organismos aeróbicos y anaerobios facultativos que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un compuesto tóxico generado durante el metabolismo celular, en agua y oxígeno, protegiendo así a las células del estrés oxidativo. Estructuralmente, es un tetrámero formado por cuatro subunidades que contienen un grupo hemo y NADPH en su centro activo, con un pH óptimo cercano a 7,0. En bacterias, además de su función antioxidante, la catalasa participa en procesos

celulares relacionados con la adaptación a diferentes condiciones ambientales y la regulación metabólica, contribuyendo a la supervivencia en entornos hostiles (32).

2.2.6.2 Actividad hemolítica

Corresponde a la capacidad de algunas bacterias de producir hemolisinas que provocan la lisis de eritrocitos, permitiendo la liberación de hemo, un compuesto necesario para el crecimiento bacteriano (33).

2.2.6.3 Actividad gelatinasa

La gelatinasa es una metaloproteasa bacteriana capaz de degradar diversos sustratos proteicos, como gelatina, colágeno, fibrina y fibronectina, mediante la hidrólisis de la gelatina en péptidos y aminoácidos más simples, lo que facilita la obtención de nutrientes en ambientes limitados en recursos. Además, esta enzima participa en la degradación de componentes de la matriz extracelular del huésped, favoreciendo la invasión y diseminación de microorganismos patógenos. Asimismo, la actividad gelatinasa se ha relacionado con la formación y maduración de biopelicula, estructuras que contribuyen a la persistencia bacteriana y a la resistencia frente a condiciones adversas y agentes antimicrobianos. De igual manera, se ha descrito que la gelatinasa puede degradar componentes del sistema inmunológico, como el complemento C5a, lo que reduce la migración de neutrófilos y facilita la evasión de la respuesta inmune del huésped (34).

2.2.6.4. Susceptibilidad a antibióticos

Corresponde a la evaluación de la respuesta de un microorganismo frente a un agente antimicrobiano mediante ensayos realizados *in vitro*. Permiten determinar si un antibiótico es capaz de inhibir el crecimiento o eliminar al microorganismo a concentraciones que pueden alcanzarse en el sitio de infección en el organismo humano. Con base en los resultados obtenidos, se clasifican generalmente como susceptibles, intermedios o resistentes, de acuerdo con los criterios establecidos por organismos internacionales como el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (35).

2.2.7 Eficacia

La eficacia probiótica se refiere a la capacidad de un microorganismo vivo, administrado en cantidades adecuadas, de generar un efecto beneficioso específico en la salud del huésped. Esta definición está respaldada por la International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP), enfatiza la importancia de demostrar mediante evidencia científica los efectos positivos atribuidos a los probióticos. En este contexto, la eficacia no solo depende de la supervivencia del microorganismo en el organismo

humano, sino también de su interacción funcional con la microbiota residente y con el sistema inmunológico del huésped (36).

2.2.7.1 Producción de ácido láctico

El ácido láctico ($C_3H_6O_3$) es un compuesto orgánico quiral, generado principalmente durante la fermentación de carbohidratos, que constituye uno de los principales metabolitos producidos por bacterias ácido-lácticas como los lactobacilos. Se presenta en dos formas estereoisoméricas, L-ácido láctico y D-ácido láctico, cuya proporción varía según la especie o cepa bacteriana; ambas contribuyen a la acidificación de diferentes ambientes biológicos, incluyendo el tracto gastrointestinal y la mucosa vaginal, limitando así el crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos (37).

Su producción ocurre mediante dos rutas fermentativas principales: la fermentación homoláctica, en la que la glucosa se metaboliza por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas generando ácido láctico como producto predominante junto con ATP; y la fermentación heteroláctica, que produce además etanol y dióxido de carbono, reduciendo la eficiencia de producción de este metabolito (38).

En el ecosistema vaginal, los lactobacilos son los principales productores de ácido láctico y mantienen el pH vaginal entre 3,5 y 4,5, lo que limita la proliferación de microorganismos asociados a la vaginosis bacteriana y otras infecciones del tracto reproductivo. Especies como *L. crispatus*, *L. gasseri* y *L. jensenii* se asocian a mayores concentraciones de ácido láctico y mayor capacidad de acidificación. Adicionalmente, el ácido láctico en su forma protonada puede atravesar la membrana celular de microorganismos patógenos, alterando su integridad estructural e inhibiendo su crecimiento (Tabla 1) (37,39).

2.2.7.2 Púrpura de bromocresol

Su denominación química corresponde a 5,5'-dibromo-o-cresolsulfonftaleína y posee la fórmula molecular $C_{21}H_{16}Br_2O_5S$. Es un indicador de pH que presenta un cambio de color desde amarillo en condiciones ácidas (pH aproximado de 5,2) hasta violeta cuando el pH supera 6,8 (40). Este cambio de color permite detectar indirectamente la producción de ácidos orgánicos, ya que la acumulación de estos metabolitos reduce el pH del medio de cultivo. Por este motivo, ha sido incorporada en medios de cultivo para evaluar la capacidad fermentativa tanto en cultivos puros como en cultivos mixtos (41).

Tabla 1. Géneros de bacterias ácido-lácticas y sus características diferenciales (42).

Familia	Género	Características								
		Forma	**CO_2 procedente de glucosa**	**Crecimiento a 10 °C**	**Crecimiento a 45 °C**	**Crecimiento en NaCl 6,5 %**	**Crecimiento en NaCl 18 %**	**Crecimiento a pH 4,4**	**Crecimiento a pH 9,6**	**Tipo de ácido láctico**
Aerococcaceae	*Aerococcus*	Cocos (tétradas)	-	+	-	+	-	-	+	L
Carnobacteriaceae	*Carnobacterium*	Bacilos	Variable	+	-	ND	-	ND	-	L
Enterococcaceae	*Enterococcus*	Cocos	-	+	+	+	+	+	+	L
	Tetrageonococcus	Cocos (tétradas)	-	+	-	+	-	Variable	+	L
	Vagococcus	Cocos	-	+	-	-	-	+	Variable	ND
Lactobacillaceae (incluyendo las antiguas Leuconostocaceae)	*Lactobacillus*	Bacilos	Variable	Variable	Variable	Variable	-	Variable	-	D, L, DL
	Pediococcus	Cocos (tétradas)	-	Variable	Variable	Variable	-	+	-	L, DL
	Leuconostoc	Cocos	+	+	-	Variable	-	Variable	-	D, L, DL
	Fructobacillus	Bacilos	+	±	-	±	-	Variable	±	D, L, DL
	Oenococcus	Cocos	+	+	-	Variable	-	Variable	-	D, L, DL
	Weisella, Periweisella	Bacilos / cocos	+	+	-	Variable	-	Variable	-	D, DL
Streptococcaceae	*Lactococcus*	Cocos	-	+	-	-	-	Variable	-	L
	Streptococcus	Cocos	-	-	Variable	-	-	-	-	L

ND: No Determinado

L: Ácido L-láctico (Levógiro), D: Ácido D-láctico (Dextrógiro), DL: Ácido DL-láctico (Racémico).

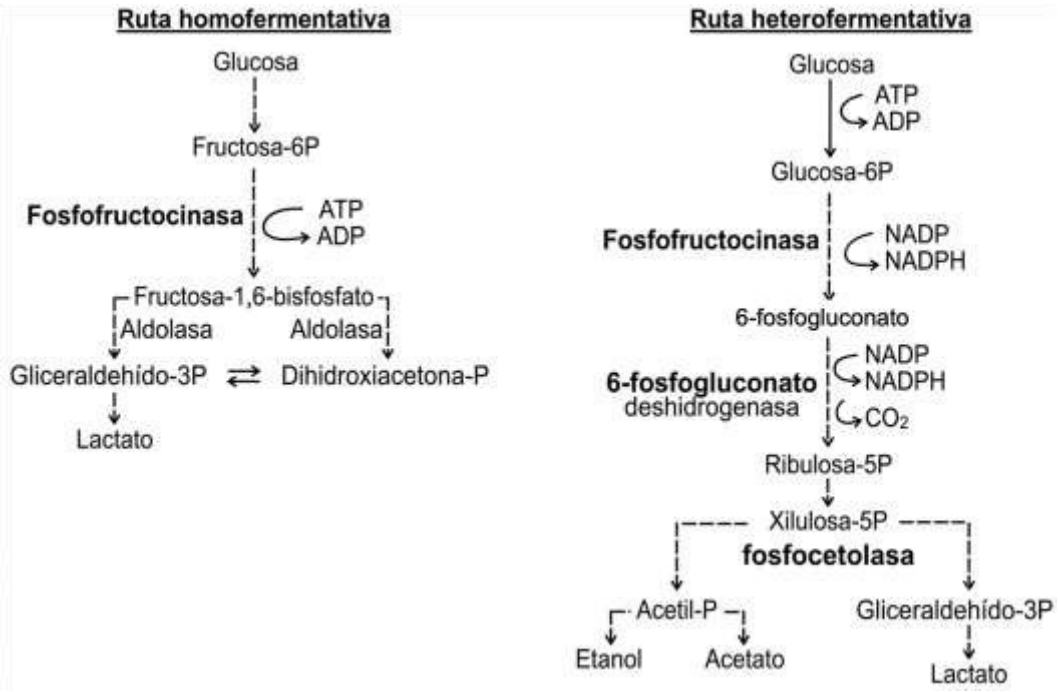


Figura 2. Rutas metabólicas de bacterias ácido-lácticas homofermentativas y heterofermentativas (38)

2.2.7.3 Tipo de fermentación en bacterias lácticas

Las bacterias ácido-lácticas, incluyendo las especies del género *Lactobacillus*, son microorganismos que obtienen energía a partir de la degradación de sustratos orgánicos mediante fosforilación a nivel de sustrato. Su metabolismo fermentativo se caracteriza por la utilización preferencial de la vía glucolítica, aunque determinadas especies recurren adicionalmente a rutas alternativas como la vía de la fosfocetolasa o fosfogluconato. El proceso se inicia con la activación del sustrato a través de su fosforilación, que puede ocurrir por la acción de una glucoquinasa dependiente de ATP o mediante un sistema fosfotransferasa acoplado al fosfoenolpiruvato**.** Cuando el sustrato fermentable es una hexosa, el resultado metabólico varía según la ruta empleada. En las bacterias clasificadas como homofermentativas, la glucosa se degrada mediante la vía de Embden-Meyerhof-Parnas, obteniéndose ácido láctico como producto mayoritario. En las heterofermentativas, el catabolismo de hexosas transcurre por la vía del 6-fosfogluconato o la fosfocetolasa, generando además de ácido láctico, dióxido de carbono y compuestos como etanol o acetato. Las pentosas, en cambio, son metabolizadas exclusivamente por la ruta heterofermentativa a través de intermediarios como ribulosa-5-fosfato o xilulosa-5-fosfato, sin producción de CO_2. La distinción entre ambos grupos fermentativos se

fundamenta a nivel genético en la presencia o ausencia del gen que codifica la 6-fosfofructoquinasa, enzima clave de la glucólisis cuya ausencia impide el metabolismo homofermentativo de hexosas (Figura 2) (42).

2.2.7.4 Tolerancia a pH ácido

Es la capacidad de ciertos microorganismos, para mantener su viabilidad y funcionalidad metabólica en entornos con elevada concentración de protones. Para las bacterias ácido-lácticas, esta propiedad resulta determinante, ya que su supervivencia en condiciones de acidez depende de la activación coordinada de distintos sistemas de defensa intracelular que permiten preservar la homeostasis del pH citoplásmico. Entre los mecanismos de respuesta más descritos se encuentra la bomba F_0F_1-ATPasa, que transporta protones desde el interior celular hacia el medio externo mediante el consumo de ATP, reduciendo así la acidificación intracelular. De manera complementaria, la descarboxilación del glutamato constituye otro sistema de neutralización de protones, en el que este aminoácido es convertido en γ-aminobutirato (GABA) y CO_2, con consumo neto de H^+ que contribuye a estabilizar el pH intracelular. A nivel de membrana, la disminución proporcional de ácidos grasos insaturados en la bicapa lipídica reduce la permeabilidad a los protones, incrementando la resistencia estructural frente a la acidez exterior. Estos mecanismos en conjunto permiten a las bacterias ácido-lácticas subsistir en ambientes con pH de hasta 3,5–4,0, como los presentes en el tracto gastrointestinal o en matrices alimentarias fermentadas. En los lactobacilos, la respuesta al estrés ácido involucra adicionalmente la inducción de proteínas chaperonas como GroEL y DnaK, cuya función consiste en estabilizar y reparar proteínas que han sufrido desnaturalización parcial como consecuencia de la acidez. Esta capacidad adaptativa es especialmente relevante en el contexto vaginal, donde los lactobacilos deben tolerar el pH ácido que ellos mismos generan mediante la producción de ácido láctico, el cual inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos pero que, a concentraciones elevadas, podría comprometer su propia viabilidad si no se activan dichos mecanismos reguladores (43).

2.2.7.5 Auto-agregación y co-agregación

La capacidad de agregación constituye una propiedad biológica relevante para la eficacia de las cepas probióticas, ya que podría participar en la adhesión, colonización y formación de biopelículas, y contribuye a la resistencia frente a patógenos y al mantenimiento del equilibrio microbiano. La autoagregación en *Lactobacillus* corresponde al proceso mediante el cual las células bacterianas se adhieren entre sí formando agregados, lo que les permite establecer poblaciones dominantes y barreras biológicas que dificultan la

colonización por microorganismos patógenos. Esta capacidad ha sido descrita en especies como *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. crispatus* y *L. jensenii*, entre otras, en intervalos que varían desde minutos hasta 24 horas. A nivel macroscópico, la agregación se manifiesta mediante conglomerados celulares visibles, mientras que a nivel microscópico involucra interacciones entre moléculas de superficie bacteriana, componentes de membrana y fuerzas electrostáticas que estabilizan los agregados formados (44).

La coagregación, por su parte, corresponde a la interacción entre bacterias genéticamente diferentes mediada por moléculas de superficie específicas, lo que podría favorecer la formación de biopelículas y el intercambio genético. Los lactobacilos pueden coagregarse con microorganismos patógenos y no patógenos, incluyendo *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* y *Helicobacter pylori*, entre otros (44). Los probióticos vaginales contribuyen al equilibrio microbiológico mediante la competencia por sitios de adhesión epitelial, la coagregación con otros microorganismos, la producción de compuestos antimicrobianos y la interferencia en la formación de biopelículas patógenas, lo que en conjunto favorece la estabilidad de la microbiota y limita la proliferación de patógenos (Figura 3) (44).

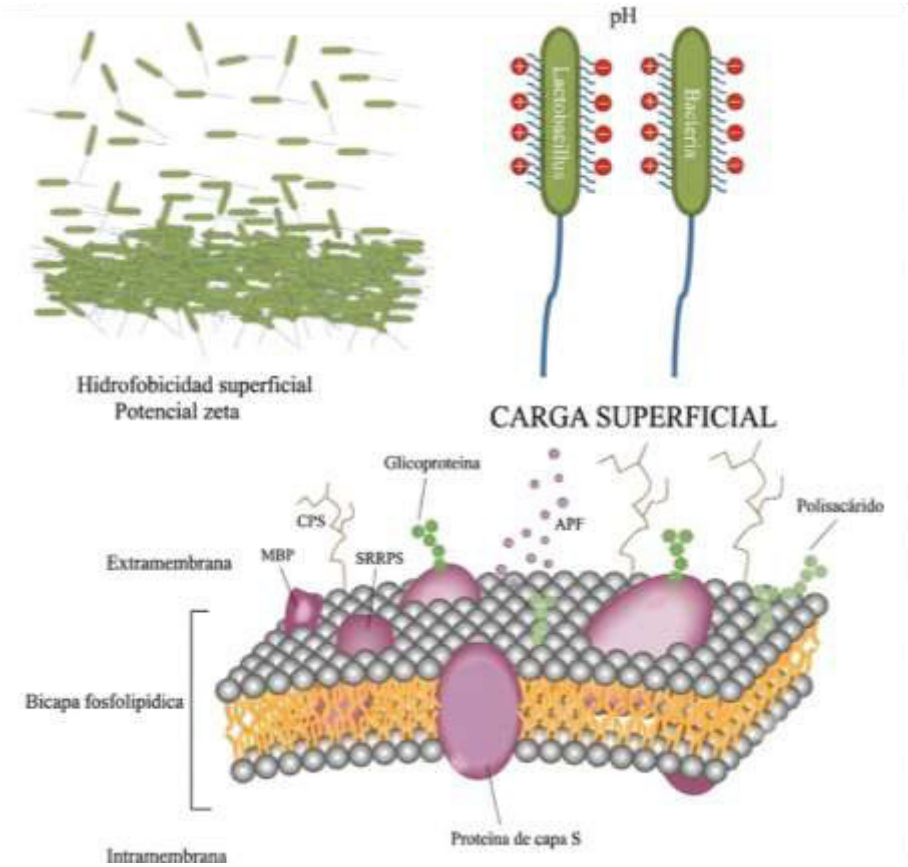


Figura 3. Proceso y mecanismos moleculares de la agregación de *Lactobacillus* (44)

2.2.8 Actividad antimicrobiana

Es la capacidad de una sustancia o microorganismo para inhibir el crecimiento o desarrollo de microorganismos patógenos, incluyendo bacterias, hongos y virus. Este efecto puede producirse mediante diferentes mecanismos, como la alteración de la integridad de la membrana celular, la inhibición de la síntesis de macromoléculas esenciales (proteínas, ADN y ARN) o la generación de condiciones ambientales desfavorables para el crecimiento microbiano (45). En el caso de las bacterias ácido-lácticas, esta actividad está asociada a la producción de diversas sustancias con propiedades antimicrobianas. Entre ellas destacan las bacteriocinas, péptidos capaces de afectar la integridad de las membranas de bacterias competidoras; los ácidos orgánicos, como el ácido láctico y el ácido acético, que disminuyen el pH del medio y otros compuestos como peróxido de hidrógeno, biosurfactantes y enzimas hidrolíticas, que contribuyen a inhibir el crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos. Además, estos microorganismos pueden limitar la proliferación de patógenos mediante competencia por nutrientes y espacio, reforzando su rol protector en ecosistemas microbianos como la mucosa vaginal (34,46).

La evaluación de la actividad antimicrobiana puede realizarse mediante métodos *in vitro*, entre los que destacan los ensayos de difusión en agar, el método spot-on-lawn y el análisis de sobrenadantes celulares, los cuales permiten determinar la capacidad inhibitoria frente a microorganismos indicadores. Asimismo, estudios *in vivo* permiten evaluar estos efectos en sistemas biológicos más complejos (Figura 4) (45).

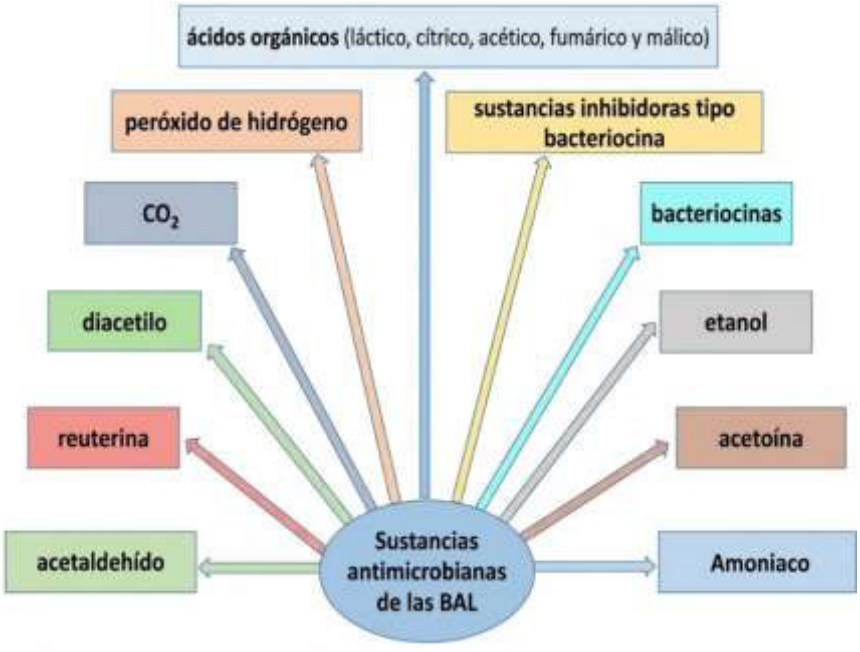


Figura 4. Sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido-lácticas (46).

2.2.8.1 Microorganismos causantes de infecciones vaginales

2.2.8.1.1 *Escherichia coli*

Es una bacteria Gram negativa ampliamente distribuida y caracterizada por una notable diversidad genética. Este microorganismo incluye tanto cepas comensales, que forman parte de la microbiota intestinal de humanos y animales, como cepas patógenas capaces de producir infecciones intestinales y extraintestinales. Las cepas patógenas se clasifican principalmente en patotipos diarreogénicos y patotipos extraintestinales, los cuales se diferencian por la presencia de distintos factores de virulencia. Entre los patotipos diarreogénicos se encuentran, por ejemplo, *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enteropatógena (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC) y enteroagregativa (EAEC), mientras que los patotipos extraintestinales pueden causar infecciones urinarias, sepsis o meningitis (47). Aunque *E. coli* puede encontrarse ocasionalmente en la microbiota vaginal sin generar manifestaciones clínicas, determinadas cepas con factores de virulencia pueden participar en procesos inflamatorios del tracto genital. En casos de vaginitis aeróbica se ha descrito su presencia junto con otros patógenos como *Streptococcus agalactiae y Staphylococcus aureus*. Estudios filogenéticos han mostrado que algunas cepas aisladas de vagina, líquido amniótico o infecciones neonatales pertenecen al grupo filogenético B2, asociado con patotipos extraintestinales (48).

2.2.8.1.2 *Streptococcus agalactiae*

Conocido también como *Streptococcus* del grupo B (GBS, por sus siglas en inglés), es una bacteria Gram positiva β-hemolítica asociada a infecciones neonatales graves. Este microorganismo forma parte de la microbiota del tracto gastrointestinal y del tracto genital femenino, encontrándose aproximadamente en el 20–25 % de las mujeres. La colonización materna constituye el principal factor de riesgo para la infección neonatal, ya que la transmisión ocurre principalmente durante el parto por contacto con secreciones vaginales colonizadas. Se estima que entre el 50 % y el 75 % de los recién nacidos de madres portadoras adquieren el microorganismo durante el nacimiento, aunque solo una fracción de ellos desarrolla enfermedad invasiva. Desde el punto de vista serológico, *S. agalactiae* se clasifica en diez serotipos capsulares (Ia, Ib y II–IX) determinados por la composición de su polisacárido capsular. Estos serotipos presentan distribución epidemiológica variable y algunos de ellos, como Ia, III y V, se asocian con mayor frecuencia a infecciones invasivas en neonatos. La patogenicidad del microorganismo

está relacionada con diversos factores de virulencia que favorecen la adhesión, colonización y evasión de la respuesta inmunitaria del hospedero (49).

2.2.8.1.3 *Gardnerella vaginalis*

Es un bacilo gramvariable, anaerobio facultativo, inmóvil y no formador de esporas. En condiciones normales, la microbiota vaginal se encuentra dominada por especies del género *Lactobacillus*; sin embargo, el incremento de *G. vaginalis* se asocia con un desequilibrio microbiano característico de la vaginosis bacteriana. Esta condición se caracteriza por un sobrecrecimiento polimicrobiano de bacterias anaerobias y la aparición de flujo vaginal anormal. Además de su implicancia en la vaginosis bacteriana, *G. vaginalis* ha sido aislada en diversas infecciones ginecológicas y obstétricas, incluyendo corioamnionitis, fiebre puerperal y bacteriemia neonatal, lo que evidencia su potencial patogénico en diferentes contextos clínicos (50).

2.2.8.1.4 *Candida albicans*

Es un hongo comensal y oportunista que coloniza de manera asintomática la mucosa oral, la piel, la vagina y el tracto gastrointestinal en individuos sanos, siendo responsable de más del 80% de las cepas de levaduras aisladas en estas áreas. Sin embargo, en situaciones de inmunidad debilitada, puede transformarse en un patógeno capaz de causar infecciones superficiales, como candidiasis vaginal, esofágica y cutánea, y en casos graves, infecciones invasivas. Durante la infección, *C. albicans* adopta diversas formas morfológicas, incluyendo levaduras, pseudohifas, hifas y clamidosporas, lo que le permite adaptarse al ambiente y penetrar en tejidos. Este hongo se adhiere a la mucosa y cambia de un estado de levadura a hifas invasivas, facilitando su colonización y la ruptura de barreras epiteliales (51,52).

El mecanismo de infección de *C. albicans* en el tracto urogenital femenino se inicia con la adhesión del hongo al epitelio vaginal, seguida de la colonización e invasión de los tejidos. Este proceso está asociado a su plasticidad morfológica, que le permite alternar entre formas de levadura, pseudohifas e hifas, facilitando la penetración del epitelio. Asimismo, la expresión de adhesinas y la secreción de enzimas hidrolíticas, como las aspartil proteinasas, contribuyen a la degradación de componentes celulares del hospedero y favorecen la invasión tisular. Además, la producción de candidalisina puede provocar daño directo en las células epiteliales y desencadenar respuestas inflamatorias locales. Cuando se altera el equilibrio de la microbiota vaginal o las defensas del hospedero, estos mecanismos favorecen el desarrollo de candidiasis vulvovaginal, una de las infecciones micóticas más frecuentes en mujeres (51,52).

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo y diseño de investigación

Tipo básica y diseño descriptivo

3.2 Consideraciones éticas

El presente estudio se desarrolló a partir de muestras del proyecto "Caracterización del microbioma vaginal peruano y aislamiento de lactobacilos con potencial probiótico" (contrato de financiamiento N° IBA-IB-47-2020-UNSA), el cual contó con la aprobación del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (CONSTANCIA-CIEI-R-285-40-23). Todas las participantes del proyecto original firmaron un consentimiento informado previo a la recolección de las muestras. El presente estudio no involucró contacto directo con las participantes, dado que se trabajó exclusivamente con las cepas aisladas y criopreservadas.

3.3 Unidad de análisis

Cepa de lactobacilo aislado e identificado.

3.4 Población de estudio

Conformada por 569 cepas de lactobacilos aisladas de 102 hisopados vaginales de mujeres sanas, con edades comprendidas entre 17 y 67 años, residentes en la ciudad de Arequipa.

3.5 Muestra y tamaño de muestra

Conformada por 248 lactobacilos aislados de hisopados de la mucosa vaginal de mujeres sanas.

3.6 Técnicas o instrumentos de recolección de la información o de datos

3.6.1 Identificación de las bacterias aisladas mediante MALDI-TOF MS

3.6.1.1 Recolección de muestras

Se recibieron las cepas aisladas de hisopados vaginales que crecieron en agar MRS, provenientes del proyecto “Caracterización del microbioma vaginal peruano y aislamiento de lactobacilos con potencial probiótico” con contrato de financiamiento N° IBA-IB-47-2020-UNSA, el cual cuenta con la resolución de autorización del Comité de ética CONSTANCIA-CIEI-R-285-40-23 del Comité Institucional de ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Figura 6).

3.6.1.2 Reactivación y preservación de cepas

La reactivación de cepas conservadas en congelación se realizó mediante el cultivo en agar MRS a 37 °C durante 24 a 48 h en una incubadora de CO_2, para su posterior descripción e identificación.

Las colonias identificadas se conservaron en caldo MRS que contenían 20% (v/v) de glicerol a -80 °C) (53). Para posteriormente evaluar la seguridad (actividad catalasa, actividad hemolítica, actividad gelatinasa, susceptibilidad a antibióticos y actividad antimicrobiana) y eficacia (tolerancia a pH ácido y producción de ácido láctico) se utilizó como control *L. rhamnosus* ATCC 53103 (54).

3.6.1.3 Descripción microscópica

Las bacterias recolectadas fueron caracterizadas mediante la técnica de tinción de Gram y se observó el portaobjetos en un microscopio con campo claro utilizando el objetivo de 100X (55).

3.6.1.4 Identificación de lactobacilos mediante MALDI-TOF MS

La identificación proteómica de las colonias aisladas se realizó mediante el equipo espectrometría de masas con tiempo de vuelo (VITEK, BioMérieux). Las muestras se cultivaron durante 24-48 horas con CO_2 5% a 37ºC. Se hizo un frotis sobre el slide MS y se dejó secar. Se añadió 1 µL de matriz MS-CHCA (α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid) dejándose secar durante 5 minutos. Se usó la cepa *E. coli* ATCC 8739. El procesamiento de los resultados fue mediante la plataforma VITEK® MS Plus / RUO SARAMIS (26).

3.6.2 Evaluación de la seguridad de los lactobacilos aislados

3.6.2.1 Actividad catalasa

Se mezcló una gota de H_2O_2 al 3 % con una única colonia usando un asa de siembra de nicrom, la falta de burbujas indicó un resultado negativo. Se utilizó como control positivo la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (56).

3.6.2.2 Actividad hemolítica

Se cultivaron las muestras en placas de agar sangre durante 24-48 h con CO_2 al 5% a 37 °C. Se utilizó *S. aureus* ATCC 25923 como control positivo. La reacción hemolítica se evaluó observando tanto la hidrólisis parcial de los glóbulos rojos como la producción de una zona verde (α-hemólisis), así como la hidrólisis total de los glóbulos rojos produciendo una zona clara alrededor de la colonia bacteriana (β-hemólisis) o ninguna reacción (γ-hemólisis) (57).

3.6.2.3 Actividad gelatinasa

Se cultivaron las muestras en caldo MRS durante 24 h a 37°C y luego se inocularon en el medio con gelatina hasta el fondo del tubo (peptona bacteriana al 0,5% y gelatina bovina al 12%), se incubaron a 37°C CO_2 al 5% durante 24 h. Después de este período, se refrigeraron a 4°C durante 30 min. Se consideraron positivas las muestras que presentaron

licuefacción del medio; las muestras negativas se mantuvieron durante 48 h a 37°C y se enfriaron nuevamente y los que permanezcan sólidos se consideraron negativos (58,59). Las colonias que tengan actividad catalasa negativo, γ-hemólisis y actividad gelatinasa negativo continuarán siendo evaluadas.

3.6.2.4 Susceptibilidad a los antibióticos

Se determinó mediante el método de difusión en disco de agar. Las muestras se cultivaron en caldo MRS a 37 °C con CO_2 al 5% durante 24 h. Después se inocularon en caldo MRS y se diluyeron 1:10 en caldo MRS, se inoculó 0,1 mL de cada aislado diluido en 25 mL de agar MRS mantenido a 45 °C y se vertieron en placas Petri hasta solidificar. Después de la solidificación de las placas de agar inoculadas, se colocaron discos de siete antibióticos, seleccionados con base en los antibióticos evaluados previamente (52,53,56,59,60) como ampicilina (10 ug), eritromicina (15 ug), tetraciclina (30 ug), vancomicina (30 ug), ciprofloxacino (5 ug), rifampicina (5 ug) y cloranfenicol (30 ug). Estos se incubaron a 37°C con CO_2 5% durante 24 h (53,54,57). Los datos se expresaron en términos de resistencia (R), susceptibilidad intermedia (I) y susceptibilidad (S). Los puntos de corte para ampicilina, eritromicina, tetraciclina, vancomicina, ciprofloxacino y cloranfenicol se obtuvieron de estudios que evaluaron bacterias ácido-lácticas mediante difusión en disco (Tabla 18) (60,61), mientras que para rifampicina se basaron en las recomendaciones del CLSI M46 (62). Para las siguientes evaluaciones se seleccionaron únicamente los lactobacilos que no presentaron resistencia a ninguno de los antibióticos evaluados.

3.6.3 Evaluación de la eficacia de los lactobacilos aislados

3.6.3.1 Cultivo de MRS con púrpura de bromocresol

Se inocularon las muestras en agar y caldo MRS suplementado con 0,012% (p/v) de púrpura de bromocresol a 37 °C con CO_2 al 5% durante 48 h. Se evaluó el cambio de color a amarillo, lo que indicaba la capacidad de producir ácido láctico (63).

3.6.3.2 Cultivo de MRS con Carbonato de Calcio

Se usó la metodología modificada de Stephen y Mohammed (64), para lo cual se inocularon en placas con agar MRS suplementado con 1% de carbonato de calcio. Se incubó a 37 °C con CO_2 al 5%. Se evaluó la presencia de una zona transparente que alrededor del inóculo desde el día 1 al día 7. La presencia de un halo alrededor del inóculo se interpretó como un resultado positivo, mientras que la ausencia como negativo.

3.6.3.3 Medición del pH después de la incubación

Se inocularon los lactobacilos en caldo MRS, utilizando 1 mL de cultivo bacteriano en 10 mL de medio, y se incubaron a 37 °C con CO_2 al 5 % durante 72 h. El pH se registró con un medidor de pH al inicio del ensayo (0 h) y después de 24, 48 y 72 h de incubación, con la finalidad de evaluar la acidificación del medio durante el crecimiento de los lactobacilos. El ensayo se realizó por duplicado (64,65).

3.6.3.4 Detección de bacterias lácticas homofermentativas

Se inocularon las muestras en agar diferencial de bacterias lácticas (medio diferencial homofermentativo-heterofermentativo) suplementado con polisorbato 80, donde se observa la acidificación producida durante la fermentación de la fructosa, evidenciada por el cambio de color del verde de bromocresol (indicador de pH). Se incubó a 37 °C con CO_2 al 5%. Se evaluó el cambio de color después de 48 h. Las bacterias homofermentativas forman colonias de color azul-verdoso en el agar, mientras que las heterofermentativas no forman colonias muy coloreadas en la superficie del agar (64).

3.6.3.5 Tolerancia a pH ácido

Se evaluaron las muestras en caldo MRS con pH 3, pH 4, pH 5 y pH 6. Previamente se inocularon en 5 mL de caldo MRS durante 48h. Luego se inocularon 100 uL en 900 uL con caldo MRS con pH ajustado a 37 °C con CO_2 al 5% durante 24 y 48. Para evaluar la tolerancia se cuantificó los valores de UFC/mL de cada caldo MRS con pH ajustado, al inicio (t_0) después de 24 y 48 h mediante la técnica de goteo de diluciones seriadas (65,66)

3.6.3.6 Capacidad de auto-agregación y co-agregación

Para la determinación de la capacidad de autoagregación mediante la cuantificación de la disminución de la absorbancia de la suspensión celular, producida por la formación y sedimentación progresiva de agregados entre células de una misma cepa; se modificó la metodología descrita por Pessoa et al (67), para lo cual se cultivaron cepas de lactobacilos en caldo MRS durante 48 h. Se lavaron dos veces con buffer PBS los pellets celulares (8000 × g, 10 min), se resuspendió a 1×10^8 UFC/mL^{-1} en buffer PBS y se añadió 200 uL de cada suspensión en una placa de microdilución. Después, las suspensiones se agitaron e incubaron a 37 °C con CO_2 al 5% durante 24 h y se leyó su absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro a los 0, 4 y 24 h. La capacidad de auto-agregación se expresó en porcentaje y se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de agregación} = ((A_0 / A_t) / A_0) \times 100$$

Donde A_0 indica la absorbancia a las 0 h y A_t indica la absorbancia a determinada hora, hasta las 24 h.

Para la determinación de la capacidad de coagregación mediante la cuantificación de la disminución de la absorbancia de la suspensión mixta, producida por la formación y sedimentación de agregados entre los lactobacilos y las células de los microorganismos patógenos evaluados. Se preparó una suspensión de lactobacilos similar al ensayo de autoagregación. Se preparó una suspensión de células de las cepas patógenas *Escherichia coli* ATCC 25922*, Streptococcus agalactiae* ATCC 12386*, Gardnerella vaginalis* ATCC 49145 y *Candida albicans* ATCC 10231 previamente cultivadas en caldo BHI se resuspendió a 1×10^8 UFC/mL^{-1} en buffer PBS, se añadió 100 uL de cada suspensión de lactobacilos y 100 uL de cada suspensión de cepas patógenas, además, se colocó como control 200 uL de cepas patógenas en una placa de microdilución. Se incubaron a 37 °C con CO_2 al 5% durante 24 h y se leyó su absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro a los a los 0, 4 y 24 h. El porcentaje de coagregación con cada cepa se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de coagregación} = (A_0 - A_t)/A_0 \times 100$$

Donde A_0 indica la absorbancia a las 0 h y At indica la absorbancia a determinada hora, hasta las 24 h.

3.6.4 Evaluación la actividad antimicrobiana de lactobacilos

3.6.4.1 Actividad antibacteriana

Se utilizó el método de difusión en pozos de agar. Para lo cual, previamente se incubaron los lactobacilos en caldo MRS a 37 °C con CO_2 al 5% durante 48 h. Posteriormente, los cultivos de lactobacilos se centrifugaron a 3000 RPM durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante libre de células (CFS, por sus siglas en ingles). Después, se inoculó 0,5 McFarland de *E. coli* ATCC 25922 en placas con agar Mueller Hinton, *S. agalactiae* ATCC 12386, *G. vaginalis* ATCC 49145 en agar sangre. Luego, se hicieron pozos de 6 mm de diámetro y se inoculó 100 uL del sobrenadante obtenido previamente en cada pozo. Estas placas se incubaron 37 °C con CO_2 al 5% durante 24 h y se midieron los diámetros de las zonas de inhibición (mm) (68).

3.6.4.2 Actividad antifúngica

Se utilizó el método modificado descrito por Kang et al., (69), se agregaron 5 ml de CFS de lactobacilos (3000 RPM durante 15 minutos) a 5 mL de caldo TSB con *Candida albicans* ATCC 10231 previamente cultivada durante aproximadamente 24 h y ajustada a una concentración inicial de 10^4–10^5 UFC/mL, correspondiente a una fase exponencial temprana. La viabilidad celular se midió después de 24 h. Para el control negativo se utilizó cultivo de *C. albicans* sin adición de cepas bacterianas.

3.7 Procesamiento de la información o de datos

Los datos obtenidos se registraron en Microsoft Excel versión 2311 y se analizaron con SPSS versión 29,0 (nivel de significancia $\alpha = 0,05$). Para la evaluación de la seguridad, la asociación entre las especies de lactobacilos y la actividad catalasa, hemolítica y gelatinasa se evaluó mediante la prueba exacta de Fisher-Freeman-Halton con corrección de Monte Carlo (10,000 muestras; IC 95%). La susceptibilidad a antibióticos se analizó con la prueba de Kruskal-Wallis. Para la tolerancia a pH ácido, producción de ácido láctico, actividad antimicrobiana y auto-coagregacion se evaluó con Shapiro-Wilk. Posteriormente, se evaluó con Kruskal-Wallis o ANOVA, según corresponda, a un nivel de confianza de 95% utilizando el programa estadístico SPSS.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1 Identificación de las bacterias aisladas de hisopados vaginales mediante MALDI-TOF MS

En la tabla 2 se muestran los resultados despues de realizar la tinción de Gram de las 569 cepas aisladas provenientes de 102 hisopados vaginales de mujeres sanas. Se obtuvo 266 cepas (46,75%) correspondientes a bacilos Gram positivos, 253 (44,46%) de cocos Gram positivos, 4 (0,70 %) de bacilos Gram negativos, 15 (2,64%) de levaduras y 31 (5,45 %) cepas eran colonias mixtas (combinaciones de levaduras, bacilos y/o cocos en una misma muestra), las cuales no fueron consideradas para la identificación posterior.

Entre los 266 bacilos Gram positivos se identificaron las familias Actinomycetaceae (9/266), Bifidobacteriaceae (5/266), Corynebacteriaceae (4/266) y Lactobacillaceae (248/266). De los 248 lactobacilos se identificaron 6 especies los cuales correspondían a *Lactobacillus acidophilus/gasseri* (21/248), *Lactobacillus crispatus* (201/248), *Lactobacillus jensenii* (12/248), *Lactobacillus reuteri* (2/248), *Lactobacillus rhamnosus* (2/248) y *Lactobacillus* sp. (10/248).

En la Figura 5 se observa la tinción de Gram de las seis especies de lactobacilos identificados.

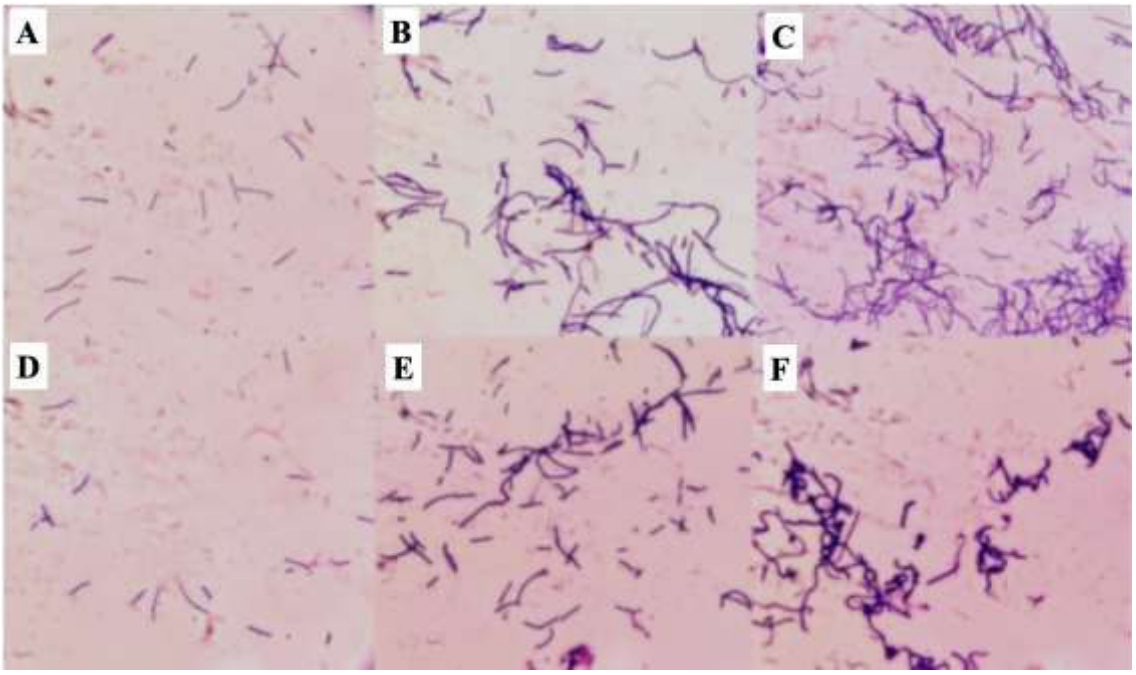


Figura 5. Tinción de Gram de las cepas de lactobacilos aislados A. *L. acidophilus/gasseri,* B. *L. crispatus*, C. *L. jensenii*, D. *L. reuteri*, E. *L. rhamnosus*, F. *Lactobacillus* sp.

Tabla 2. Distribución taxonómica de los microorganismos identificados mediante MALDI-TOF MS

Tinción Gram (n / %)	**Familia (n)**	**Especie (n)**
Bacilos Gram positivos (266 / 46,75)	Actinomycetaceae (9)	*Actinomyces urogenitalis* (2)
		Actinotignum schaalii (7)
	Bifidobacteriaceae (5)	*Bifidobacterium* sp. (5)
	Corynebacteriaceae (4)	*Corynebacterium urealyticum* (2)
		Corynebacterium amycolatum/xerosis (1)
		Corynebacterium jeikeium (1)
	Lactobacillaceae (248)	*Lactobacillus acidophilus/gasseri* (21)
		Lactobacillus crispatus (201)
		Lactobacillus jensenii (12)
		Lactobacillus reuteri (2)
		Lactobacillus rhamnosus (2)
		Lactobacillus sp. (10)
Bacilos Gram negativos (4 / 0,70)	Enterobacteriaceae (4)	*Klebsiella pneumoniae* (3)
		Morganella morganii (1)
	Aerococcaceae (5)	*Facklamia hominis* (5)
Cocos Gram positivos (253 / 44,46)	Enterococcaceae (27)	*Enterococcus durans* (1)
		Enterococcus faecalis (23)
		Enterococcus faecium (3)
	Staphylococcaceae (78)	*Staphylococcus aureus* (1)
		Staphylococcus epidermidis (60)
		Staphylococcus equorum (1)
		Staphylococcus haemolyticus (8)
		Staphylococcus hominis (5)
		Staphylococcus lugdunensis (1)
		Staphylococcus warneri (2)
	Streptococcaceae (44)	*Streptococcus agalactiae* (10)
		Streptococcus anginosus (25)
		Streptococcus gallolyticus (4)
		Streptococcus salivarus (1)
		Streptococcus sp. (4)
	No identificados (99)	
Levaduras (15 / 2,64)	Saccharomycetaceae (14)	*Candida africana/albicans* (7)
		Candida africana/albicans/dubliniensis (2)
		Candida albicans (4)
		Candida albicans/africana/dubliniensis (1)
	No identificados (1)	
Colonias mixtas (31 / 5,45)		
Total		569 (100)

4.2 Evaluación de la seguridad de los lactobacilos aislados

4.2.1 Actividad catalasa, hemolítica y gelatinasa

Se realizó la evaluación de la seguridad en los 248 lactobacilos identificados. En la Tabla 3, se observa que el 98.79% de los lactobacilos no presentaron actividad catalasa, mientras que solo 3 (1,21%) mostraron resultado positivo. Estos tres casos positivos correspondieron a una cepa de *L. crispatus* y dos cepas de *Lactobacillus* sp. Respecto a la actividad hemolítica, 246 (99,19%) lactobacilos presentaron hemólisis gamma, 2 (0,81%) presentaron hemólisis alfa, las cuales correspondían a *L. crispatus*. Ningún lactobacilo presentó hemólisis beta. En cuanto a la actividad gelatinasa, 240 (96,77%) lactobacilos no presentaron actividad gelatinasa, mientras que 8 (3,23%) presentaron actividad gelatinasa, estos correspondían a *L. crispatus*.

Se determinó la asociación entre las especies de lactobacilos y la presencia de cada actividad catalasa, hemolítica y gelatinasa mediante la prueba exacta de Fisher-Freeman-Halton con corrección de Monte Carlo. Se observó diferencia estadísticamente significativa entre las especies de lactobacilos y la actividad catalasa ($p = 0,026$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las especies de lactobacilos y la actividad hemolítica y gelatinasa ($p = 1,000$).

Solamente 235 lactobacilos no presentaron actividad catalasa, hemolítica ni gelatinasa, por lo que fueron consideradas las siguientes determinaciones (Figura 7).

Tabla 3. Determinación de la actividad catalasa, hemolítica y gelatinasa de los lactobacilos aislados

Especies	**Catalasa**		**Hemólisis**		**Gelatinasa**	
	Negativo	**Positivo**	**Gamma**	**Alfa**	**Negativo**	**Positivo**
L. acidophilus/gasseri	21	0	21	0	21	0
L. crispatus	200	1	199	2	193	8
L. jensenii	12	0	12	0	12	0
L. reuteri	2	0	2	0	2	0
L. rhamnosus	2	0	2	0	2	0
Lactobacillus sp.	8	2	10	0	10	0
Total n (%)	245 (98,79)	3 (1,21)	246 (99,19)	2 (0,81)	240 (96,77)	8 (3,23)

4.2.2 Susceptibilidad a los antibióticos

En la tabla 4, se muestra que la sensibilidad a ampicilina se presentó en 229 de 235 (97,45 %) lactobacilos, a eritromicina en 208 (88,51 %), a tetraciclina en 213 (90,64 %), a vancomicina en 219 (93,19 %) y a rifampicina en 220 (93,62 %). En contraste, la resistencia a ciprofloxacino fue la más elevada, registrándose en 215 (91,49 %) lactobacilos. La prueba de Kruskal-Wallis reveló diferencias estadísticamente significativas entre las especies de lactobacilos en el perfil de susceptibilidad a seis de los siete antibióticos evaluados, ampicilina ($p < 0,001$), eritromicina ($p = 0,005$), vancomicina ($p < 0,001$), ciprofloxacino ($p = 0,001$), rifampicina ($p = 0,002$) y cloranfenicol ($p = 0,049$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre especies para la tetraciclina ($p = 0,065$).

En la Tabla 5, se presentan los 13 lactobacilos que no presentaron resistencia frente a ninguno de los antibióticos evaluados, los cuales corresponden a *L. crispatus*, *L. jensenii* y *L. acidophilus/gasseri*. Todas las cepas presentaron sensibilidad completa frente a ampicilina, vancomicina, rifampicina y cloranfenicol. En contraste, la mayoría de las cepas presentó sensibilidad intermedia frente a ciprofloxacino, tetraciclina y eritromicina (Figura 7).

Tabla 4. Resumen del perfil de susceptibilidad de los lactobacilos a antibióticos

Especies	Perfil	AMP n (%)	E n (%)	TE n (%)	VA n (%)	CIP n (%)	RI n (%)	C n (%)
Lactobacillus acidophilus / gasseri (n=17)	S	17 (7,23)	16 (6,81)	15 (6,38)	16 (6,81)	2 (0,85)	17 (7,23)	16 (6,81)
	I	0	1 (0,43)	1 (0,43)	0	0	0	0
	R	0	0	1 (0,43)	1 (0,43)	15 (6,38)	0	1 (0,43)
Lactobacillus crispatus (n=195)	S	191 (81,28)	174 (74,04)	180 (76,60)	187 (79,57)	4 (1,70)	184 (78,30)	179 (76,17)
	I	1 (0,43)	9 (3,83)	2 (0,85)	1 (0,43)	8 (3,40)	1 (0,43)	0
	R	3 (1,28)	12 (5,11)	13 (5,53)	7 (2,98)	183 (77,87)	10 (4,26)	16 (6,81)
Lactobacillus jensenii (n=12)	S	10 (4,26)	7 (2,98)	9 (3,83)	10 (4,26)	1 (0,43)	8 (3,40)	9 (3,83)
	I	1 (0,43)	1 (0,43)	1 (0,43)	0	2 (0,85)	0	0
	R	1 (0,43)	4 (1,70)	2 (0,85)	2 (0,85)	9 (3,83)	4 (1,70)	3 (1,28)
Lactobacillus reuteri (n=2)	S	2 (0,85)	2 (0,85)	0	0	0	2 (0,85)	1 (0,43)
	I	0	0	2 (0,85)	0	0	0	0
	R	0	0	0	2 (0,85)	2 (0,85)	0	1 (0,43)
Lactobacillus rhamnosus (n=2)	S	2 (0,85)	2 (0,85)	2 (0,85)	0	1 (0,43)	2 (0,85)	2 (0,85)
	I	0	0	0	0	1 (0,43)	0	0
	R	0	0	0	2 (0,85)	0	0	0
Lactobacillus sp. (n=7)	S	7 (2,98)	7 (2,98)	7 (2,98)	6 (2,55)	1 (0,43)	7 (2,98)	7 (2,98)
	I	0	0	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	1 (0,43)	6 (2,55)	0	0
Total (n=235)	S	229 (97,45)	208 (88,51)	213 (90,64)	219 (93,19)	9 (3,83)	220 (93,62)	214 (91,06)
	I	2 (0,85)	11(4,68)	6 (2,55)	1 (0,43)	11 (4,68)	1 (0,43)	0
	R	4 (1,70)	16 (6,81)	16 (6,81)	15 (6,38)	215 (91,49)	14 (5,96)	21 (8,94)
H de Kruskal – Wallis		15,58	10,66	5,47	32,80	14,22	12,58	6,02

S: sensible, I: intermedio; R: resistente, AMP: ampicilina, E: eritromicina, TE: tetraciclina, VA: vancomicina, CIP: ciprofloxacino, RI: rifampicina, C: cloranfenicol

Tabla 5. Lactobacilos no resistentes a antibióticos

Cepa	Especie	AMP	E	TE	VA	CIP	RI	C
TPV-038	*L. jensenii*	S	S	I	S	S	S	S
TPV-039	*L. jensenii*	S	S	S	S	I	S	S
TPV-376	*L. crispatus*	S	I	S	S	S	S	S
TPV-071	*L. jensenii*	S	S	S	S	I	S	S
TPV-391	*L. crispatus*	S	S	S	S	S	S	S
TPV-097	*L. crispatus*	S	S	S	S	I	S	S
TPV-098	*L. crispatus*	S	S	S	S	I	S	S
TPV-422	*L. acidophilus/gasseri*	S	S	I	S	S	S	S
TPV-159	*L. crispatus*	S	S	S	S	I	S	S
TPV-170	*L. crispatus*	S	S	S	S	I	S	S
TPV-171	*L. crispatus*	S	S	S	S	I	S	S
TPV-193	*L. crispatus*	S	S	S	S	I	S	S
TPV-598	*L. acidophilus/gasseri*	S	S	S	S	S	S	S

S: sensible, I: intermedio; R: resistente, AMP: ampicilina, E: eritromicina, TE: tetraciclina, VA: vancomicina, CIP: ciprofloxacino, RI: rifampicina, C: cloranfenicol

4.3 Evaluación de la eficacia de los lactobacilos aislados

4.3.1 Cultivo con púrpura de bromocresol

En la tabla 6 se observa que el cultivo de agar MRS con púrpura de bromocresol las cepas TPV-159, TPV 170 y TPV-171 (*L. crispatus*) presentaron el mayor nivel de acidificación (+++ alto). En el cultivo en caldo MRS con púrpura de bromocresol las cepas TPV-038 (*L. jensenni*), TPV-159 (*L. crispatus*) y TPV-598 (*L. acidophilus/gasseri*) presentaron mayor acidificación (Figura 8F). La comparación entre cepas reveló diferencias estadísticamente significativas tanto en agar como en caldo suplementados con 0,02 % de púrpura de bromocresol (prueba de Kruskal-Wallis: $H = 38{,}000$, $p < 0{,}001$ en ambos medios).

4.3.2 Cultivo de MRS con carbonato de calcio

En la tabla 6 se observa que ninguno de los lactobacilos vaginales evaluados presentó formación de halo alrededor del inóculo tras la incubación. En contraste, la cepa control *L. rhamnosus* ATCC 53103 presentó un halo alrededor del inóculo, indicando actividad de solubilización del carbonato de calcio (Figura 8G).

Tabla 6. Evaluación cualitativa de producción de ácido láctico en diferentes medios de cultivo

Cepa	Agar MRS + Púrpura de bromocresol	Caldo MRS + Púrpura de bromocresol	Agar MRS + Carbonato de Calcio
TPV-038	++ (medio)	+++ (alto)	Negativo
TPV-039	++ (medio)	++ (medio)	Negativo
TPV-376	++ (medio)	++ (medio)	Negativo
TPV-071	++ (medio)	++ (medio)	Negativo
TPV-391	++ (medio)	++ (medio)	Negativo
TPV-097	++ (medio)	++ (medio)	Negativo
TPV-098	++ (medio)	+ (bajo)	Negativo
TPV-422	+ (bajo)	+ (bajo)	Negativo
TPV-159	+++ (alto)	+++ (alto)	Negativo
TPV-170	+++ (alto)	++ (medio)	Negativo
TPV-171	+++ (alto)	++ (medio)	Negativo
TPV-193	+ (bajo)	+ (bajo)	Negativo
TPV-598	++ (medio)	+++ (alto)	Negativo
Control +	++++ (muy alto)	++++ (muy alto)	Positivo

4.3.3 Medición del pH después de la incubación

En la tabla 7 se observa que, a las 24 h las cepas TPV-097 (4,72 ± 0,03) y TPV-098 (4,73 ± 0,01) presentaron los valores más bajos de pH. A las 48 h, las mismas cepas TPV-097 (4,54 ± 0,06) y TPV-098 (4,54 ± 0,02) mantuvieron el pH ácido. A las 72 h, las cepas TPV-097 (4,46 ± 0,02), TPV-098 (4,50 ± 0,02), TPV-376 (4,52 ± 0,02) y TPV-071 (4,53 ± 0,02) acidificaron más el medio en comparación a los otros lactobacilos.

Tabla 7. pH de los medios después de 24, 48 y 72 horas de incubación

Cepa	pH		
	24 h	**48 h**	**72 h**
TPV-038	$5,33 \pm 0,02^{f}$	$4,93 \pm 0,01^{g}$	$4,96 \pm 0,08^{e}$
TPV-039	$5,16 \pm 0,01^{e}$	$4,91 \pm 0,01^{fg}$	$4,83 \pm 0,04^{d}$
TPV-376	$4,79 \pm 0,02^{b}$	$4,64 \pm 0,03^{b}$	$4,52 \pm 0,02^{a}$
TPV-071	$4,8 \pm 0,03^{b}$	$4,63 \pm 0,01^{b}$	$4,53 \pm 0,02^{a}$
TPV-391	$5,05 \pm 0,02^{d}$	$4,80 \pm 0,01^{d}$	$4,80 \pm 0,06^{cd}$
TPV-097	$4,72 \pm 0,03^{a}$	$4,54 \pm 0,06^{a}$	$4,46 \pm 0,02^{a}$
TPV-098	$4,73 \pm 0,01^{a}$	$4,54 \pm 0,02^{a}$	$4,50 \pm 0,02^{a}$
TPV-422	$5,12 \pm 0,01^{e}$	$4,95 \pm 0,02^{g}$	$4,89 \pm 0,03^{de}$
TPV-159	$4,94 \pm 0,03^{c}$	$4,71 \pm 0,02^{c}$	$4,67 \pm 0,02^{b}$
TPV-170	$5,15 \pm 0,03^{e}$	$4,92 \pm 0,02^{fg}$	$4,82 \pm 0,04^{d}$
TPV-171	$5,10 \pm 0,05^{de}$	$4,82 \pm 0,02^{de}$	$4,72 \pm 0,01^{bc}$
TPV-193	$5,05 \pm 0,02^{d}$	$4,87 \pm 0,03^{ef}$	$4,72 \pm 0,02^{bc}$
TPV-598	$4,96 \pm 0,03^{c}$	$4,85 \pm 0,01^{de}$	$4,80 \pm 0,03^{cd}$
Control +	4,54 ± 0,02	4,51 ± 0,01	4,51 ± 0,01

Nota: Los valores se expresan como media ± desviación estándar. Letras superíndices diferentes dentro de una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre las cepas según la prueba de Tukey ($p < 0,05$); valores que comparten al menos una letra no presentan diferencias significativas.

4.3.4 Descripción del tipo de fermentación en bacterias lácticas

En la tabla 8, se muestra que 8 lactobacilos presentaron cambio de color del medio y fueron clasificadas como homofermentativas (TPV-038, TPV-039, TPV-376, TPV-071, TPV-170, TPV-171, TPV-193 y TPV-422), mientras que cinco no presentaron cambio de color del medio y fueron consideradas heterofermentativas (TPV-097, TPV-098, TPV-

159, TPV-391 y TPV-598). Las cepas homofermentativas corresponden a *L. jensenii, L. crispatus* y *L. acidophilus/gasseri*, destacando la cepa TPV-170 (*L. crispatus*) por presentar un cambio de color moderado (Figura 8H).

Tabla 8. Descripción de los resultados del cultivo de lactobacilos en agar diferencial para bacterias lácticas

Cepa	Especie	Cambio de color en Agar HHD	Tipo de fermentación
TPV-038	*L. jensenii*	+	Homofermentativo
TPV-039	*L. jensenii*	+	Homofermentativo
TPV-376	*L. crispatus*	+	Homofermentativo
TPV-071	*L. jensenii*	+	Homofermentativo
TPV-391	*L. crispatus*	+	Homofermentativo
TPV-097	*L. crispatus*	-	Heterofermentativo
TPV-098	*L. crispatus*	-	Heterofermentativo
TPV-422	*L. acidophilus/gasseri*	+	Homofermentativo
TPV-159	*L. crispatus*	-	Heterofermentativo
TPV-170	*L. crispatus*	++	Homofermentativo
TPV-171	*L. crispatus*	+	Homofermentativo
TPV-193	*L. crispatus*	+	Homofermentativo
TPV-598	*L. acidophilus/gasseri*	+	Homofermentativo
Control +	*L. rhamnosus* ATCC 53103	+++	Homofermentativo

(-) No hubo cambio de color; (+) Cambio de color bajo; (++) Cambio de color medio; (++) Cambio de color alto; (++++) Cambio de color muy alto.

4.3.5 Tolerancia a pH ácido

Los lactobacilos inoculados en caldo MRS ajustado a pH 3, 4, 5 y 6 mostraron un valor inicial promedio de 4,55 x 10^7 UFC/mL. En la tabla 9, a las 24 h de incubación, los lactobacilos conservaron su viabilidad a pH 5 y 6, sin embargo, a pH 4 las cepas TPV-422, TPV-159 y TPV-098 presentaron mayor número de colonias viables.

En la tabla 10, a 48 horas de incubación, todas las cepas conservaron viabilidad a pH 5 y 6. A pH 4 solo TPV-071 y TPV-159 mantuvieron viabilidad, mientras que TPV-422 presentó una disminución notable en comparación a 24 h. No obstante, ninguno de los lactobacilos creció a pH 3 en ambos tiempos evaluados.

Tabla 9. Tolerancia a pH ácido (4, 5 y 6) de los lactobacilos identificados después de 24 h de incubación

Códigos	0 h (UFC/mL)	24 h (UFC/mL)		
		pH 6	pH 5	pH 4
TPV-038	$1{,}40 \times 10^8 \pm 2{,}00 \times 10^7$	$1{,}87 \times 10^8 \pm 3{,}06 \times 10^{7\ ab}$	$1{,}87 \times 10^8 \pm 5{,}03 \times 10^{7\ ab}$	$0{,}00 \pm 0{,}00^{\ a}$
TPV-039	$4{,}67 \times 10^7 \pm 1{,}15 \times 10^7$	$1{,}67 \times 10^8 \pm 1{,}15 \times 10^{7\ ab}$	$3{,}20 \times 10^8 \pm 2{,}00 \times 10^{7\ bcd}$	$0{,}00 \pm 0{,}00^{\ a}$
TPV-376	$1{,}07 \times 10^7 \pm 5{,}03 \times 10^6$	$1{,}07 \times 10^8 \pm 6{,}11 \times 10^{7\ ab}$	$1{,}47 \times 10^8 \pm 6{,}11 \times 10^{7\ a}$	$4{,}67 \times 10^6 \pm 2{,}31 \times 10^{6\ ab}$
TPV-071	$1{,}07 \times 10^7 \pm 5{,}03 \times 10^6$	$1{,}80 \times 10^8 \pm 6{,}00 \times 10^{7\ ab}$	$3{,}60 \times 10^8 \pm 9{,}17 \times 10^{7\ cd}$	$3{,}33 \times 10^6 \pm 2{,}31 \times 10^{6\ ab}$
TPV-391	$2{,}67 \times 10^6 \pm 1{,}15 \times 10^6$	$3{,}33 \times 10^7 \pm 1{,}15 \times 10^{7\ a}$	$1{,}07 \times 10^8 \pm 5{,}03 \times 10^{7\ a}$	$2{,}00 \times 10^6 \pm 2{,}00 \times 10^{6\ ab}$
TPV-097	$8{,}67 \times 10^6 \pm 3{,}06 \times 10^6$	$2{,}27 \times 10^8 \pm 1{,}15 \times 10^{7\ bc}$	$1{,}20 \times 10^8 \pm 3{,}46 \times 10^{7\ a}$	$1{,}07 \times 10^7 \pm 5{,}77 \times 10^{6\ bc}$
TPV-098	$1{,}13 \times 10^7 \pm 5{,}03 \times 10^6$	$2{,}33 \times 10^8 \pm 6{,}43 \times 10^{7\ bc}$	$1{,}67 \times 10^8 \pm 6{,}11 \times 10^{7\ ab}$	$1{,}40 \times 10^7 \pm 6{,}00 \times 10^{6\ c}$
TPV-422	$1{,}00 \times 10^7 \pm 2{,}00 \times 10^6$	$3{,}33 \times 10^8 \pm 1{,}01 \times 10^{8\ c}$	$8{,}13 \times 10^8 \pm 1{,}14 \times 10^{8\ e}$	$4{,}73 \times 10^7 \pm 7{,}02 \times 10^{6\ e}$
TPV-159	$7{,}33 \times 10^6 \pm 4{,}16 \times 10^6$	$8{,}00 \times 10^7 \pm 5{,}29 \times 10^{7\ ab}$	$1{,}07 \times 10^8 \pm 4{,}62 \times 10^{7\ a}$	$2{,}67 \times 10^7 \pm 3{,}06 \times 10^{6\ d}$
TPV-170	$5{,}33 \times 10^7 \pm 2{,}31 \times 10^7$	$1{,}40 \times 10^8 \pm 8{,}72 \times 10^{7\ ab}$	$2{,}47 \times 10^8 \pm 3{,}06 \times 10^{7\ abc}$	$0{,}00 \pm 0{,}00^{\ a}$
TPV-171	$6{,}67 \times 10^8 \pm 1{,}15 \times 10^7$	$1{,}53 \times 10^8 \pm 3{,}06 \times 10^{7\ ab}$	$1{,}67 \times 10^8 \pm 4{,}16 \times 10^{7\ ab}$	$2{,}67 \times 10^6 \pm 2{,}31 \times 10^{6\ ab}$
TPV-193	$7{,}33 \times 10^8 \pm 1{,}15 \times 10^7$	$1{,}73 \times 10^8 \pm 5{,}03 \times 10^{7\ ab}$	$4{,}60 \times 10^8 \pm 8{,}00 \times 10^{7\ d}$	$0{,}00 \pm 0{,}00^{\ a}$
TPV-598	$2{,}40 \times 10^8 \pm 2{,}00 \times 10^7$	$1{,}67 \times 10^8 \pm 4{,}16 \times 10^{7\ ab}$	$2{,}13 \times 10^8 \pm 1{,}15 \times 10^{7\ abc}$	$0{,}00 \pm 0{,}00^{\ a}$
Control +	$1{,}13 \times 10^8 \pm 6{,}11 \times 10^7$	$4{,}93 \times 10^8 \pm 1{,}10 \times 10^8$	$3{,}13 \times 10^8 \pm 4{,}16 \times 10^7$	$4{,}20 \times 10^8 \pm 6{,}93 \times 10^7$

Nota: Los valores se expresan como media ± desviación estándar (UFC/mL). Letras superíndices diferentes dentro de una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre las cepas para el mismo pH ($p < 0{,}05$); valores que comparten al menos una letra no presentan diferencias significativas.

Tabla 10. Tolerancia a pH ácido (4, 5 y 6) de los lactobacilos identificados después de 48 h de incubación.

Códigos	0 h (UFC/mL)	48 h (UFC/mL)		
		pH 6	pH 5	pH 4
TPV-038	$1{,}40 \times 10^8 \pm 2{,}00 \times 10^7$	$1{,}53 \times 10^8 \pm 4{,}16 \times 10^7$ [abc]	$2{,}73 \times 10^8 \pm 7{,}57 \times 10^7$ [b]	$0{,}00 \pm 0{,}00$ [a]
TPV-039	$4{,}67 \times 10^7 \pm 1{,}15 \times 10^7$	$9{,}33 \times 10^7 \pm 1{,}15 \times 10^7$ [ab]	$1{,}40 \times 10^8 \pm 2{,}00 \times 10^7$ [a]	$0{,}00 \pm 0{,}00$ [a]
TPV-376	$1{,}07 \times 10^7 \pm 5{,}03 \times 10^6$	$1{,}27 \times 10^8 \pm 3{,}06 \times 10^7$ [ab]	$6{,}67 \times 10^7 \pm 2{,}31 \times 10^7$ [a]	$1{,}33 \times 10^6 \pm 2{,}31 \times 10^6$ [ab]
TPV-071	$1{,}07 \times 10^7 \pm 5{,}03 \times 10^6$	$2{,}07 \times 10^8 \pm 4{,}62 \times 10^7$ [bc]	$8{,}00 \times 10^7 \pm 0 \times 10^7$ [a]	$1{,}87 \times 10^7 \pm 1{,}15 \times 10^6$ [c]
TPV-391	$2{,}67 \times 10^6 \pm 1{,}15 \times 10^6$	$1{,}07 \times 10^8 \pm 1{,}15 \times 10^7$ [ab]	$4{,}67 \times 10^7 \pm 1{,}15 \times 10^7$ [a]	$4{,}00 \times 10^6 \pm 2{,}00 \times 10^6$ [b]
TPV-097	$8{,}67 \times 10^6 \pm 3{,}06 \times 10^6$	$1{,}20 \times 10^8 \pm 2{,}00 \times 10^7$ [ab]	$3{,}33 \times 10^7 \pm 1{,}15 \times 10^7$ [a]	$0{,}00 \pm 0{,}00$ [a]
TPV-098	$1{,}13 \times 10^7 \pm 5{,}03 \times 10^6$	$4{,}67 \times 10^7 \pm 2{,}31 \times 10^7$ [a]	$5{,}33 \times 10^7 \pm 3{,}06 \times 10^7$ [a]	$0{,}00 \pm 0{,}00$ [a]
TPV-422	$1{,}00 \times 10^7 \pm 2{,}00 \times 10^6$	$6{,}60 \times 10^8 \pm 8{,}00 \times 10^7$ [e]	$5{,}87 \times 10^8 \pm 3{,}06 \times 10^7$ [c]	$2{,}67 \times 10^6 \pm 1{,}15 \times 10^6$ [ab]
TPV-159	$7{,}33 \times 10^6 \pm 4{,}16 \times 10^6$	$8{,}67 \times 10^7 \pm 2{,}31 \times 10^7$ [ab]	$9{,}33 \times 10^7 \pm 6{,}43 \times 10^7$ [a]	$2{,}33 \times 10^7 \pm 3{,}06 \times 10^6$ [d]
TPV-170	$5{,}33 \times 10^7 \pm 2{,}31 \times 10^7$	$8{,}20 \times 10^7 \pm 8{,}91 \times 10^7$ [ab]	$1{,}27 \times 10^8 \pm 1{,}15 \times 10^7$ [a]	$0{,}00 \pm 0{,}00$ [a]
TPV-171	$6{,}67 \times 10^8 \pm 1{,}15 \times 10^7$	$3{,}33 \times 10^7 \pm 2{,}31 \times 10^7$ [a]	$3{,}33 \times 10^7 \pm 1{,}15 \times 10^7$ [a]	$0{,}00 \pm 0{,}00$ [a]
TPV-193	$7{,}33 \times 10^8 \pm 1{,}15 \times 10^7$	$4{,}40 \times 10^8 \pm 1{,}11 \times 10^8$ [d]	$8{,}67 \times 10^7 \pm 3{,}06 \times 10^7$ [a]	$0{,}00 \pm 0{,}00$ [a]
TPV-598	$2{,}40 \times 10^8 \pm 2{,}00 \times 10^7$	$2{,}67 \times 10^8 \pm 5{,}03 \times 10^7$ [c]	$5{,}60 \times 10^8 \pm 9{,}17 \times 10^7$ [c]	$0{,}00 \pm 0{,}00$ [a]
Control +	$1{,}13 \times 10^8 \pm 6{,}11 \times 10^7$	$3{,}00 \times 10^8 \pm 5{,}29 \times 10^7$	$3{,}47 \times 10^8 \pm 4{,}62 \times 10^7$	$2{,}80 \times 10^8 \pm 5{,}29 \times 10^7$

Nota: Los valores se expresan como media ± desviación estándar (UFC/mL). Letras superíndices diferentes dentro de una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre las cepas para el mismo pH ($p < 0{,}05$); valores que comparten al menos una letra no presentan diferencias significativas.

4.3.6 Capacidad de auto-agregación y co-agregación

En la tabla 11, se observa diferencias entre las cepas a las 4 y 24 horas ($p < 0,001$ en ambos tiempos). A las 4 horas, las cepas TPV-097 y TPV-171 presentaron los mayores porcentajes de auto-agregación. Después de 24 horas de incubación, TPV-097 y TPV-171 continuaron siendo las cepas con mayor auto-agregación ambas correspondientes a *L. crispatus*.

Tabla 11. Auto-agregación de lactobacilos identificados

Cepa	Especie	% de auto-agregación	
		t=4h	t=24h
TPV-038	*L. jensenii*	$17,18 \pm 1,39^{cdef}$	$35,59 \pm 0,90^{c}$
TPV-039	*L. jensenii*	$11,30 \pm 1,90^{ab}$	$29,03 \pm 0,88^{a}$
TPV-376	*L. crispatus*	$14,36 \pm 3,03^{bcde}$	$47,46 \pm 1,98^{e}$
TPV-071	*L. jensenii*	$12,74 \pm 1,36^{abc}$	$41,26 \pm 1,40^{d}$
TPV-391	*L. crispatus*	$18,39 \pm 2,53^{def}$	$54,16 \pm 0,48^{f}$
TPV-097	*L. crispatus*	$20,59 \pm 0,70^{f}$	$56,79 \pm 1,27^{f}$
TPV-098	*L. crispatus*	$19,39 \pm 1,02^{ef}$	$55,10 \pm 0,00^{f}$
TPV-422	*L. acidophilus/gasseri*	$9,91 \pm 1,18^{ab}$	$30,17 \pm 0,63^{ab}$
TPV-159	*L. crispatus*	$19,89 \pm 2,66^{f}$	$48,97 \pm 3,34^{e}$
TPV-170	*L. crispatus*	$13,78 \pm 0,77^{abcd}$	$32,90 \pm 0,77^{bc}$
TPV-171	*L. crispatus*	$20,74 \pm 3,74^{f}$	$56,86 \pm 0,63^{f}$
TPV-193	*L. crispatus*	$11,72 \pm 1,10^{ab}$	$31,25 \pm 1,14^{ab}$
TPV-598	*L. acidophilus/gasseri*	$8,42 \pm 1,66^{a}$	$34,87 \pm 0,37^{c}$
Control +	*L. rhamnosus* ATCC 53103	$13,32 \pm 1,68$	$55,65 \pm 0,66$

Nota: Los valores se expresan como media ± desviación estándar. Letras superíndices diferentes indican diferencias significativas según Tukey ($p < 0,05$), posterior al ANOVA. Las comparaciones se realizaron por tiempo de incubación. El control positivo se utilizó como referencia y no se incluyó en el análisis estadístico.

En la Tabla 12, respecto a la co-agregación frente a *E. coli* ATCC 25922, se observaron valores negativos en la mayoría de las cepas a las 4 y 24 h, lo que indica que la absorbancia de la mezcla fue mayor a la del tiempo inicial, probablemente por crecimiento activo de *E. coli* durante la incubación. Las cepas TPV-159 y TPV-171 presentaron valores positivos a las 4 h.

Tabla 12. Co-agregación de lactobacilos contra *E. coli* ATCC 25922

Cepa	**Especie**	**% de co-agregación**	
		t=4h	**t=24h**
TPV-038	*L. jensenii*	-6,49 ± 1,19^{a}	-20,52 ± 2,27^{d}
TPV-039	*L. jensenii*	-9,47 ± 0,71^{a}	-27,57 ± 1,43^{bc}
TPV-376	*L. crispatus*	-9,64 ± 3,22^{a}	-21,77 ± 3,96^{cd}
TPV-071	*L. jensenii*	-3,33 ± 1,12^{ab}	-13,02 ± 2,90^{e}
TPV-391	*L. crispatus*	-7,10 ± 2,27^{a}	-29,96 ± 0,40^{bc}
TPV-097	*L. crispatus*	-1,09 ± 1,90^{ab}	-3,28 ± 1,89^{f}
TPV-098	*L. crispatus*	-2,61 ± 1,72^{ab}	-3,74 ± 1,73^{f}
TPV-422	*L. acidophilus/gasseri*	-8,34 ± 1,29^{a}	-27,79 ± 0,99^{bc}
TPV-159	*L. crispatus*	4,15 ± 1,32^{ab}	-13,21 ± 0,74^{de}
TPV-170	*L. crispatus*	-6,91 ± 3,07^{a}	-32,11 ± 1,41^{b}
TPV-171	*L. crispatus*	2,32 ± 1,15^{b}	-19,60 ±0,69^{d}
TPV-193	*L. crispatus*	-6,02 ± 0,70^{a}	-30,08 ± 0,57^{bc}
TPV-598	*L. acidophilus/gasseri*	-6,15 ± 1,16^{a}	-45,31 ± 3,04^{a}
Control +	*L. rhamnosus* ATCC 53103	1,63 ± 0,57	5,23 ± 1,13
Control -	*E. coli* ATCC 25922	-3,82 ± 0,66	-17,17 ± 1,05

Nota: Los valores se expresan como media ± desviación estándar. Letras superíndices diferentes indican diferencias significativas según Tukey ($p < 0,05$), posterior al ANOVA. Las comparaciones se realizaron por tiempo de incubación. Los controles se utilizaron como referencia y no se incluyeron en el análisis estadístico.

En la Tabla 13, respecto a la co-agregación frente a *S. agalactiae* ATCC 12386, los lactobacilos presentaron un incremento progresivo de la co-agregación entre las 4 y 24 h. A las 4 h, los porcentajes fueron bajos y sin diferencias estadísticamente significativas entre cepas (ANOVA p = 0,448). A las 24 horas, las cepas TPV-391, TPV-171 y TPV-097 observándose diferencias significativas entre cepas (Kruskal-Wallis p = 0,004).

Tabla 13. Co-agregación de lactobacilos contra *S. agalactiae* ATCC 12386

Cepa	**Especie**	**% de co-agregación**	
		t=4h	**t=24h**
TPV-038	*L. jensenii*	3,60 ± 3,21	30,83 ± 3,11
TPV-039	*L. jensenii*	3,65 ± 2,09	21,88 ± 5,67
TPV-376	*L. crispatus*	2,50 ± 2,50	37,08 ± 0,72
TPV-071	*L. jensenii*	3,05 ± 1,73	33,57 ± 6,19
TPV-391	*L. crispatus*	3,11 ± 2,09	45,49 ± 6,04
TPV-097	*L. crispatus*	1,89 ± 0,67	42,47 ± 0,77
TPV-098	*L. crispatus*	4,46 ± 1,11	39,41 ± 0,56
TPV-422	*L. acidophilus/gasseri*	5,54 ± 4,13	27,23 ± 0,53
TPV-159	*L. crispatus*	4,21 ± 3,83	34,87 ± 10,00
TPV-170	*L. crispatus*	4,26 ± 4,04	29,73 ± 0,73
TPV-171	*L. crispatus*	4,80 ± 3,77	43,57 ± 1,93
TPV-193	*L. crispatus*	0,40 ± 2,83	29,91 ± 1,67
TPV-598	*L. acidophilus/gasseri*	5,68 ± 3,62	29,11 ± 3,06
Control +	*L. rhamnosus* ATCC 53103	4,92 ± 2,36	47,84 ± 1,49
Control -	*S. agalactiae* ATCC 12386	-18,00 ± 3,29	16,11 ± 1,80

En la Tabla 14, respecto a la co-agregación frente a *G. vaginalis* ATCC 49145, a las 4 horas, TPV-159 y TPV-376 presentaron los mayores valores. A las 24 horas, TPV-098 y TPV-376 fueron las cepas con mayor co-agregación. Las diferencias entre cepas a las 24 horas fueron estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis p = 0,045).

Tabla 14. Co-agregación de lactobacilos contra *G. vaginalis* ATCC 49145

Cepa	**Especie**	**% de co-agregación**	
		t=4h	**t=24h**
TPV-038	*L. jensenii*	4,25 ± 1,98	24,15 ± 0,18
TPV-039	*L. jensenii*	4,45 ± 0,69	24,71 ± 1,09
TPV-376	*L. crispatus*	10,33 ± 0,82	42,39 ± 1,93
TPV-071	*L. jensenii*	6,70 ± 4,28	29,00 ± 2,40
TPV-391	*L. crispatus*	4,86 ± 2,54	38,44 ± 1,29
TPV-097	*L. crispatus*	9,74 ± 2,06	36,44 ± 1,76
TPV-098	*L. crispatus*	6,85 ± 1,02	44,62 ± 0,54
TPV-422	*L. acidophilus/gasseri*	3,63 ± 3,18	28,90 ± 1,50
TPV-159	*L. crispatus*	10,99 ± 7,10	39,53 ± 4,62
TPV-170	*L. crispatus*	0,68 ± 4,58	26,63 ± 2,71
TPV-171	*L. crispatus*	0,31 ± 2,70	36,21 ± 1,48
TPV-193	*L. crispatus*	3,68 ± 1,25	24,49 ± 0,17
TPV-598	*L. acidophilus/gasseri*	7,00 ± 5,11	35,51 ± 3,02
Control +	*L. rhamnosus* ATCC 53103	6,22 ± 3,91	42,33 ± 1,06
Control -	*G. vaginalis ATCC 49145*	-12,46 ± 14,11	14,95 ± 8,88

En la Tabla 15, respecto a la co-agregación frente a *C. albicans* ATCC 10231, a las 4 horas, TPV-098 presentó el mayor porcentaje. A las 24 horas, TPV-098 y TPV-159 presentaron los valores más elevados, siendo estadísticamente diferentes (ANOVA p = 0,004; Kruskal-Wallis p = 0,008).

Tabla 15. Co-agregación de lactobacilos contra *C. albicans* ATCC 10231

Cepa	**Especie**	**% de co-agregación**	
		t=2h	**t=24h**
TPV-038	*L. jensenii*	17,77 ± 0,96	32,08 ± 10,64^{abc}
TPV-039	*L. jensenii*	5,42 ± 6,74	38,16 ± 1,57^{abc}
TPV-376	*L. crispatus*	14,39 ± 6,57	39,68 ± 5,07^{bc}
TPV-071	*L. jensenii*	10,47 ± 6,34	39,78 ± 9,63^{ab}
TPV-391	*L. crispatus*	3,67 ± 1,71	37,73 ± 0,08^{abc}
TPV-097	*L. crispatus*	14,70 ± 1,25	32,27 ± 8,63^{abc}
TPV-098	*L. crispatus*	29,82 ± 0,56	42,55 ± 0,27^{c}
TPV-422	*L. acidophilus/gasseri*	14,74 ± 1,86	27,30 ± 10,98^{abc}
TPV-159	*L. crispatus*	21,72 ± 1,29	41,37 ± 2,58^{abc}
TPV-170	*L. crispatus*	13,23 ± 1,79	13,51 ± 9,38^{a}
TPV-171	*L. crispatus*	6,74 ± 2,97	38,95 ± 4,25^{abc}
TPV-193	*L. crispatus*	14,83 ± 1,92	23,67 ± 7,77^{abc}
TPV-598	*L. acidophilus/gasseri*	11,31 ± 1,66	9,38 ± 6,98^{abc}
Control +	*L. rhamnosus* ATCC 53103	21,16 ± 3,44	44,09 ± 2,92
Control -	*C. albicans* ATCC 10231	30,06 ± 2,50	44,73 ± 3,13

Nota: Los valores se expresan como media ± desviación estándar. Letras superíndices diferentes indican diferencias significativas según Tukey ($p < 0,05$), posterior al ANOVA. Las comparaciones se realizaron por tiempo de incubación. Los controles se utilizaron como referencia y no se incluyeron en el análisis estadístico.

4.4 Evaluación la actividad antimicrobiana de lactobacilos aislados

4.4.1. Actividad antibacteriana

En la Tabla 16, se observa diferencias significativas contra los tres patógenos ($p < 0,001$). Frente a *E. coli* ATCC 25922, las cepas TPV-376 y TPV-071 presentaron los mayores halos de inhibición en comparación con el resto de los aislados. Frente a *S. agalactiae*, las cepas TPV-159 y TPV-193 mostraron la mayor inhibición. Respecto a *G. vaginalis*, TPV-071 presentó la mayor inhibición.

Tabla 16. Actividad antibacteriana de lactobacilos identificados

Cepa	Especies de lactobacilos evaluados	Diámetro de halos de inhibición (mm)		
		E. coli	***S. agalactiae***	***G. vaginalis***
TPV-038	*L. jensenii*	8,33 ± 0,58 ^{abc}	7,33 ± 0,58 ^{ab}	7,67 ± 0,58 ^{abcd}
TPV-039	*L. jensenii*	9,33 ± 0,58 ^{bc}	6,67 ± 0,58 ^{a}	7,67 ± 0,58 ^{abcd}
TPV-376	*L. crispatus*	9,67 ± 0,58 ^{c}	8,67 ± 0,58 ^{bc}	8,33 ± 0,58 ^{bcd}
TPV-071	*L. jensenii*	9,67 ± 0,58 ^{c}	8,33 ± 0,58 ^{bc}	9,33 ± 0,58 ^{d}
TPV-391	*L. crispatus*	7,67 ± 0,58 ^{ab}	8,33 ± 0,58 ^{bc}	7,33 ± 0,58 ^{abc}
TPV-097	*L. crispatus*	8,00 ± 1,00 ^{abc}	9,33 ± 0,58 ^{c}	8,67 ± 0,58 ^{cd}
TPV-098	*L. crispatus*	7,33 ± 0,58 ^{a}	9,33 ± 0,58 ^{c}	9,00 ± 1,00 ^{cd}
TPV-422	*L. acidophilus/gasseri*	8,67 ± 0,58 ^{abc}	8,67 ± 0,58 ^{bc}	6,33 ± 0,58 ^{a}
TPV-159	*L. crispatus*	9,33 ± 0,58 ^{bc}	9,67 ± 0,58 ^{c}	7,33 ± 0,58 ^{abc}
TPV-170	*L. crispatus*	7,67 ± 0,58 ^{ab}	8,67 ± 0,58 ^{bc}	6,33 ± 0,58 ^{a}
TPV-171	*L. crispatus*	9,33 ± 0,58 ^{c}	8,33 ± 0,58 ^{bc}	6,67 ± 0,58 ^{ab}
TPV-193	*L. crispatus*	9,00 ± 1,00 ^{abc}	9,67 ± 0,58 ^{c}	6,67 ± 0,58 ^{ab}
TPV-598	*L. acidophilus/gasseri*	7,33 ± 0,58 ^{a}	6,33 ± 0,58 ^{a}	6,67 ± 0,58 ^{ab}
L. rhamnosus ATCC 53103		12,00 ± 1,00	12,33 ± 0,58	12,67 ± 0,58

Nota: Los valores se expresan como media ± desviación estándar. Letras superíndices diferentes indican diferencias significativas según Tukey ($p < 0,05$), posterior al ANOVA. Las comparaciones se realizaron por tiempo de incubación. El control positivo se utilizó como referencia y no se incluyó en el análisis estadístico.

4.4.2. Actividad antifúngica

En la Tabla 17, se observa diferencias significativas ($p < 0,001$) de los lactobacilos frente a *C. albicans*. Las cepas TPV-376 y TPV-071 presentaron los menores recuentos de colonias indicando la mayor actividad antifúngica. La cepa TPV-193 presentó el mayor recuento de colonias de *C. albicans*.

Tabla 17. Actividad antifúngica de lactobacilos identificados

Cepa	Especie	*Candida albicans* ATCC 10231 (UFC/mL)
TPV-038	*L. jensenii*	$1.07 \times 10^7 \pm 2,31 \times 10^6$ cde
TPV-039	*L. jensenii*	$5,33 \times 10^6 \pm 2,31 \times 10^6$ abc
TPV-376	*L. crispatus*	$6,67 \times 10^5 \pm 1,15 \times 10^6$ a
TPV-071	*L. jensenii*	$1,33 \times 10^6 \pm 1,15 \times 10^6$ ab
TPV-391	*L. crispatus*	$1,47 \times 10^7 \pm 3,06 \times 10^6$ ef
TPV-097	*L. crispatus*	$7,33 \times 10^6 \pm 1,15 \times 10^6$ bcd
TPV-098	*L. crispatus*	$5,33 \times 10^6 \pm 3,06 \times 10^6$ abc
TPV-422	*L. acidophilus/gasseri*	$1,80 \times 10^7 \pm 2,00 \times 10^6$ fg
TPV-159	*L. crispatus*	$2,67 \times 10^6 \pm 1,15 \times 10^6$ ab
TPV-170	*L. crispatus*	$6,67 \times 10^6 \pm 3,06 \times 10^6$ abcd
TPV-171	*L. crispatus*	$1,27 \times 10^7 \pm 3,06 \times 10^6$ def
TPV-193	*L. crispatus*	$2,53 \times 10^7 \pm 2,31 \times 10^6$ h
TPV-598	*L. acidophilus/gasseri*	$2,33 \times 10^7 \pm 3,06 \times 10^6$ gh
Control +	*L. rhamnosus* ATCC 53103	$8,67 \times 10^6 \pm 1,07 \times 10^6$

Nota: Los valores se expresan como media ± desviación estándar. Letras superíndices diferentes indican diferencias significativas según Tukey ($p < 0,05$), posterior al ANOVA. Las comparaciones se realizaron por tiempo de incubación. El control positivo se utilizó como referencia y no se incluyó en el análisis estadístico.

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

La microbiota vaginal puede clasificarse en estados comunitarios (Community State Types, CST), los cuales se caracterizan generalmente por la dominancia de diferentes especies de *Lactobacillus*. En el presente estudio, a partir de 569 colonias aisladas de muestras vaginales de mujeres sanas residentes en la ciudad de Arequipa, se identificó que las especies predominantes fueron *L. crispatus*, *L. acidophilus/gasseri*, *L. jensenii*, *Lactobacillus* sp., *L. reuteri* y *L. rhamnosus*. Estos resultados coinciden parcialmente con lo reportado en otros países de Sudamérica. En Argentina y Brasil se ha reportado la presencia de *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. crispatus*, *L. rhamnosus*, *L. casei* subsp. *casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum* y *L. reuteri* (70,71). No obstante, en Perú, los estudios sobre microbiota vaginal en mujeres sanas aún son limitados. Un estudio realizado en la ciudad de Jaén (Cajamarca) reportó únicamente la presencia de *Lactobacillus* spp. (18). De manera similar, en la región La Libertad se logró aislar e identificar únicamente *Lactobacillus* sp. en hisopados vaginales de mujeres. En este contexto, los resultados obtenidos sugieren que *L. crispatus* constituye la especie predominante en la microbiota vaginal de mujeres sanas de la ciudad de Arequipa.

El 98.79% de los lactobacilos evaluados en el presente estudio no presentaron actividad catalasa. Estos resultados coinciden con lo reportado por Štšepetova et al. (72), quienes también observaron baja frecuencia de actividad catalasa en lactobacilos vaginales. Se ha descrito que algunas bacterias ácido-lácticas pueden expresar una catalasa no hemo dependiente de manganeso, lo que podría explicar los casos positivos observados y conferir mayor resistencia al estrés oxidativo (73). Con relación a la actividad hemolítica, el 99.19% de los lactobacilos dio negativo, mientras que solo el 0.81% mostró hemólisis. Estos resultados coinciden parcialmente con lo reportado en un estudio realizado en Argelia, donde el 75% de los lactobacilos (33/44) mostró hemólisis (74). La ausencia de hemólisis es un criterio importante en la seguridad de cepas probióticas, dado que esta actividad se asocia a factores de virulencia bacteriana (75).

En cuanto a la actividad gelatinasa, solo el 3.23% de los lactobacilos evaluados presentó actividad. En la literatura revisada no se encontraron estudios que evalúen esta actividad en lactobacilos vaginales, aunque fue descrita en aislamientos de otras fuentes como alimentos. La actividad gelatinasa puede estar asociada con mecanismos de degradación de proteínas que podrían representar riesgos potenciales para la salud del huésped (76).

Respecto a la susceptibilidad a antibióticos, solo 13 de los 235 lactobacilos no presentaron resistencia a ninguno de los siete antibióticos evaluados. La resistencia a ciprofloxacino

fue la más prevalente (91,49 %) y se observaron diferencias significativas entre especies en seis de los siete antibióticos ($p < 0,05$), siendo más notorias en vancomicina y ciprofloxacino. Estos resultados difieren parcialmente de lo descrito en el CLSI M45, que señala a *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii*, entre otras especies, como susceptibles a vancomicina, mientras que reconoce resistencia intrínseca en otras especies de Lactobacillus (61). No obstante, Štšepetova et al. (71) y Ouarabi et al. (73) reportaron resistencia a vancomicina y cloranfenicol en lactobacilos vaginales de otros países. La resistencia a ciprofloxacino observada en *L. crispatus* (77,87 %) coincide con lo reportado por Pino et al., quienes también describieron resistencia a norfloxacino, otra quinolona (13). Estas diferencias entre estudios podrían relacionarse con las especies y cepas evaluadas, las características de las poblaciones estudiadas y los métodos utilizados para determinar la susceptibilidad. Sin embargo, los resultados obtenidos para vancomicina en el presente estudio deben interpretarse considerando las limitaciones del método usado, debido a que en el presente estudio se utilizó difusión en disco, mientras que los criterios interpretativos establecidos para *Lactobacillus* spp. en el CLSI M45 se basan en la determinación de la concentración mínima inhibitoria. Por lo tanto, la clasificación obtenida mediante difusión en disco requiere confirmación mediante un método basado en MIC (61).

Respecto a la susceptibilidad a antibióticos, solo 13 de los 235 lactobacilos no presentaron resistencia a ninguno de los siete antibióticos evaluados. La resistencia a ciprofloxacino fue la más prevalente (91,49%), y se observaron diferencias significativas entre especies en seis de los siete antibióticos ($p < 0,05$), siendo más notorias en vancomicina y ciprofloxacino. Estos resultados difieren parcialmente de los criterios del CLSI, que señala a *L. crispatus*, *L. gasseri* y *L. jensenii* como naturalmente sensibles a vancomicina (62). No obstante, Štšepetova et al. (72) y Ouarabi et al. (74), reportaron resistencia adquirida a vancomicina y cloranfenicol en lactobacilos vaginales de otros países. La resistencia a ciprofloxacino observada en *L. crispatus* (77,87%) coincide con lo reportado por Pino et al., quienes también describieron resistencia a norfloxacino, otra quinolona (13). Estas diferencias entre estudios podrían explicarse por variaciones geográficas, características de las poblaciones analizadas o la presencia de mecanismos de resistencia adquirida en determinadas cepas (77). Cabe mencionar, que el CLSI no recomienda evaluar la resistencia a vancomicina mediante discos de difusión (62).

Con relación a la evaluación cualitativa de ácidos orgánicos mediante la capacidad de acidificación del caldo MRS, las cepas TPV-376, TPV-071, TPV-097 y TPV-098, presentaron los valores de pH más bajos. Esto se relaciona con lo reportado en lactobacilos aislados de mujeres italianas (*L. crispatus, L. gasseri* y *L. vaginalis*), los cuales después de una incubación a 24 h, el pH estuvo en un rango de 3,7 – 4,7 (11). Otro estudio donde evaluaron lactobacilos aislados de mujeres de la India (*L. crispatus, L.gasseri, L.jensenii, L.vaginalis, L.mucosae, L.reuteri, L.fermentum, L. oris* y *L.delbrueckii*) reportaron que el pH del sobrenadante después de 5 h de incubación estaba entre el rango de 2,8 a 3,8 (78). La producción de ácido láctico de los lactobacilos favorece la acidificación del entorno vaginal, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis e inhibiendo el crecimiento de microorganismos patógenos mediante la disminución del pH y el efecto antimicrobiano del ácido láctico en su forma protonada (37,39,79). De similar forma, los resultados del cultivo de lactobacilos en MRS suplementado con púrpura de bromocresol y MRS con carbonato de calcio, mostró leve acidificación de los medios de cultivo en comparación con la cepa control *L. rhamnosus* ATCC 53103. En este sentido, la capacidad de algunas cepas aisladas en este estudio para reducir el pH del medio podría representar una característica relevante asociada a su potencial probiótico.

Con relación al tipo de fermentación, ocho de las trece cepas evaluadas fueron clasificadas como homofermentativas (*L. jensenii, L. crispatus* y *L. acidophilus/gasseri*), mientras que cinco fueron clasificadas como heterofermentativas (*L. crispatus*). Estos resultados son consistentes con la diversidad metabólica del género Lactobacillus, en el que la fermentación de carbohidratos puede llevarse a cabo mediante la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (homofermentativa) o la vía de la fosfocetolasa (heterofermentativa). Las cepas homofermentativas generan principalmente ácido láctico, lo que favorece una mayor acidificación del medio y contribuye al mantenimiento de un pH vaginal bajo (39,42,80).

La tolerancia a pH ácido mostró que los lactobacilos evaluados no sobrevivieron a pH 3; sin embargo, tres cepas (TPV-071, TPV-422 y TPV-159) presentaron la mayor tolerancia a pH 4. Estos resultados difieren con lo reportado por Kim et al. (81), donde cepas de *L. gasseri* aislados de mujeres de Corea del Sur mostraron 92,2% de tolerancia a pH 2,5. Otro estudio donde evaluaron lactobacilos aislados de mujeres italianas, evaluaron la tolerancia a pH 3 y 2 durante 2 y 4h, reportaron que de las 226 cepas se observó tasas de supervivencia ≥80% en ambas condiciones de pH (13). Las diferencias observadas

podrían explicarse por la variabilidad fenotípica de las cepas de *Lactobacillus*, el origen geográfico de las cepas, diferencias en el pH y tiempo evaluado en los diferentes estudios. La capacidad de autoagregación de los lactobacilos evaluados aumentó con el tiempo de incubación. Las cepas TPV-097 y TPV-171 (*L. crispatus*), presentaron los mayores porcentajes de autoagregación. Esto coincide con lo reportado en cepas de *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L. gasseri* y *L. johnsonii*, que mostraron porcentajes de auto-agregacion superiores al 70 % (70,78). Si bien la auto-agregación es la capacidad de las células bacterianas de adherirse entre sí y formar agregados celulares, lo cual puede favorecer la colonización de superficies epiteliales y la formación de biopelículas protectoras en el huésped, sin embargo, hay reportes de que en lactobacilos constituye una característica fenotípica altamente específica de cada cepa, en lugar de cada especie (82).

La capacidad de coagregación de los lactobacilos evaluados mostró porcentajes inferiores al control *L. rhamnosus* ATCC 53103 frente a *E. coli*, mientras que frente a *S. agalactiae*, *G. vaginalis* y *C. albicans* los valores observados fueron superiores. Los resultados obtenidos frente a *E. coli* coinciden con lo mencionado por Ekmekci et al. (83), quienes reportaron que cepas *L. crispatus*, *L. vaginalis* y *L. jensenii* presentaron valores relativamente bajos de co-agregación. Lo cual pudo estar influenciado por factores ambientales como el pH y la temperatura, así como por las propiedades fisicoquímicas de la superficie celular bacteriana (proteínas de superficie, ácidos lipoteicoicos y carbohidratos) que participan en la adhesión y agregación entre lactobacilos y patógenos. En contraste, los lactobacilos evaluados mostraron mayor capacidad de coagregación frente a patógenos urogenitales como *S. agalactiae* y *G. vaginalis*. García-Cayuela et al. (84) y Piwat et al. (85) reportaron que las cepas de *Lactobacillus* presentan capacidad de coagregación frente a bacterias patógenas del tracto urogenital, lo que favorece su exclusión del nicho ecológico mediante mecanismos de interacción celular. Ademas, se ha observado que cepas con mayor autoagregación tienden también a mostrar mayor coagregación (84). En este sentido, Scillato et al. (86) reportó que cepas de *L. gasseri, L. fermentum* y *L. crispatus* presentaban porcentajes de coagregación incluso superiores a sus valores de autoagregación, lo que sugiere que este fenómeno favorece la adaptabilidad bacteriana y persistencia en ambientes mucosos.

Los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana mostraron que las cepas *L. crispatus* (TPV-376) y *L. jensenii* (TPV-071) presentaron mayor actividad inhibitoria frente a *E. coli, G. vaginalis* y *S. agalactiae*. Estos resultados coinciden con lo reportado en estudios realizados con lactobacilos vaginales aislados de mujeres sanas donde cepas

de *L. gasseri*, *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. helveticus* y *L. salivarius* mostraron actividad inhibitoria frente a patógenos urogenitales como *G. vaginalis*, *E. coli*, *S. agalactiae*, *S. aureus*, *Prevotella bivia*, *E. faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacteroides* spp., *Fannyhessea vaginae* y *Fusobacterium necrophorum* (12,77,81,87,88). Sin embargo, otro estudio reportó una mayor actividad inhibitoria en cepas de *L. helveticus*, *L. rhamnosus* y *L. salivarius* en comparación con *L. crispatus* y *L. gasseri*, lo que evidencia que esta característica varía entre cepas y poblaciones estudiadas (13). La actividad antibacteriana de los lactobacilos vaginales se relaciona con la producción de ácido láctico, bacteriocinas y peróxido de hidrógeno que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos (78).

Los resultados obtenidos de la actividad antifúngica mostraron que las cepas *L. crispatus* (TPV-376) y *L. jensenii* (TPV-071) presentaron mayor inhibición frente a *C. albicans*. Esto coincide con los estudios realizados en mujeres de diferentes países, donde cepas de *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* y *L. vaginalis* presentaron actividad antifúngica frente a *C. albicans*, aunque con diferente nivel de inhibición frente a otras especies de *Candida* (11,77,81). Asimismo, la actividad antifúngica se relaciona con la producción de ácido láctico y peróxido de hidrógeno. Se ha descrito que *L. crispatus* interfiere con los mecanismos de virulencia de *C. albicans* mediante la modulación de la expresión de genes relacionados con la adhesión, la formación de hifas y biopelículas, reduciendo la capacidad de colonización y proliferación del hongo (78,89).

Entre las limitaciones del estudio, no se incluyó una metodología molecular complementaria a la identificación mediante MALDI-TOF MS; por ello, estudios posteriores podrían incorporar la secuenciación del gen 16S rRNA para complementar la identificación de los lactobacilos. Asimismo, la susceptibilidad a los antibióticos se evaluó mediante difusión en disco, utilizando criterios previamente reportados para bacterias ácido-lácticas. Considerando que el CLSI M45 establece para *Lactobacillus* spp. criterios basados en la concentración mínima inhibitoria (MIC), su determinación en estudios posteriores permitiría complementar la evaluación de la susceptibilidad frente a vancomicina.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

Se aislaron e identificaron 248 cepas del género *Lactobacillus*. La especie predominante fue *L. crispatus* (81,05%), seguida por *L. acidophilus/gasseri* (8,47%), *Lactobacillus* sp. (4,03%), *L. jensenii* (4,84%), *L. reuteri* (0,81%) y *L. rhamnosus* (0,81%).

La evaluación de la seguridad mostró que el 98.79% de los lactobacilos no presentó actividad catalasa, el 99,19% no mostró hemólisis y el 96,77% no evidenció actividad gelatinasa, cumpliendo con estos criterios 235 cepas. La resistencia a ciprofloxacino fue la más prevalente (91,49%). Solo 13 cepas (*L. crispatus, L. jensenii* y *L. acidophilus/gasseri*) fueron sensibles a todos los antibióticos evaluados.

En la evaluación de la eficacia de las 13 cepas, los pH más bajos a las 72 horas fueron para TPV-097 (4,46 ± 0,02) y TPV-098 (4,50 ± 0,02), ambas *L. crispatus*. Diez cepas fueron homofermentativas y tres heterofermentativas. En cuanto a la tolerancia a pH ácido, las cepas TPV-071 (*L. jensenii*), TPV-422 (*L. acidophilus/gasseri*) y TPV-159 (*L. crispatus*) sobrevivieron a pH 4. La mayor capacidad de auto-agregación a las 24 horas correspondió a TPV-171 (56,86%) y TPV-097 (56,79%). En relación con la capacidad de co-agregación, las cepas TPV-391 (45,49%) y TPV-171 (43,57%) mostraron mayor co-agregación frente a *S. agalactiae*, TPV-098 (44,62%) y TPV-376 (42,39%) frente a *G. vaginalis* y TPV-098 (42,55%) frente a *C. albicans*. La co-agregación con *E. coli* fue limitada en todos los lactobacilos evaluados.

En la evaluación de la actividad antimicrobiana las cepas TPV-376 (*L. crispatus*) y TPV-071 (*L. jensenii*) mostraron la mayor actividad frente a *E. coli*, las cepas de *L. crispatus* TPV-159 (*L. crispatus*) y TPV-193 (*L. crispatus*) frente a *S. agalactiae*, las cepas TPV-071 (*L. jensenii*) y TPV-098 (*L. crispatus*) frente a *G. vaginalis*. En la actividad antifúngica frente a *C. albicans*, TPV-376 (*L. crispatus*) y TPV-071 (*L. jensenii*) presentaron los menores recuentos de colonias de levaduras.

Las cepas TPV-376, TPV-097 y TPV-098 de *L. crispatus* y TPV-071 de *L. jensenii* fueron identificadas como las cepas con mayor potencial probiótico *in vitro*, de acuerdo con las evaluaciones de seguridad y eficacia evaluados en el presente estudio, por lo que podría considerarse como candidatos para el desarrollo de productos probióticos vaginales para la prevención y manejo de la vaginosis bacteriana y la candidiasis vulvovaginal en la población.

CAPITULO VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar la caracterización molecular mediante secuenciación del genoma completo de las cepas de lactobacilos, con el fin de identificar genes asociados a propiedades probióticas, factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos.
- Asimismo, evaluar la co-agregación y la actividad antimicrobiana frente a cepas clínicas de *G. vaginalis*, *C. albicans*, *S. agalactiae* y *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones vaginales, con el propósito de determinar la relevancia clínica de los resultados obtenidos *in vitro*.
- Se recomienda evaluar la producción de peróxido de hidrógeno y bacteriocinas de los lactobacilos vaginales para ampliar el estudio de los mecanismos de acción frente a patógenos.
- Ampliar el muestreo a otras regiones del Perú, con la finalidad de evaluar la composición de la microbiota vaginal de las mujeres peruanas, considerando que se ha reportado la variabilidad étnica y geográfica.

CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jie Z, Liang W, Ding Q, Liu X, Zhang Y, Chen N, et al. Genomic landscape of the human vaginal microbiome is linked to host genetics and population of origin. Nat Genet. 2026 Jul;58(7):1595–609. doi:10.1038/s41588-026-02639-2
2. Diop K, Dufour JC, Levasseur A, Fenollar F. Exhaustive repertoire of human vaginal microbiota. Hum Microbiome J. 2019 Mar 1;11:100051. doi:10.1016/j.humic.2018.11.002
3. Paduch-Jakubczyk W, Dubińska M. The Role of Vaginal Microbiota in Women‘s Health. 2024. 16:75–9.
4. Han Y, Ren Q ling. Does probiotics work for bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis. Curr Opin Pharmacol. 2021 Dec;61:83–90. doi:10.1016/j.coph.2021.09.004
5. Espitia FDLH. Síndrome de flujo vaginal (vaginitis / vaginosis): Actualización diagnóstica y terapéutica: Vaginal discharge syndrome (vaginitis / vaginosis): diagnostic and therapeutic update. Rev Peru Investig Materno Perinat. 2021 Jul 19;10(2):42–55. doi:10.33421/inmp.2021224
6. Liang D, Wu F, Zhou D, Tan B, Chen T. Commercial probiotic products in public health: current status and potential limitations. Crit Rev Food Sci Nutr. 2023 Jan 23;1–22. doi:10.1080/10408398.2023.2169858
7. Mazzantini D, Calvigioni M, Celandroni F, Lupetti A, Ghelardi E. Spotlight on the Compositional Quality of Probiotic Formulations Marketed Worldwide. Front Microbiol. 2021 Jul 20;12:693973. doi:10.3389/fmicb.2021.693973
8. Lehtoranta L, Ala-Jaakkola R, Laitila A, Maukonen J. Healthy Vaginal Microbiota and Influence of Probiotics Across the Female Life Span. Front Microbiol. 2022 Apr 8;13:819958. doi:10.3389/fmicb.2022.819958
9. Aslim B, Kilic E. Some probiotic properties of vaginal lactobacilli isolated from healthy women. Jpn J Infect Dis. 2006 Aug;59(4):249–53. PubMed PMID: 16936344.
10. Balzaretti S, Taverniti V, Rondini G, Marcolegio G, Minuzzo M, Remagni MC, et al. The vaginal isolate *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 (DSM 26760) is suitable for oral administration. Front Microbiol. 2015 Sep 15;6. doi:10.3389/fmicb.2015.00952
11. Parolin C, Marangoni A, Laghi L, Foschi C, Ñahui Palomino RA, Calonghi N, et al. Isolation of Vaginal Lactobacilli and Characterization of Anti-Candida Activity.

Sturtevant J, editor. PLOS ONE. 2015 Jun 22;10(6):e0131220. doi:10.1371/journal.pone.0131220

12. Nami Y, Haghshenas B, Yari Khosroushahi A. Molecular Identification and Probiotic Potential Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Human Vaginal Microbiota. Adv Pharm Bull. 2018 Nov 29;8(4):683–95. doi:10.15171/apb.2018.077
13. Pino A, Bartolo E, Caggia C, Cianci A, Randazzo CL. Detection of vaginal lactobacilli as probiotic candidates. Sci Rep. 2019 Mar 4;9(1):3355. doi:10.1038/s41598-019-40304-3
14. ER S, İStanbullu Tosun A, Arik G. Anticandidal activities of lactic acid bacteria isolated from the vagina. Turk J Med Sci. 2019 Feb 11;49(1):375–83. doi:10.3906/sag-1709-143
15. Meleh HU, Choo S, Mohd Desa MN, Chew SY, Rangasamy P, Hassan H, et al. Isolation and safety characterisation of lactobacilli strains with antimicrobial properties as potential probiotics for human use. LWT. 2020 Sep;131:109796. doi:10.1016/j.lwt.2020.109796
16. Tajdozian H, Seo H, Kim S, Rahim MA, Lee S, Song HY. Efficacy of *Lactobacillus fermentum* Isolated from the Vagina of a Healthy Woman against Carbapenem-Resistant Klebsiella Infections In Vivo. J Microbiol Biotechnol. 2021 Oct 28;31(10):1383–92. doi:10.4014/jmb.2103.03014
17. Asadi A, Lohrasbi V, Abdi M, Mirkalantari S, Esghaei M, Kashanian M, et al. The probiotic properties and potential of vaginal *Lactobacillus* spp. isolated from healthy women against some vaginal pathogens. Lett Appl Microbiol. 2022 May 1;74(5):752–64. doi:10.1111/lam.13660
18. Chinchay G, Guerra F, Pérez G, Coronel J, De La Cruz A. Sobrenadante de Lactobacillus spp. aislados de secreción vaginal y su actividad antagónica sobre especies de *Candida*. Rev Científica Dékamu Agropec. 2024 Dec 17;5(2):113–9. doi:10.55996/dekamuagropec.v5i2.263
19. Baud A, Hillion KH, Plainvert C, Tessier V, Tazi A, Mandelbrot L, et al. Microbial diversity in the vaginal microbiota and its link to pregnancy outcomes. Sci Rep. 2023 Jun 4;13(1):9061. doi:10.1038/s41598-023-36126-z
20. Jonouchi D, Shenoy S, Saintlouis R, Singh A, Kashyap D, Bhargavi C, et al. Vaginal microbiome composition in pregnant and non-pregnant women: community structure, population variation, clinical impact, and metagenomics approaches.

Raffatellu M, editor. Infect Immun. 2026 Jul 14;94(7):e00542-25. doi:10.1128/iai.00542-25

21. Dobreva L, Atanasova N, Donchev P, Krumova E, Abrashev R, Karakirova Y, et al. Candidate-Probiotic Lactobacilli and Their Postbiotics as Health-Benefit Promoters. Microorganisms. 2024 Sep 19;12(9):1910. doi:10.3390/microorganisms12091910
22. Shah AB, Baiseitova A, Zahoor M, Ahmad I, Ikram M, Bakhsh A, et al. Probiotic significance of *Lactobacillus* strains: a comprehensive review on health impacts, research gaps, and future prospects. Gut Microbes. 2024 Dec 31;16(1):2431643. doi:10.1080/19490976.2024.2431643
23. Matera M. Bifidobacteria, Lactobacilli... when, how and why to use them. Glob Pediatr. 2024 Jun;8:100139. doi:10.1016/j.gpeds.2024.100139
24. Kim SK, Guevarra RB, Kim YT, Kwon J, Kim H, Cho JH, et al. Role of Probiotics in Human Gut Microbiome-Associated Diseases. J Microbiol Biotechnol. 2019 Sep 28;29(9):1335–40. doi:10.4014/jmb.1906.06064
25. Wang Y, Zhang Z, Chen Q, Chen T. Simultaneous application of oral and intravaginal probiotics for *Helicobacter pylori* and its antibiotic-therapy-induced vaginal dysbacteriosis. Npj Biofilms Microbiomes. 2024 Jun 20;10(1):49. doi:10.1038/s41522-024-00521-9
26. Calderaro A, Chezzi C. MALDI-TOF MS: A Reliable Tool in the Real Life of the Clinical Microbiology Laboratory. Microorganisms. 2024 Feb 3;12(2):322. doi:10.3390/microorganisms12020322
27. Hosseini S, Martinez-Chapa SO. Principles and Mechanism of MALDI-TOF-MS Analysis. In: Fundamentals of MALDI-ToF-MS Analysis [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2017 [cited 2026 Oct 2]. p. 1–19. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-2356-9_1 doi:10.1007/978-981-10-2356-9_1
28. Torres-Sangiao E, Leal Rodriguez C, García-Riestra C. Application and Perspectives of MALDI–TOF Mass Spectrometry in Clinical Microbiology Laboratories. Microorganisms. 2021 Jul 20;9(7):1539. doi:10.3390/microorganisms9071539 PubMed PMID: 34361974; PubMed Central PMCID: PMC8307939.
29. Sibińska E, Arendowski A, Fijałkowski P, Gabryś D, Pomastowski P. Comparison of the Bruker Microflex LT and Zybio EXS2600 MALDI TOF MS systems for the identification of clinical microorganisms. Diagn Microbiol Infect Dis. 2024 Feb;108(2):116150. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2023.116150

30. Shokryazdan P, Sieo CC, Kalavathy R, Liang JB, Alitheen NB, Faseleh Jahromi M, et al. Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains with Antimicrobial Activity against Some Human Pathogenic Strains. BioMed Res Int. 2014;2014:1–16. doi:10.1155/2014/927268
31. Sanders ME, Akkermans LMA, Haller D, Hammerman C, Heimbach JT, Hörmannsperger G, et al. Safety assessment of probiotics for human use. Gut Microbes. 2010 May;1(3):164–85. doi:10.4161/gmic.1.3.12127
32. Saeed SWZ, Naseer I, Zahir ZA, Hilger T, Shahid S, Iqbal Z, et al. *Bacillus* Strains with Catalase Enzyme Improve the Physiology and Growth of Rice (Oryza sativa L.). Stresses. 2023 Oct 20;3(4):736–48. doi:10.3390/stresses3040050
33. Palela M, Giol ED, Amzuta A, Ologu OG, Stan RC. Fever temperatures impair hemolysis caused by strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Heliyon. 2022 Feb;8(2):e08958. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e08958
34. Prihanto AA, Muyasyaroh H, Jaziri AA, Umam NI. Isolation and Molecular Characterization of Gelatinase-Producing Bacteria from Mangrove Sediment. Biog J Ilm Biol. 2020 Jun 30;8(1). doi:10.24252/bio.v8i1.10826
35. Wanger A, Chavez V, Huang RSP, Wahed A, Actor JK, Dasgupta A. Antibiotics, Antimicrobial Resistance, Antibiotic Susceptibility Testing, and Therapeutic Drug Monitoring for Selected Drugs. In: Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology [Internet]. Elsevier; 2017 [cited 2023 Nov 29]. p. 119–53. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128053515000077 doi:10.1016/B978-0-12-805351-5.00007-7
36. Binda S, Hill C, Johansen E, Obis D, Pot B, Sanders ME, et al. Criteria to Qualify Microorganisms as "Probiotic" in Foods and Dietary Supplements. Front Microbiol. 2020 Jul 24;11. doi:10.3389/fmicb.2020.01662
37. Tachedjian G, Aldunate M, Bradshaw CS, Cone RA. The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. Res Microbiol. 2017 Nov;168(9–10):782–92. doi:10.1016/j.resmic.2017.04.001
38. Freire TT, Silva ALTE, Ferreira BKO, Santos TMD. Bactérias ácido lácticas suas características e importância: revisão. Res Soc Dev. 2021 Sep 7;10(11):e513101119964. doi:10.33448/rsd-v10i11.19964
39. O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA. Vaginal pH and Microbicidal Lactic Acid When Lactobacilli Dominate the Microbiota. Landay A, editor. PLoS ONE. 2013 Nov 6;8(11):e80074. doi:10.1371/journal.pone.0080074

40. Karthik N, Binod P, Pandey A. Chitinases. In: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering [Internet]. Elsevier; 2017 [cited 2025 Dec 31]. p. 335–68. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444636621000154 doi:10.1016/B978-0-444-63662-1.00015-4
41. Lee HM, Lee Y. A differential medium for lactic acid-producing bacteria in a mixed culture. Lett Appl Microbiol. 2008 Jun;46(6):676–81. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02371.x
42. Vinderola G, Ouwehand A, Salminen S, Von Wright A. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects [Internet]. 6th ed. Boca Raton: CRC Press; 2024 [cited 2026 Mar 18]. Available from: https://www.taylorfrancis.com/books/9781003352075 doi:10.1201/9781003352075
43. Sionek B, Szydłowska A, Trząskowska M, Kołożyn-Krajewska D. The Impact of Physicochemical Conditions on Lactic Acid Bacteria Survival in Food Products. Fermentation. 2024 Jun 4;10(6):298. doi:10.3390/fermentation10060298
44. Wang S, Li L, Yu L, Tian F, Zhao J, Zhai Q, et al. Natural aggregation of *Lactobacillus*: Mechanisms and influencing factors. Food Biosci. 2024 Dec 1;62:105007. doi:10.1016/j.fbio.2024.105007
45. Fijan S. Probiotics and Their Antimicrobial Effect. Microorganisms. 2023 Feb 19;11(2):528. doi:10.3390/microorganisms11020528
46. Agriopoulou S, Stamatelopoulou E, Sachadyn-Król M, Varzakas T. Lactic Acid Bacteria as Antibacterial Agents to Extend the Shelf Life of Fresh and Minimally Processed Fruits and Vegetables: Quality and Safety Aspects. Microorganisms. 2020 Jun 24;8(6):952. doi:10.3390/microorganisms8060952
47. Braz VS, Melchior K, Moreira CG. *Escherichia coli* as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium. Front Cell Infect Microbiol. 2020 Dec 21;10:548492. doi:10.3389/fcimb.2020.548492
48. Cools P. The role of Escherichia coli in reproductive health: state of the art. Res Microbiol. 2017 Nov;168(9–10):892–901. doi:10.1016/j.resmic.2017.02.002
49. HajiAhmadi P, Momtaz H, Tajbakhsh E. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from pregnant women. Sci Rep. 2025 Feb 18;15(1):5887. doi:10.1038/s41598-025-86565-z
50. Ruiz-Gómez ML, Martín-Way DA, Pérez-Ramírez MD, Gutiérrez-Fernández J. Infecciones profundas por *Gardnerella vaginalis* en el varón. Revisión de la literatura

y a propósito de un caso. Rev Esp Quimioter. 2019;32(5):469–72. PubMed PMID: 31515976; PubMed Central PMCID: PMC6790880.

51. Macias-Paz IU, Pérez-Hernández S, Tavera-Tapia A, Luna-Arias JP, Guerra-Cárdenas JE, Reyna-Beltrán E. Candida albicans the main opportunistic pathogenic fungus in humans. Rev Argent Microbiol. 2023 Apr;55(2):189–98. doi:10.1016/j.ram.2022.08.003
52. Zhao Y, Wang P, Sun X, Zhao M, Chen Y, Gao X. *Candida albicans* Infection Disrupts the Metabolism of Vaginal Epithelial Cells and Inhibits Cellular Glycolysis. Microorganisms. 2024 Jan 30;12(2):292. doi:10.3390/microorganisms12020292
53. Mahmoud SYM, Atallah AA, Badr OA, Moustafa MMA, Esmael A, Ebrahim N, et al. Bioprospecting for Novel Probiotic Strains from Human Milk and Infants: Molecular, Biochemical, and Ultrastructural Evidence. Biology. 2022 Sep 26;11(10):1405. doi:10.3390/biology11101405
54. Luz C, Calpe J, Manuel Quiles J, Torrijos R, Vento M, Gormaz M, et al. Probiotic characterization of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk and employment for the elaboration of a fermented milk product. J Funct Foods. 2021 Sep;84:104599. doi:10.1016/j.jff.2021.104599
55. Goa T, Beyene G, Mekonnen M, Gorems K. Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Fermented Milk Produced in Jimma Town, Southwest Ethiopia, and Evaluation of their Antimicrobial Activity against Selected Pathogenic Bacteria. Castillo A, editor. Int J Food Sci. 2022 Dec 13;2022:1–15. doi:10.1155/2022/2076021
56. Kang W, Pan L, Peng C, Dong L, Cao S, Cheng H, et al. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from human milk. J Dairy Sci. 2020 Nov;103(11):9980–91. doi:10.3168/jds.2020-18704
57. Zhang W, Lai S, Zhou Z, Yang J, Liu H, Zhong Z, et al. Screening and evaluation of lactic acid bacteria with probiotic potential from local Holstein raw milk. Front Microbiol. 2022 Aug 1;13:918774. doi:10.3389/fmicb.2022.918774
58. Domingos-Lopes MFP, Stanton C, Ross PR, Dapkevicius MLE, Silva CCG. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. Food Microbiol. 2017 May;63:178–90. doi:10.1016/j.fm.2016.11.014
59. Trindade DPDA, Barbosa JP, Martins EMF, Tette PAS. Isolation and identification of lactic acid bacteria in fruit processing residues from the Brazilian Cerrado and its

probiotic potential. Food Biosci. 2022 Aug;48:101739. doi:10.1016/j.fbio.2022.101739

60. Anisimova E, Gorokhova I, Karimullina G, Yarullina D. Alarming Antibiotic Resistance of Lactobacilli Isolated from Probiotic Preparations and Dietary Supplements. Antibiotics. 2022 Nov 5;11(11):1557. doi:10.3390/antibiotics11111557
61. Parlindungan E, Lugli GA, Ventura M, Van Sinderen D, Mahony J. Lactic Acid Bacteria Diversity and Characterization of Probiotic Candidates in Fermented Meats. Foods. 2021 Jul 1;10(7):1519. doi:10.3390/foods10071519
62. Hindler JA, Richter SS. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria: M45. 3rd edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016. 98 p. (Documents / Clinical and Laboratory Standards Institute; 35,17).
63. Sobrun Y, Bhaw-Luximon A, Jhurry D, Puchooa D. Isolation of lactic acid bacteria from sugar cane juice and production of lactic acid from selected improved strains. Adv Biosci Biotechnol. 2012;03(04):398–407. doi:10.4236/abb.2012.34057
64. Stephen JM, Saleh AM. Homofermentative Lactobacilli isolated from organic sources exhibit potential ability of lactic acid production. Front Microbiol. 2023 Dec 21;14:1297036. doi:10.3389/fmicb.2023.1297036
65. N'Guessan Gnaman KC, Bouttier S, Yeo A, Aka Any-Grah AAS, Geiger S, Huang N, et al. Characterization and in vitro evaluation of a vaginal gel containing *Lactobacillus crispatus* for the prevention of gonorrhea. Int J Pharm. 2020 Oct;588:119733. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119733
66. Mollova D, Gozmanova M, Apostolova E, Yahubyan G, Iliev I, Baev V. Illuminating the Genomic Landscape of *Lactiplantibacillus plantarum* PU3—A Novel Probiotic Strain Isolated from Human Breast Milk, Explored through Nanopore Sequencing. Microorganisms. 2023 Sep 28;11(10):2440. doi:10.3390/microorganisms11102440
67. Pessoa WFB, Melgaço ACC, de Almeida ME, Ramos LP, Rezende RP, Romano CC. In Vitro Activity of Lactobacilli with Probiotic Potential Isolated from Cocoa Fermentation against *Gardnerella vaginalis*. BioMed Res Int. 2017;2017:3264194. doi:10.1155/2017/3264194 PubMed PMID: 29226130; PubMed Central PMCID: PMC5684529.
68. Elughi GN, Oniha MI, Obafemi YD, Akinyosoye AD, Ahuekwe EF, Akinduti PA. Antibacterial Activity of Cell-Free Supernatants of Probiotic *Lactobacillus* against

Bacterial Pathogens Associated with Vaginal Infections. J Pure Appl Microbiol. 2024 Mar 1;18(1):451–9. doi:10.22207/JPAM.18.1.28

69. Kang CH, Kim Y, Han SH, Kim JS, Paek NS, So JS. In vitro probiotic properties of vaginal *Lactobacillus fermentum* MG901 and *Lactobacillus plantarum* MG989 against *Candida albicans*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2018 Sep;228:232–7. doi:10.1016/j.ejogrb.2018.07.005
70. Juárez Tomás MS, Zonenschain D, Morelli L, Nader-Macías ME. Characterisation of potentially probiotic vaginal lactobacilli isolated from Argentinean women. Br J Biomed Sci. 2005;62(4):170–4. doi:10.1080/09674845.2005.11732706 PubMed PMID: 16411376.
71. Martinez RCR, Franceschini SA, Patta MC, Quintana SM, Nunes ÁC, Moreira JLS, et al. Analysis of Vaginal Lactobacilli from Healthy and Infected Brazilian Women. Appl Environ Microbiol. 2008 Jul;74(14):4539–42. doi:10.1128/AEM.00284-08 PubMed PMID: 18502927; PubMed Central PMCID: PMC2493183.
72. Štšepetova J, Taelma H, Smidt I, Hütt P, Lapp E, Aotäht E, et al. Assessment of phenotypic and genotypic antibiotic susceptibility of vaginal *Lactobacillus* sp. J Appl Microbiol. 2017 Aug;123(2):524–34. doi:10.1111/jam.13497
73. Rochat T, Gratadoux JJ, Gruss A, Corthier G, Maguin E, Langella P, et al. Production of a heterologous nonheme catalase by *Lactobacillus casei*: an efficient tool for removal of H2O2 and protection of *Lactobacillus bulgaricus* from oxidative stress in milk. Appl Environ Microbiol. 2006 Aug;72(8):5143–9. doi:10.1128/AEM.00482-06 PubMed PMID: 16885258; PubMed Central PMCID: PMC1538758.
74. Ouarabi L, Chait YA, Seddik HA, Drider D, Bendali F. Newly Isolated Lactobacilli strains from Algerian Human Vaginal Microbiota: *Lactobacillus fermentum* Strains Relevant Probiotic's Candidates. Probiotics Antimicrob Proteins. 2019 Mar 15;11(1):43–54. doi:10.1007/s12602-017-9360-0
75. Roldán-Pérez S, Gómez Rodríguez SL, Sepúlveda-Valencia JU, Ruiz Villadiego OS, Márquez Fernández ME, Montoya Campuzano OI, et al. Assessment of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from an artisanal Colombian cheese. Heliyon. 2023 Nov;9(11):e21558. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e21558
76. Zhu H, Chen Z, Li X. Safety assessment and fermentation potential of *Lactiplantibacillus plantarum* L3 isolated from the traditional Chinese fermented food Bianba for yogurt production. LWT. 2024 Jul 1;203:116421. doi:10.1016/j.lwt.2024.116421

77. Hütt P, Lapp E, Štšepetova J, Smidt I, Taelma H, Borovkova N, et al. Characterisation of probiotic properties in human vaginal lactobacilli strains. Microb Ecol Health Dis. 2016 Aug 12;27(0). doi:10.3402/mehd.v27.30484
78. Mane A, Khan I, Thakar M. Characterisation of Colonisation Properties of Vaginal Lactobacilli from Healthy Indian Women: Implications for Identification of Potential Probiotic Candidates. Indian J Med Microbiol. 2020 Jul 1;38(3):440–3. doi:10.4103/ijmm.IJMM_20_108
79. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. Proc Natl Acad Sci. 2011 Mar 15;108(supplement_1):4680–7. doi:10.1073/pnas.1002611107
80. Salvetti E, Harris HMB, Felis GE, O'Toole PW. Comparative Genomics of the Genus *Lactobacillus* Reveals Robust Phylogroups That Provide the Basis for Reclassification. Appl Environ Microbiol. 2018 Sep 1;84(17):e00993-18. doi:10.1128/AEM.00993-18 PubMed PMID: 29915113; PubMed Central PMCID: PMC6102987.
81. Chung EC, Lee JS, Lim HJ, Kim SJ, Chung YJ, Shin KJ. Isolation and Characterization of *Lactobacillus gasseri* Strains from Women for Potential Vaginal Health Applications. Microbiol Res. 2025 Jan 10;16(1):12. doi:10.3390/microbiolres16010012
82. Mobili P, De Los Ángeles Serradell M, Trejo SA, Avilés Puigvert FX, Abraham AG, De Antoni GL. Heterogeneity of S-layer proteins from aggregating and non-aggregating *Lactobacillus kefir* strains. Antonie Van Leeuwenhoek. 2009 May;95(4):363–72. doi:10.1007/s10482-009-9322-y
83. Ekmekci H, Aslim B, Ozturk S. Characterization of vaginal lactobacilli coaggregation ability with *Escherichia coli*. Microbiol Immunol. 2009 Feb;53(2):59–65. doi:10.1111/j.1348-0421.2009.00115.x
84. García-Cayuela T, Korany AM, Bustos I, P. Gómez de Cadiñanos L, Requena T, Peláez C, et al. Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. Food Res Int. 2014 Mar 1;57:44–50. doi:10.1016/j.foodres.2014.01.010
85. Piwat S, Sophatha B, Teanpaisan R. An assessment of adhesion, aggregation and surface charges of *Lactobacillus* strains derived from the human oral cavity. Lett Appl Microbiol. 2015 Jul;61(1):98–105. doi:10.1111/lam.12434

86. Scillato M, Spitale A, Mongelli G, Privitera GF, Mangano K, Cianci A, et al. Antimicrobial properties of *Lactobacillus* cell-free supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens. MicrobiologyOpen. 2021 Apr;10(2):e1173. doi:10.1002/mbo3.1173
87. Al Kassaa I, Hamze M, Hober D, Chihib NE, Drider D. Identification of Vaginal Lactobacilli with Potential Probiotic Properties Isolated from Women in North Lebanon. Microb Ecol. 2014 Apr;67(3):722–34. doi:10.1007/s00248-014-0384-7
88. McLEAN NW, ROSENSTEIN IJ. Characterisation and selection of a *Lactobacillus* species to re-colonise the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. J Med Microbiol. 2000;49(6):543–52. doi:10.1099/0022-1317-49-6-543
89. Xu H, Zhang S, Zhang B, Jiang N, Xu Y, Chen X, et al. Vaginal colonization of Lactobacilli: Mechanism and function. Microb Pathog. 2025 Jan 1;198:107141. doi:10.1016/j.micpath.2024.107141

CAPÍTULO IX. ANEXOS

UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

CONSTANCIA-CIEI-R-285-40-23

El Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el comité institucional de ética en investigación aprobó la **RENOVACIÓN** del proyecto de investigación señalado a continuación.

Título del Proyecto	:**"Caracterización del microbioma vaginal peruano y aislamiento de lactobacilos con potencial probiótico"**
Código SIDISI	: **21012**
Investigador(a) principal(es)	: **Del Carpio Sanz, Ada; Ballón Echegaray, Jorge Andrés; Barrionuevo Rodriguez, José; Lizarraga Vargas, Luis Carlos; Suaña Narvaez, Víctor Hugo; Condori, Sandra; Lebeer, Sarah; Lovon Luque, Cinthya Jeymi; Luna Paredes, Luis**

Cualquier enmienda, desviaciones y/u otras eventualidades deberá ser reportada a este Comité de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada **6 meses** el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste.

La presente **RENOVACIÓN** tiene vigencia desde el **17 de octubre del 2023** hasta el **16 de octubre del 2024.**

Así mismo el Comité toma conocimiento del Informe Periódico de Avances del estudio de referencia. Documento recibido en fecha 03 de octubre del 2023.

Los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 17 de octubre del 2023.

COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
Universidad Peruana Cayetano Heredia
CIEI

Dr. Manuel Raúl Pérez Martinot
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación

/ rrr

Av. Honorio Delgado 430
San Martín de Porres
Apartado Postal 4314
319 0000 Anexo 201355
orvei.ciei@oficinas-upch.pe
cayetano.edu.pe

Comité Institucional de
Ética en Investigación

Figura 6. Constancia de aprobación del Comité de ética

Tabla 18. Puntos de cortos de los halos de inhibición de los antibióticos evaluados

Antibiótico	Concentración (ug/disco)	R	I	S	Referencia
Ampicilina	10	≤ 12	13 – 15	≥ 16	(59, 60)(60,61)
Eritromicina	15	≤ 13	14 – 17	≥ 18	(59, 60)
Tetraciclina	30	≤ 14	15 – 18	≥ 19	(59, 60)
Vancomicina	30	≤ 14	15 – 16	≥ 17	(59, 60)
Ciprofloxacino	5	≤ 13	14 – 18	≥ 19	(59)
Rifampicina	5	≤ 16	17 – 19	≥ 20	(61)
Cloranfenicol	30	≤ 13	14 - 17	≥ 18	(59)

R: resistente; I: intermedio: S: sensible

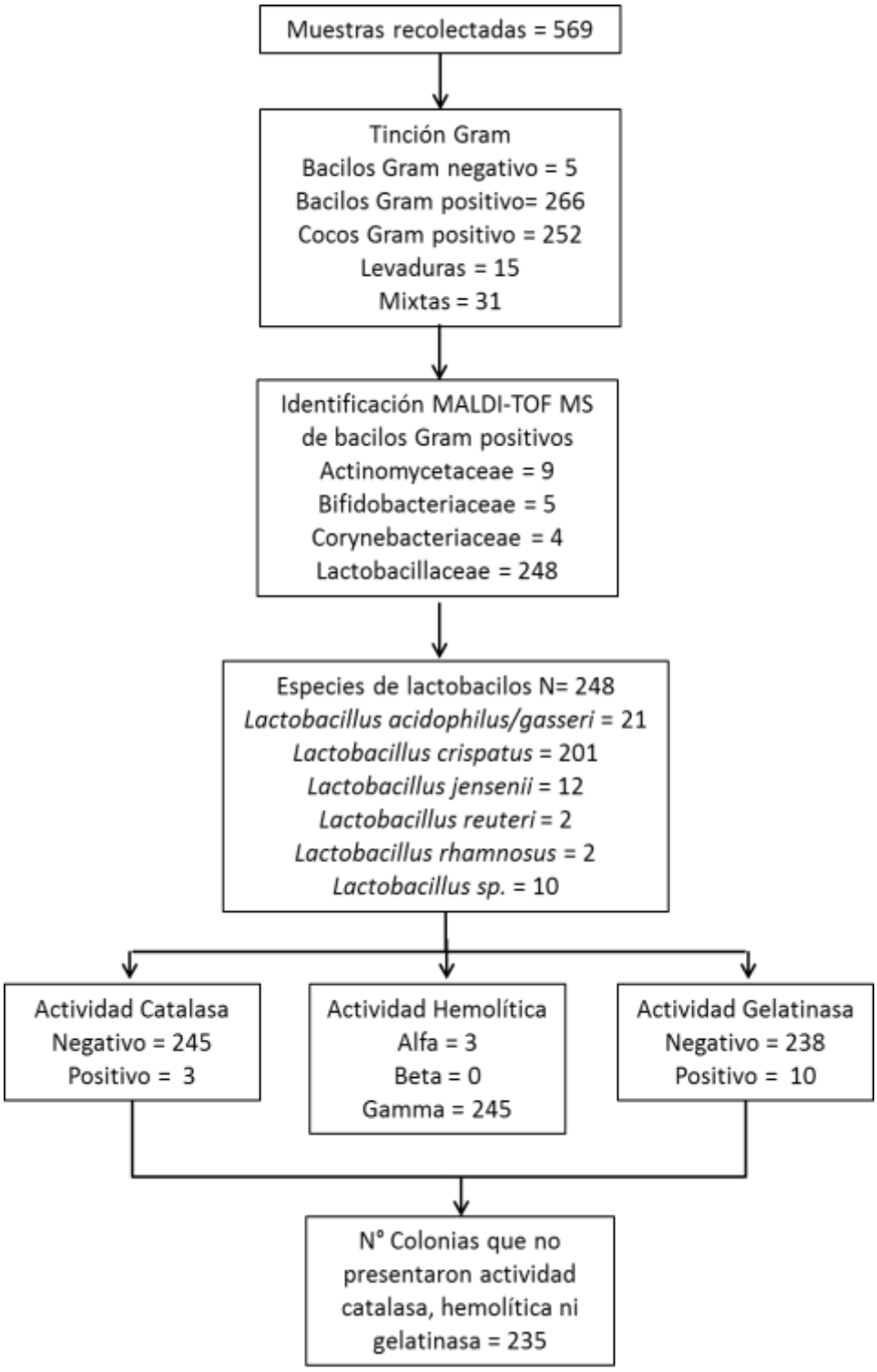


Figura 7. Resumen de los resultados obtenidos de descripción, identificación y evaluación de la seguridad.

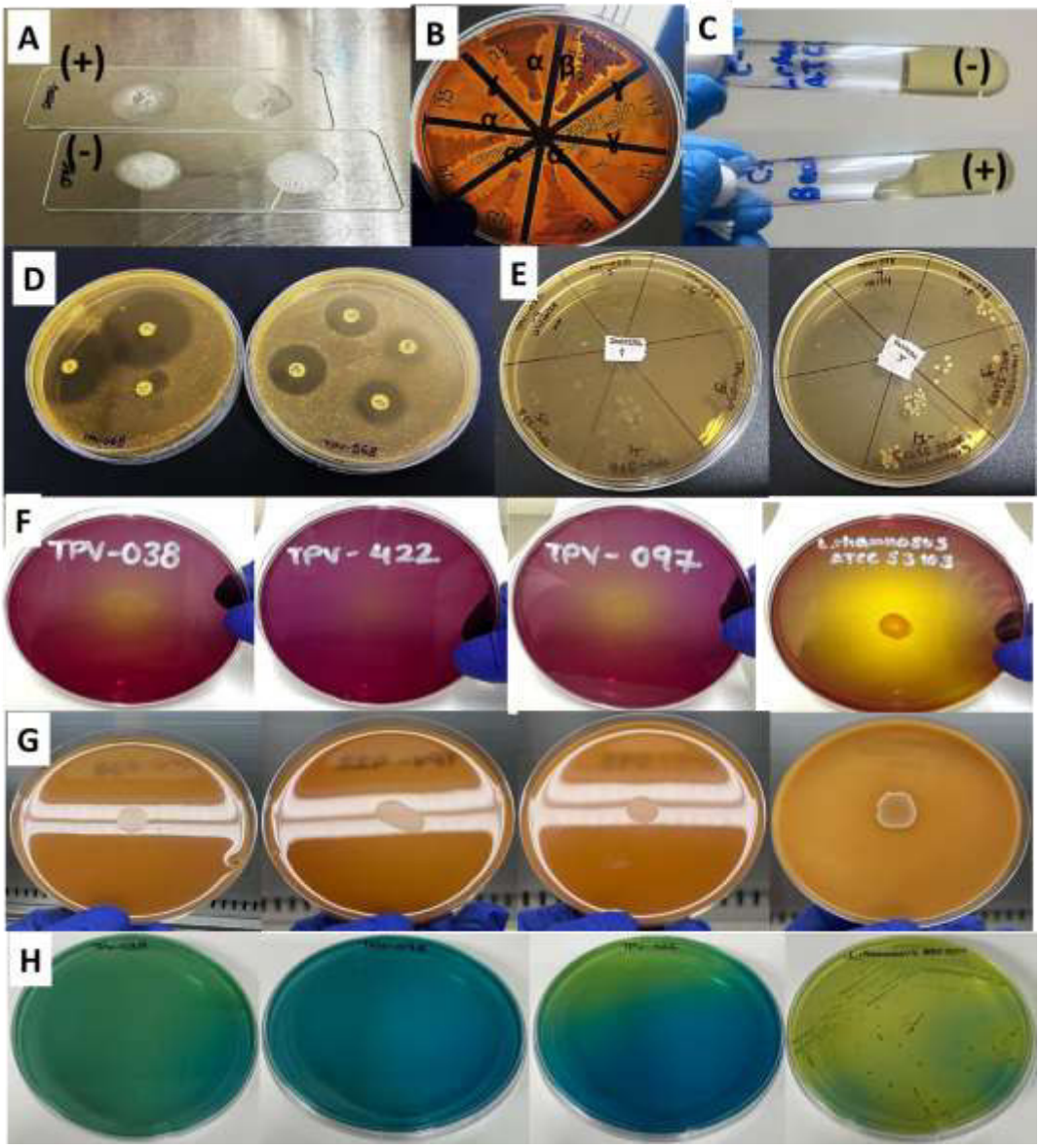


Figura 8. A. Actividad catalasa, B. hemolisis, C. Gelatinasa, D. Susceptibilidad a los antibióticos E. Tolerancia pH ácido, F. Agar MRS con 0.02% de púrpura de bromocresol, G. Agar MRS con carbonato de calcio y H. Agar diferencial

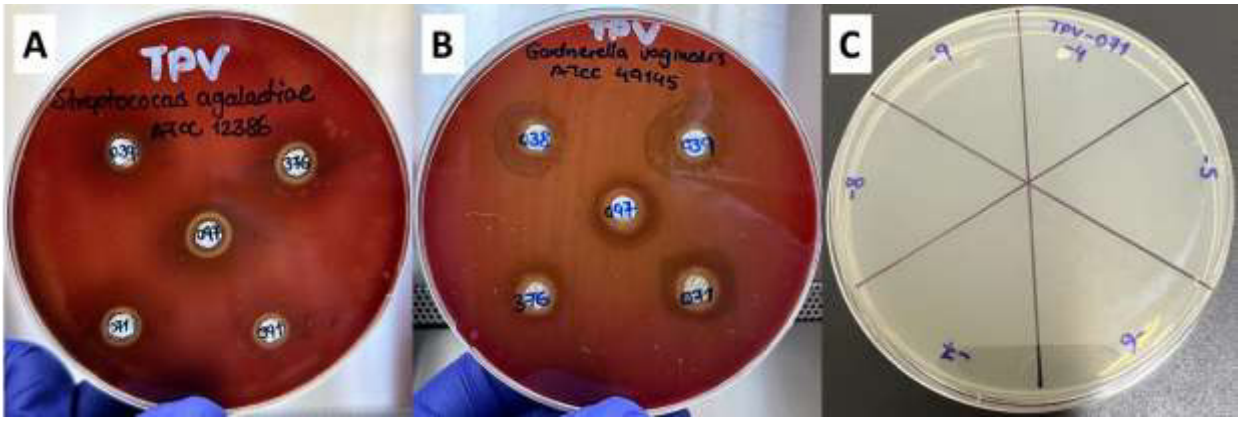


Figura 9. Actividad antibacteriana de los lactobacilos frente a *S. agalactiae* ATCC 12386, *G. vaginalis* ATCC 49145 y *C. albicans* ATCC 10231