

Bioquímica y Patología Clínica

Bioquímica y Patología Clínica

ISSN: 1515-6761

ISSN: 2684-0359

revista@aba-online.org.ar

Asociación Bioquímica Argentina

Argentina

Perazzi, Beatriz Elizabeth; Payalef, Sandra Noemi; Fleider, Laura Alicia; Reyes, Ana Paula Reyes; Maldonado, Verónica Andrea; Losada, Mirta Olga; Xin, Chen; Díaz, Lili Beatriz; Youxiang, Wang; Gómez Cherey, Facundo; Tatti, Silvio Alejandro
Microbiota vaginal y su relación con la infección por el virus del papiloma humano
Bioquímica y Patología Clínica, vol. 88, núm. 1, 2024, Enero-Abril, pp. 22-30
Asociación Bioquímica Argentina
Buenos Aires, Argentina

DOI: <https://doi.org/10.62073/bypc.v88i1.265>

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=65182041006>

- ▶ [Cómo citar el artículo](#)
- ▶ [Número completo](#)
- ▶ [Más información del artículo](#)
- ▶ [Página de la revista en redalyc.org](#)

redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc

Red de revistas científicas de Acceso Abierto diamante

Infraestructura abierta no comercial propiedad de la academia

ARTÍCULO ORIGINAL

Microbiota vaginal y su relación con la infección por el virus del papiloma humano

Vaginal microbiota and its relationship with human papilloma virus infection.

Perazzi, Beatriz Elizabeth^{1,2}; Payalef, Sandra Noemi^{1,2}; Fleider, Laura Alicia³; Reyes, Ana Paula Reyes^{1,2}; Maldonado, Verónica Andrea³; Losada, Mirta Olga^{1,2}; Xin Chen⁴; Díaz, Lilí Beatriz⁵; Youxiang Wang⁴; Gómez Cherey, Facundo³; Tatti, Silvio Alejandro³.

¹Laboratorio de Bacteriología Clínica, Departamento de Bioquímica Clínica, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. CABA, Argentina.

²Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. CABA, Argentina.

³División Ginecología y Obstetricia, Hospital de Clínicas "José de San Martín". Universidad de Buenos Aires CABA, Argentina.

⁴Atila BioSystems. Silicon Valley, Estados Unidos.

⁵Departamento de Patología, Hospital de Clínicas "José de San Martín". Universidad de Buenos Aires CABA, Argentina.

*Contacto: Perazzi, Beatriz Elizabeth, Lavalleja 2726 (1824), Lanús Oeste, Buenos Aires, Argentina; beatrizperazzi@gmail.com.

Resumen **Objetivos:** Determinar la prevalencia de infección por el virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-ar) en distintos grupos etarios y según grado de lesión. Establecer la prevalencia de vaginosis bacteriana, candidiasis y trichomoniasis en los grupos estudiados y caracterizar las especies de lactobacilos según el tipo de lesión. Evaluar la disfunción vaginal mediante los estados vaginales básicos por balance del contenido de la vagina en pacientes infectadas por el virus del papiloma humano, según tipo de lesión, en comparación con pacientes control no infectadas. **Materiales y Métodos:** Se llevó a cabo un estudio transversal. Se realizó un examen clínico y se tomó una muestra para estudio de estados vaginales básicos y cultivo. La identificación de especies se realizó por MALDI TOF-MS. Se determinaron los tipos de VPH-ar con *qPCR multiplex*. Se utilizó test de chi cuadrado y Fisher y se consideró significativo $p < 0,05$. **Resultados:** Se estudiaron 741 pacientes divididas en 3 grupos: grupo 1 (18 - 24 años) $n = 138$; grupo 2 (25 - 50 años) $n = 456$ y grupo 3 (>50 años) $n = 147$. Además, las pacientes fueron subdivididas en VPH negativas, VPH positivas sin lesión, con lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (L-SIL), con lesión intraepitelial escamosa de alto grado / carcinoma de cuello uterino (H-SIL/CC). El VPH16 fue el tipo de VPH-ar más asociado con H-SIL/CC (grupo 1: 63,6%, grupo 2: 43,8% y grupo 3: 100%). La prevalencia de estados vaginales básicos de desbalance en H-SIL/CC fue para el grupo 1 de 72,7% ($p = 0,03$), para el grupo 2 de 53,1% ($p = 0,05$) y no se detectaron casos en el grupo 3. La patología más prevalente fue la vaginosis bacteriana en los tres grupos ($p < 0,001$). En el grupo 1, el 54,2% de las pacientes VPH16+ tuvo vaginosis bacteriana asociada ($p = 0,054$). Las pacientes con H-SIL/CC tuvieron una prevalencia de: 21,4% de *Lactobacillus crispatus*, 42,9% de *L. jensenii* y 14,3% de *L. iners*. **Conclusiones:** El VPH16 fue el tipo más prevalente en el grupo 1 y en el grupo 2. Se observó mayor desbalance de la microbiota en pacientes H-SIL/CC en el grupo 1 y el grupo 2 y una baja prevalencia de *L. crispatus*, a la vez que un incremento de *L. jensenii* y *L. iners*.

Palabras clave: prevalencia, *Papillomaviridae*, virus del papiloma humano 16, vaginosis bacteriana, candidiasis vulvovaginal, enfermedades vaginales, desbalance vaginal, trichomoniasis, *Lactobacillus*.

Abstract **Objectives:** i) to determine the prevalence of high-risk Human Papilloma Virus (hrHPV) infection in different age groups and according to the degree of lesion; ii) to establish the prevalence of bacterial vaginosis, candidiasis and trichomoniasis in the groups studied and to characterize the species of lactobacilli according to the type of lesion; and iii) to assess vaginal dysfunction through the balance of vaginal content by basic vaginal states in HPV-positive patients by lesion type compared to a control without infection. **Materials and Methods:** Cross-sectional study. Patients were clinically examined and samples were collected for the study of basic vaginal states and culture. Species were identified by MALDI TOF. hrHPV types were determined by multiplex qPCR. Chi square and Fisher tests were used, considering $p < 0.05$ as significant. **Results:** A total of 741 patients were studied. They were divided into three groups: Group 1 (18-24 years) $n=138$, Group 2 (25-50 years) $n=456$ and Group 3 (>50 years) $n=147$. They were also divided into HPV negative patients, HPV positive without lesion, Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion (L-SIL), and High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion/ Cervical Cancer (H-SIL/CC). HPV16 was the hrHPV type most associated with H-SIL/CC (Group 1: 63.6%, Group 2: 43.8% and Group 3 100%). The prevalence of basic vaginal states of unbalance in H-SIL/CC was: Group 1: 72.7% ($p=0.03$), Group 2: 53.1% ($p=0.05$) and Group 3: no cases. In the three groups, the most prevalent infection was bacterial vaginosis ($p < 0.001$). In Group 1, 54.2% of the HPV16 patients had associated bacterial vaginosis ($p=0.054$). Patients with H-SIL/CC had a prevalence of 21.4% of *Lactobacillus crispatus*, 42.9% of *L. jensenii*, and 14.3% of *L. iners*. **Conclusions:** HPV16 was the most prevalent type in Groups 1 and 2. Results also showed a higher unbalanced microbiota in H-SIL/CC patients in Groups 1 and 2 and a low prevalence of *L. crispatus* and an increase in *L. jensenii* and *L. iners*.

Key Words: Prevalence, Papillomaviridae, Human papillomavirus 16, Bacterial Vaginosis, Vulvovaginal Candidiasis, Vaginal Diseases, Vaginal Unbalance, Trichomoniasis, *Lactobacillus*.

Introducción

La vagina y las comunidades bacterianas que allí residen son un ejemplo de ecosistema finamente equilibrado. El huésped proporciona beneficios a las comunidades bacterianas en forma de nutrientes, algunos de los cuales provienen de las células descamadas y otros, de las secreciones glandulares. Las comunidades bacterianas juegan un papel protector contra infecciones del tracto genital inferior, tales como vaginosis bacteriana (VB), candidiasis, infecciones de transmisión sexual (ITS) e infecciones del tracto urinario (ITU). Los lactobacilos son las especies más abundantes en las comunidades vaginales, en las mujeres en edad reproductiva; benefician al huésped, ya que son capaces de producir ácido láctico, que reduce el pH vaginal y protege de microorganismos potencialmente dañinos¹.

La microbiota no es constante a lo largo de la vida de la mujer; varía desde el nacimiento, con un predominio de lactobacilos en la primera semana de vida; luego, hasta la menarca, la vagina es colonizada por microbiota intermedia, correspondiente a bacterias de localización intestinal y de piel. En la pubertad, como consecuencia de la maduración del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal, vuelven a predominar especies de lactobacilos y, en menor proporción, una gran variedad de especies de bacterias aerobias y anaerobias, e inclusive de levaduras. Es entonces admisible reconocer la influencia de la estimulación hormonal, principalmente de origen estrogénico, en la colonización vaginal, con un predominio de microbiota lactobacilar^{2,3}.

En las mujeres adultas sanas, el pH se encuentra entre 3,5 y 4,5; y a su vez, las especies predominantes de lactobacilos mantienen el pH bajo a través de su actividad de fermentación de glucógeno, que protege el área contra la invasión de microorganismos indeseables⁴. Recientemente, los métodos moleculares han demostrado la presencia de *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* y *L. iners* como gérmenes más comunes⁵.

Existen, además, diversos factores que pueden influenciar la composición del microbioma vaginal, los que se dividen en no modificables (raza/etnia, edad, ciclo menstrual) y en modificables (utilización de distintos métodos anticonceptivos,

comportamiento sexual, duchas vaginales, tabaquismo y dieta)⁶. Es conocido el hecho de que un microbioma vaginal balanceado puede prevenir las infecciones del tracto genital inferior, mientras que la falta de lactobacilos favorece el desarrollo de VB y la adquisición de ITS como herpes virus, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y virus papiloma humano (VPH)^{7,8}.

Evidencia reciente sugiere que el estado del microbioma podría influenciar el desarrollo del cáncer, situación que ya ha sido caracterizada para el microbioma gastrointestinal⁹.

En cuanto a la relación entre el cáncer ginecológico y el desbalance del microbioma, el ejemplo más claro encontrado hasta este momento es el desarrollo de tumores VPH relacionados. La infección por VPH es extremadamente común: el 50% de las mujeres menores de 30 años tendrá una prueba de VPH positiva en un periodo de 3 años¹⁰. Asimismo, la presencia de este virus podría seleccionar el ecosistema microbiano vaginal acompañante. Un estudio demuestra que las mujeres con infección y con VPH presentaron en sus microbiomas aumento del contenido de *L. gasseri* y *Gardnerella vaginalis*¹¹. En cambio, los microbiomas balanceados demuestran mayor cantidad de *L. crispatus*^{12,13}.

Factores mecánicos como las duchas vaginales o las relaciones sexuales y factores biológicos como la VB^{14,15} o ITS¹⁶ alteran el microambiente vaginal y han sido identificados como cofactores en la persistencia de la infección por VPH.

Esto sugiere que factores adicionales actúan en conjunto con el VPH para influenciar el desarrollo de cáncer cervical.

Los objetivos de este trabajo fueron: 1) Determinar la prevalencia de VPH de alto riesgo (VPH-ar) en distintos grupos etarios y según grado de lesión, 2) Establecer la prevalencia de VB, candidiasis y trichomoniasis en los grupos estudiados y caracterizar las especies de lactobacilos, según el tipo de lesión y 3) Evaluar la disfunción vaginal mediante los estados vaginales básicos (EVB) por metodología del balance del contenido vaginal (BACOVA) en pacientes VPH positivas, según tipo de lesión, en comparación con un control.

Tabla I. Prevalencia de los distintos tipos de virus del papiloma humano de alto riesgo, en función de los grupos etarios estudiados.

	Grupo de 18-24 años		Grupo de 25-50 años		Grupo mayor de 50 años	
	N	%	N	%	N	%
VPH 16	24	17,4	49	10,7	9	6,1
VPH 18	7	5,1	5	1,1	5	3,4
VPH 45	0	0	3	0,7	2	1,4
VPH 31,33	14	10,1	24	5,3	1	0,7
VPH 52,58	9	6,5	16	3,5	2	1,4
VPH 66	6	4,3	7	1,5	4	2,7
Otros tipos	19	13,8	49	10,7	20	13,6
Negativo	59	42,8	303	66,5	104	70,7
TOTAL	138	100	456	100	147	100

► VPH, virus del papiloma humano

Materiales y Métodos

Se realizó un estudio consecutivo, descriptivo, de corte transversal. Se examinaron pacientes entre 18 y 85 años, con inicio de relaciones sexuales, atendidas en el Programa de Prevención, Diagnóstico, Terapéutica y Vacunación en el Tracto Genital Inferior, entre octubre del 2015 y junio del 2021. Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital y todas las pacientes dieron su consentimiento informado.

La población estudiada se clasificó en los siguientes grupos etarios: grupo 1 (18 - 24 años), grupo 2 (25 - 50 años) y grupo 3 (>50 años). A su vez, cada grupo etario se subdividió en: pacientes VPH negativas [grupo control], pacientes VPH positivas sin lesión, pacientes con lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (L-SIL), pacientes con lesión intraepitelial escamosa de alto grado / carcinoma de cuello uterino (H-SIL/CC).

Los criterios de exclusión fueron: uso de antibióticos (ATB) locales o sistémicos dentro de los 15 días previos a la consulta; embarazadas, malformaciones genitales; pacientes en tratamiento con corticoides o quimioterapia; sin inicio de relaciones sexuales y quienes no tuvieran abstinencia sexual dentro de las 48 h previas al estudio.

En el consultorio, previa firma del consentimiento informado, se recabaron los datos para completar la historia clínica. Se tomó muestra exo y endocervical para citología, (con espátula de Ayre y *cytobrush*).

Se realizó colposcopia a todas las pacientes con un aumento de 16x, previa aplicación de un spray de ácido acético sobre el cuello uterino. Los datos recabados de la colposcopia fueron catalogados de acuerdo con la clasificación de la International Federation of Colposcopy and Cervical Pathology [versión 2011]¹⁷.

Las citologías fueron coloreadas con la técnica de Papanicolaou, la cual se informó según la clasificación de Bethesda [versión 2014]¹⁸. Las muestras histológicas fueron in-

formadas de acuerdo con la clasificación propuesta por el LAST (*Lower Anogenital Squamous Terminology*) Project¹⁹. A todas las pacientes se les realizó examen clínico y toma de fondo de saco vaginal para el estudio microbiológico por metodología convencional y estudio de los EVB mediante BACOVA.

El estudio microbiológico del contenido vaginal incluyó los siguientes exámenes:

1. Extendidos para coloración de Gram y May-Grunwald Giemsa prolongada
2. Observación en fresco con 1 ml de solución fisiológica (SF)
3. Determinación de pH de la secreción vaginal
4. Observación en fresco con 1 ml de KOH al 10 % y prueba de aminas
5. Cultivo en medio líquido (tioglicolato modificado) para *T. vaginalis*, con incubación de 7 días a 37°C en atmósfera de 5 % de CO₂²⁰.
6. Cultivo en agar base Columbia con 5% de sangre humana y en agar Man Rogosa, con incubación de 48 h a 37°C en atmósfera de 5 % de CO₂, conservando la muestra en medio de Stuart.

La detección de candidiasis se realizó a través de la observación en fresco con solución fisiológica (SF) y con KOH al 10 % y por cultivo en agar Sabouraud y agar sangre. La investigación de *T. vaginalis* se realizó a través de la observación microscópica directa con SF, la coloración de May-Grunwald Giemsa prolongada y el cultivo en tioglicolato modificado^{21,22}. El diagnóstico de VB se realizó utilizando el criterio de Nugent²². El estudio del BACOVA incluyó el análisis morfológico del contenido vaginal en función de la relación del valor numérico (VN) y la reacción inflamatoria vaginal (RIV), y se identificaron 5 EVB: microbiota normal (I), microbiota normal más reacción inflamatoria (II), microbiota intermedia (III), VB (IV) y vaginitis microbiana inespecífica (V)²³.

Para el aislamiento de las distintas especies de lactobaci-

Tabla II. Prevalencia de los distintos tipos de virus del papiloma humano de alto riesgo, en función del grado de lesión intraepitelial escamosa en el grupo de 18-24 años.

	Sin lesión		LSIL		H-SIL/CC	
	N	%	N	%	N	%
VPH 16	10	9,6	7	30,4	7	63,6
VPH 18	5	4,8	1	4,4	1	9,1
VPH 45	0	0	0	0	0	0
VPH 31,33	10	9,6	4	17,4	0	0
VPH 52,58	7	6,8	2	8,7	0	0
VPH 66	6	5,8	0	0	0	0
Otros tipos	15	14,4	3	13,0	1	9,1
Negativo	51	49,0	6	26,1	2	18,2
Total	104	100	23	100	11	100

► LSIL, lesión intraepitelial escamosa de bajo grado; H-SIL/CC, lesión intraepitelial escamosa de alto grado / carcinoma de cuello uterino; VPH, virus del papiloma humano.

los, se utilizó el agar sangre y el agar Man Rogosa, y la identificación se realizó mediante espectrometría de masa BDTM Bruker MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por matriz, con detector de iones por tiempo de vuelo), utilizando una base de datos que incluyó más de 90 especies de lactobacilos y considerando un $score \geq 1,7$ para nivel de especie²⁴, método validado contra secuenciación del gen ADNr 16S (método de referencia)²⁵.

Para la detección de VPH-ar, a las muestras de las pacientes se le realizó una prueba de *PCR real time multiplex*, AmpFire Multiplex HPV Assays (catalog number: MHPVF1618-100), que detecta la presencia de 15 tipos de VPH-ar y, simultáneamente, de VPH-16 y 18 en una reacción más un control interno (gen de -globina humana) con detección fluorescente isotérmica en tiempo real. Las sondas específicas para VPH-16, VPH-18, VPH-ar no 16/18 [31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68] y el control interno se marcaron con CY5, ROX, FAM y HEX, respectivamente. La falta de una curva de amplificación exponencial en el canal HEX se interpretó como un resultado no válido²⁶.

Análisis de datos

Para comparar las prevalencias de los EVB y de las especies de lactobacilos, de candidiasis, VB y trichomoniasis en los distintos grupos etarios y subgrupos, atendiendo a la lesión intraepitelial que la paciente presentó y de acuerdo con el tipo de VPH-ar, se utilizó el test de chi cuadrado (χ^2), *Odds Ratio* y el test de Fisher. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. El análisis estadístico fue realizado con el *software Epi Data® versión 7.2.2.6* (Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Department of Health & Human Services).

Resultados

Se estudiaron 741 pacientes divididas en 3 grupos etarios: grupo 1 (18-24 años) (media=21,6; IC95% 21,7-21,9; n=138), grupo 2 (25-50 años) (media=35,2; IC95% 34,5-

35,8; n=456) y grupo 3 (mayor de 50 años) (media=62,17; IC95% 60,7-63,6; n=147). Para el análisis de los resultados, se excluyeron las muestras de las pacientes en las que no hubo amplificación del gen control en el test de detección del VPH-ar.

La prevalencia de infección por VPH-ar en las pacientes del estudio se muestra en la tabla I. Las prevalencias de los distintos tipos de VPH-ar en función de las lesiones intraepiteliales escamosas se presentan en las tablas II, III y IV. En el grupo 1, el VPH16 se asoció al 63,6 % (7/11) de las lesiones H-SIL/CC. En el grupo 2, el VPH 16 se asoció al 43,8 % de las lesiones H-SIL/CC (14/32). En el grupo 3, se detectó un caso de VPH16 asociado a H-SIL/CC.

La prevalencia de EVB de desbalance del contenido vaginal (III, IV y V) en el grupo 1, fue la siguiente: subgrupo VPH negativas: 35,3 % (18/51); subgrupo VPH positivas sin lesión intraepitelial: 35,8 % (19/53; OR=1,02; $p=0,56$); subgrupo L-SIL: 52,2 % (12/23; OR=2,0; $p=0,13$) y subgrupo H-SIL/CC 72,7 % (8/11; OR=4,89; $p=0,03$).

La prevalencia de EVB de desbalance del contenido vaginal (III, IV y V) en el grupo 2 fue la siguiente: subgrupo VPH negativas: 35,8% (101/282); subgrupo VPH positivas sin lesión intraepitelial: 35,2 % (38/108; OR=0,99; $p=0,53$); subgrupo L-SIL: 55,9% (19/34; OR=2,28; $p=0,01$) y subgrupo H-SIL/CC 53,1% (17/32; OR=2,63; $p=0,05$).

La prevalencia de EVB de desbalance del contenido vaginal (III, IV y V) en el grupo 3 fue la siguiente: subgrupo VPH negativas: 20 % (20/100; subgrupo VPH positivas sin lesión intraepitelial: 24,3 % (9/37; $p=0,37$); subgrupo L-SIL: 16,7% (1/6; $p=0,66$). No se detectaron casos de desbalance en el grupo H-SIL/CC. Todos los grupos presentaron mayores prevalencias de VB (34,0 %, 31,1 % y 15,3 %) que de candidiasis (22,7 %, 21,2 % y 6,7 %) y de trichomoniasis (2,8 %, 3,6 % y 1,3 %), respectivamente, por lo que estas diferencias resultaron estadísticamente significativas para los tres grupos estudiados ($p = < 0,001$).

Tabla III. Prevalencia de los distintos tipos de virus del papiloma humano de alto riesgo, en función del grado de lesión intraepitelial escamosa en el grupo de 25-50 años.

	Sin lesión		LSIL		H-SIL/CC	
	N	%	N	%	N	%
VPH 16	26	6,7	9	26,5	14	43,8
VPH 18	3	0,8	2	5,9	0	0
VPH 45	3	0,8	0	0	0	0
VPH 31,33	17	4,3	4	11,8	3	9,4
VPH 52,58	11	2,8	3	8,8	2	6,2
VPH 66	6	1,5	1	2,9	0	0
Otros tipos	42	10,8	2	5,9	5	15,6
Negativo	282	72,3	13	38,2	8	25
TOTAL	390	100	34	100	32	100

► LSIL, lesión intraepitelial escamosa de bajo grado; H-SIL/CC, lesión intraepitelial escamosa de alto grado / carcinoma de cuello uterino; VPH, virus del papiloma humano.

La prevalencia de VB, candidiasis y trichomoniasis de acuerdo con el VPH-ar se observa en la tabla V.

El análisis de prevalencia de VB en el grupo 1 fue el siguiente: VPH-negativo 27,5 % (14/51); VPH positivo sin lesión 34,0 % (18/53; OR=1,35; p=0,24); L-SIL 43,5 % (10/23; OR=2,03; p=0,09); H-SIL/CC 54,5 % (6/11; OR=3,17; p=0,05), mientras que en el grupo 2 fue: VPH negativo 30,4 % (85/280); VPH positivo sin lesión 25 % (27/108; OR=0,69; p=0,07); L-SIL 52,9 % (18/34; OR=2,58; p=0,01); H-SIL/CC 43,7 % (14/32; OR=1,78; p=0,06). En el grupo 3, fue: VPH negativo 14 % (14/100); VPH positivo sin lesiones 18,9 % (7/37; OR=1,43; p=0,24); L-SIL 16,7 % (1/6; OR=1,53; p=0,34); no se detectaron casos de VB en pacientes con H-SIL/CC.

El análisis de prevalencia de candidiasis en el grupo 1 fue el siguiente: VPH negativo 25,5 % (13/51); VPH positivo sin lesión 28,3 % (15/53; OR=1,15; p=0,38); L-SIL 17,4 % (4/23; OR=0,62; p=0,23); no se detectaron casos de infección por candidiasis en pacientes H-SIL/CC. En el grupo 2, la prevalencia fue: VPH negativo 21,8 % (61/280); VPH positivo sin lesiones 25,9 % (28/108; OR=1,25; p=0,19); L-SIL 20,6 % (7/34; OR=0,93; p=0,45); H-SIL/CC 12,5 % (4/32; OR=0,51; p=0,11). En el grupo 3 fue: VPH negativo 8 % (8/100); VPH positivo sin lesiones 2,7 % (1/37; OR=0,32; p=0,15); L-SIL 16,7 % (1/6; OR=2,3; p=0,25); no se detectaron casos de infección por candidiasis en pacientes H-SIL/CC.

El análisis de prevalencia de trichomoniasis en el Grupo 1 fue: VPH negativo 5,9 % (3/51) y H-SIL/CC 9,1 % (1/11; OR=1,16; p=0,34). No se detectaron casos de infección por trichomoniasis en VPH positivos sin lesiones y L-SIL. En el grupo 2, la prevalencia fue: VPH negativo 2,6 % (10/280); VPH positivo sin lesiones 2,8 % (3/108; OR=0,77; p=0,37); L-SIL 11,8 % (4/34; OR=3,6; p=0,05); no se detectaron casos de infección por trichomoniasis en pacientes con H-SIL/CC. El grupo 3 fue VPH negativo 2 % (2/100). No se detectaron casos de infección por trichomonas en los otros grupos estudiados.

De 741 muestras totales del estudio, se detectó micro-

biota lactobacilar en 479 muestras (grupo 1 n=82; grupo 2 n=283 y grupo 3 n=114), de las cuales se pudieron caracterizar 253 lactobacilos cultivables. La frecuencia de las diferentes especies de lactobacilos encontradas en las pacientes del estudio, según el tipo de lesión por VPH se observa en la tabla VI. *Lactobacillus jensenii* presentó una prevalencia de 42,9 % en pacientes con H-SIL/CC, con respecto a un 24,8 % en el grupo control (OR=2,27; p=0,08). *Lactobacillus iners* presentó una prevalencia de 14,3 % en pacientes con H-SIL/CC, con respecto a un 4,1 % en el grupo control (OR=3,86; p=0,09). Las pacientes con H-SIL/CC tuvieron una prevalencia de 21,4 % de *L. crispatus*.

Discusión

Existe evidencia sólida de que la infección por VPH es necesaria, pero no, suficiente para el desarrollo del carcinoma de cuello uterino. Se han identificado más de 200 tipos de VPH, en la actualidad, 40 de los cuales están asociados a infecciones del tracto anogenital, y solamente algunos, con la carcinogénesis cervical (principalmente, el tipo VPH-16)²⁷. El principal factor en la carcinogénesis cervical es la infección transformante por VPH, aunque el resto de los factores permanecen sin dilucidar. Uno de los factores que ha cobrado mayor importancia actualmente es el microbioma que acompaña la infección por VPH.

Según González *et al*²⁸ refirieron, hay una prevalencia de la infección por VPH-ar en la Argentina, en adolescentes, de 42,2 %. En nuestro trabajo, el 57,2 % de las pacientes del grupo de 18-24 años tuvo infección por VPH-ar, al momento del reclutamiento. En cambio, la prevalencia en el grupo de mujeres 25-50 años fue de 33,6 % y en las mujeres mayores de 50 años, de 29,3 %.

En Latinoamérica y el Caribe, la prevalencia de VPH-16 en las pacientes con diagnóstico de H-SIL/CC histológico fue de 46,5 % y en la Argentina, del 48,5 %²⁹. En nuestra casuística, la prevalencia de VPH-16 en las pacientes con H-SIL/CC cervical

Tabla IV. Prevalencia de los distintos tipos virales de VPH de alto riesgo en función del grado de lesión intraepitelial escamosa en el grupo de mayores de 50 años.

	Sin lesión		LSIL		H-SIL/CC	
	N	%	N	%	N	%
VPH 16	7	5,0	1	16,7	1	100
VPH 18	5	3,6	0	0	0	0
VPH 45	2	1,4	0	0	0	0
VPH 31,33	0	0	1	16,7	0	0
VPH 52,58	2	1,4	0	0	0	0
VPH 66	4	2,8	0	0	0	0
Otros tipos	18	12,9	2	33,3	0	0
Negativo	102	72,9	2	33,3	0	0
TOTAL	140	100	6	100	1	100

► LSIL, lesión intraepitelial escamosa de bajo grado; H-SIL/CC: lesión intraepitelial escamosa de alto grado / carcinoma de cuello uterino; VPH, virus del papiloma humano.

fue de 63,6 % en el grupo 1 y de 43,8 % en el grupo 2.

La composición de la microbiota, a su vez, es influenciada por numerosos factores: la etnia es el principal factor intrínseco que se asocia con la composición del microbioma, tal es así que las mujeres caucásicas y asiáticas muestran mayor prevalencia de colonización por lactobacilos, en comparación con las hispánicas y afroamericanas³⁰.

El cáncer cervical es una enfermedad de larga data, y existen etapas previas a ella durante las cuales las condiciones del entorno cervical y vaginal como la acidez vaginal y el patrón de citoquinas, que transita desde un patrón proinflamatorio hasta finalmente conducir a un estado de inmunosupresión local, se modifican.

La literatura que explora la relación entre la vaginosis bacteriana y el VPH es consistente: los estudios longitudinales demuestran una mayor asociación de este patógeno con el aumento de la incidencia de la infección y disminución del *clearance* del VPH³¹.

Adicionalmente, se ha propuesto que el microambiente vaginal y el perfil de citoquinas juegan un rol en la generación de las lesiones intraepiteliales escamosas³¹. Por ejemplo, la infección por *Fusobacterium* spp. podría desempeñar un papel clave en el desarrollo de un microambiente inmunosupresor, caracterizado por citoquinas antiinflamatorias (perfil de citoquinas Th2) como IL-4 y TGF- β 1, en células de cuello uterino transformadas por VPH³², lo cual favorecería la evasión del sistema inmune y la persistencia de la infección³¹.

En el grupo 1 de este estudio, el 54,2 % de las pacientes infectadas por VPH-16 tuvieron una VB asociada. Esto puede deberse a que la infección por VPH puede alterar el metabolismo de la mucosa vaginal³³, la inmunidad del huésped³⁴ o ambos, lo que da lugar a cambios en la estructura del ecosistema vaginal. Lee *et al*³⁵ reportan que los epitelios vaginales infectados por VPH presentan una disminución en la producción de glucógeno, el cual es fuente de energía para los lactobacilos responsables de la disminución del pH vaginal. Las citoquinas proinflamatorias, las especies reactivas del oxígeno, la integración del ADN viral y la inflamación crónica que ocurren en la infección por VPH pueden provocar cambios en el entorno de la mucosa vaginal, lo que da lugar a cambios en la microbiota vaginal³⁶.

En la cohorte estudiada, todos los grupos etarios tenían una mayor prevalencia de VB que de candidiasis y trichomoniasis. Estos hallazgos también fueron informados por Abdul-Aziz *et al*.³⁷ en Yemen, quienes reportaron una prevalencia de VB del 27,2 %, de candidiasis del 6,8 % y de trichomoniasis del 0,9 % en pacientes en edad reproductiva, con un aumento en pacientes menores de 25 años del 39,6 % para VB y del 9,9 % para candidiasis. Sin embargo, dado que la prevalencia de infecciones por estos patógenos varía de un país a otro, Bucemi *et al*.³⁸ en Argentina, reportaron una prevalencia de VB de 25,6 % y de candidiasis de 17,4 %, mientras que Kamara *et al*.³⁹ en Jamaica, describieron una prevalencia de VB del 44,1 % de candidiasis del 30,7 % y de trichomoniasis del 18 %.

Tabla V. Prevalencia de vaginosis bacteriana, candidiasis y trichomoniasis en todos los grupos etarios de acuerdo con cada tipo de virus del papiloma humano de alto riesgo.

	Patógeno vaginal	VPH 16 (N = 24)		VPH 18 (N = 7)		VPH 45 (N = 0)		VPH 31, 33 (N = 14)		VPH 52, 58 (N = 9)		VPH 66 (N = 6)		Otros tipos (N = 19)		Negativo (N = 59)	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Grupo 1 18 - 24 años	Vaginosis bacteriana	13	54,2	3	42,9	0	-	3	21,4	1	11,1	1	16,7	8	42,1	19	32,2
	Candidiasis	2	8,3	2	28,6	0	-	6	42,9	1	11,1	1	11,1	7	36,8	13	22,0
	Trichomoniasis	1	4,2	0	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	3	5,1
Grupo 2 25 - 50 años	Vaginosis bacteriana	17	34,7	1	20	1	33,3	10	41,7	6	37,5	3	42,9	13	26,5	94	31,0
	Candidiasis	8	16,3	1	0	2	66,7	4	16,7	3	18,7	3	42,9	17	34,7	61	20,1
	Trichomoniasis	1	2,0	0	-	2	66,7	2	8,3	0	-	0	-	0	-	12	4,0
Grupo 3 Mayores de 50 años	Vaginosis bacteriana	2	22,2	1	20	0	-	0	-	0	-	2	50	3	15	15	14,4
	Candidiasis	0	-	0	-	0	-	1	100	0	-	1	25	0	-	8	7,7
	Trichomoniasis	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	2	1,9

► VPH, virus del papiloma humano.

La candidiasis es la infección fúngica más frecuente del tracto genital inferior, aunque en la mayoría de los casos se trata de una colonización asintomática. Sin embargo, hay algunas especies de levaduras altamente virulentas que causan la degradación de la membrana basal del epitelio vaginal con la consiguiente invasión endógena y la respuesta inflamatoria que la acompaña. Ese epitelio dañado favorece la entrada de otras ITS como el VPH. Estos hallazgos fueron observados por Kero *et al.*⁴⁰, quienes demostraron que la candidiasis puede ser un factor de riesgo para la adquisición de la infección por VPH, pero no para la persistencia viral. En nuestro estudio, debido a la baja prevalencia de candidiasis por tipo viral, no existe asociación entre el tipo específico de VPH-ar y este patógeno. En la literatura no se hace referencia a la asociación de candidiasis con un tipo específico de VPH-ar.

En el grupo 3, debido al reducido número de pacientes de la muestra, no se puede objetivar la relación entre VB, candidiasis y los diferentes tipos de VPH-ar. En nuestra casuística, encontramos una prevalencia baja de trichomoniasis (menos del 4%), por lo que no podría estar relacionada con ningún tipo de VPH-ar en particular. Esta baja prevalencia se debe a que se estudiaron poblaciones tanto sintomáticas como asintomáticas. Abdul Aziz *et al.*³⁷ informaron hallazgos similares y describieron una prevalencia de trichomoniasis del 0,9 %. En cambio, Kamara *et al.*³⁹ informaron una prevalencia de trichomoniasis del 18 %. Estas disparidades en la prevalencia podrían deberse a condiciones socioeconómicas distintas y a diferencias étnicas.

Audirac *et al.*³² demostraron por metagenómica que el microbioma vaginal es notablemente diferente en cada una de las etapas de la infección por VPH. Las pacientes con carcinoma cervical mostraron mayor predominio de microbiota

anaerobia en comparación con el control negativo, que tuvo mayor predominio de microbiota lactobacilar.

En nuestro estudio, las pacientes con H-SIL/CC presentaron una elevada prevalencia del desbalance del contenido vaginal: en el grupo 1 de 72,7 % y en el grupo 2 de 53,1 %. Resultados similares fueron descritos por Mitra *et al.*³⁶, quienes detectaron una disminución de la microbiota lactobacilar en el 33 % de las pacientes con H-SIL/CC y en el 40 % de las pacientes con carcinoma invasor. Estos hallazgos sugieren que la disminución de lactobacilos en las pacientes infectadas por VPH puede correlacionarse con la presencia de una enfermedad clínicamente significativa. Asimismo, Gillet *et al.*¹² demostraron que la presencia de VB en una paciente aumenta el riesgo 1,51 [IC95% 1,24-1,83; $p < 0,05$] de tener una lesión intraepitelial escamosa, indicando una asociación positiva entre las dos condiciones. En el grupo 3, debido al escaso número de pacientes con lesión L-SIL y H-SIL/CC, no se llegan a objetivar los mismos hallazgos que en los grupos 1 y 2 en relación a la microbiota vaginal.

En nuestro estudio, las pacientes con H-SIL/CC presentaron una elevada prevalencia de VB: en el grupo 1, de 54,5 % y en el 2, de 43,7 % y una baja prevalencia de candidiasis, respectivamente (0 y 12,5 %). Esta disminución de la prevalencia de candidiasis observada en las pacientes con H-SIL/CC puede deberse a la disminución de la microbiota lactobacilar registrada en este grupo de pacientes⁴¹.

Sabemos que la proteína E5 es fundamental para la replicación del VPH, sin embargo, esta molécula es muy sensible a los cambios de pH. Un medio ambiente de pH bajo, promovido por el ácido láctico puede considerarse protector. El ácido láctico es un compuesto quiral, con un isómero D y L. El isómero D es producido predominantemente por *L. crispatus*, *L.*

Tabla VI. Frecuencia de las diferentes especies de lactobacilos encontradas en las pacientes del estudio, según tipo de lesión del virus del papiloma humano relacionada.

Especie de <i>Lactobacillus</i>	VPH positivo sin lesión (N=76)	LSIL (N=18)	H-SIL/CC (N=14)	VPH negativo (Control) (N=145)
<i>L. crispatus</i>	19	7	3	34
<i>L. gasseri</i>	29	6	3	64
<i>L. jensenii</i>	20	4	6	36
<i>L. iners</i>	5	0	2	6
<i>L. vaginalis</i>	0	0	0	4
<i>L. salivarius</i>	2	0	0	1
<i>L. fermentum</i>	0	1	0	0
<i>L. paracasei</i>	1	0	0	0

► LSIL, lesión intraepitelial escamosa de bajo grado; H-SIL/CC, lesión intraepitelial escamosa de alto grado / carcinoma de cuello uterino; VPH, virus del papiloma humano.

jensenii y *L. gasseri*. Sin embargo, el isómero L es producido por *L. iners*, el epitelio vaginal *per se* y bacterias anaerobias responsables de la vaginosis. El isómero D producido por *L. crispatus* aumenta la viscosidad del moco cervical, lo cual es un factor de protección adicional³⁶. El subgrupo H-SIL/CC presentó una disminución en la prevalencia de *L. crispatus* (21,4%), en coincidencia con lo descrito por Gao *et al.*⁷ para la población asiática y por Dareng *et al.*⁴² para la población africana. Asimismo, en nuestro trabajo, se observó una alta prevalencia de *L. jensenii* (42,9%), lo cual predispondría a estas pacientes a la disfunción vaginal.

Estos resultados se corresponden con los descritos por Clarke *et al.*⁴³, quienes relataron que la elevación del pH se asociaba con un mayor riesgo de infección por VPH, dado que se observó que *L. crispatus* es capaz de acidificar el medio vaginal a un pH menor que 4,0, mientras que otros como *L. gasseri* alcanzan un pH más elevado que oscila entre 4,4 y 5,0³⁶.

Como conclusión, se detectó una elevada prevalencia de infección por VPH-ar en el grupo de 18-24 años. El VPH-16 fue el tipo más prevalente tanto en este grupo como en el de 25-50 años. Se observó mayor desbalance de la microbiota vaginal en las pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas que en los controles en el grupo de 18-24 años y el grupo de 25-50 años, especialmente, en el grupo de H-SIL/CC, donde se encontró una baja prevalencia de *L. crispatus* (especie protectora) y un incremento de *L. jensenii* y *L. iners*, especies que poseen un menor rol protector de la disfunción vaginal. Por lo tanto, es importante caracterizar las especies de lactobacilos, dado que el incremento de las no protectoras, en concordancia con el incremento de VB en este grupo de pacientes, alteran el microambiente vaginal, actúan como potenciales cofactores en la persistencia de una infección por VPH e incrementan el riesgo de adquirir otras infecciones de transmisión sexual.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

Referencias Bibliográficas

- Ma B, Forney LJ, Ravel J. Vaginal microbiome: rethinking health and disease. *Annu Rev Microbiol* 2012; 66: 371-89.
- Muhleisen AL, Herbst-Kralovetz MM. Menopause and the vaginal microbiome. *Maturitas* 2016; 91:42-50.
- Petricevic L, Domig KJ, Nierscher FJ, Krondorfer I, Janitschek C, Kneifel W, *et al.* Characterization of the oral, vaginal and rectal Lactobacillus flora in healthy pregnant and postmenopausal women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012; 160(1):93-9.
- Cauci S, Driussi S, De Santo D, Penacchioni P, Iannicelli T, Lanzafame P, *et al.* Prevalence of bacterial vaginosis and vaginal flora changes in peri- and postmenopausal women. *J Clin Microbiol* 2002; 40(6):2147-52.
- Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, *et al.* Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108 Suppl 1(Suppl 1):4680-7. Kaur M. Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: a critical review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*.2020;19(1):5.
- Behbakht K, Friedman J, Heimler I, Aroutcheva A, Simoes J, Faro S. Role of the vaginal microbiological ecosystem and cytokine profile in the promotion of cervical dysplasia: a case-control study. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2002;10(4):181-6.
- Gao W, Weng J, Gao Y, Chen X. Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 2013; 13:271.
- Champer M, Wong AM, Champer J, Brito IL, Messer PW, Hou JY, *et al.* The role of the vaginal microbiome in gynaecological cancer. *BJOG* 2018; 125(3):309-15.
- Moscicki AB. Human papillomavirus disease and vaccines in adolescents. *Adolesc Med State Art Rev* 2010 ;21(2):347-63, x-xi.
- Silva J, Cerqueira F, Medeiros R. Chlamydia trachomatis infection: implications for HPV status and cervical cancer. *Arch Gynecol Obstet* 2014; 289(4):715-23.
- Oh HY, Kim BS, Seo SS, Kong JS, Lee JK, Park SY, *et al.* The association of uterine cervical microbiota with an increased risk for cervical intraepithelial neoplasia in Korea. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21(7):674.e1-9.
- Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, Bosire C, De Sutter P, Temmerman M, *et al.* Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2011; 11:10.
- Seo SS, Oh HY, Lee JK, Kong JS, Lee DO, Kim MK. Combined effect of diet and cervical microbiome on the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Nutr* 2016; 35(6):1434-41.
- Guo YL, You K, Qiao J, Zhao YM, Geng L. Bacterial vaginosis is conducive to the persistence of HPV infection. *Int J STD AIDS* 2012; 23(8):581-4.
- Vriend HJ, Bogaards JA, van Bergen JE, Brink AA, van den Broek IV, Hoebe CJ, *et al.* Incidence and persistence of carcinogenic genital human papillomavirus infections in young women with or without *Chlamydia trachomatis* co-infection. *Cancer Med* 2015;4(10):1589-98.
- Torres-Poveda K, Bahena-Román M, Madrid-González C, Burguete-García AI, Bermúdez-Morales VH, Peralta-Zaragoza O, *et al.* Role of IL-10 and TGF- β 1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. *World J Clin Oncol* 2014;5(4):753-63.
- Bornstein J, Bentley J, Bösze P, Girardi F, Haefner H, Menton M, *et al.* 2011 Colposcopic terminology of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. *Obstet Gynecol* 2012;120(1):166-72.
- Nayar R, Wilbur DC. The Pap test and Bethesda 2014. *Cancer Cytopathol* 2015; 123(5):271-81.
- Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, *et al.* The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136(10):1266-97.
- Poch F, Levin D, Levin S, Dan M. Modified thioglycolate medium: a simple and reliable means for detection of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1996; 34(10):2630-1.
- Perazzi BE, Menghi CI, Coppolillo EF, Gatta C, Eliseth MC, de Torres RA, *et al.* Prevalence and comparison of diagnostic methods for *Trichomonas vaginalis* infection in pregnant women in Argentina. *Korean J Parasitol* 2010; 48(1):61-5.
- Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol*. 1991;29(2):297-301. Proyecto BACOVA, Programa PROSAR, Fundación Bioquímica Argentina. Manual de Procedimientos BACOVA 2012. Disponible en: <http://www.fba.org.ar/PROSAR>
- Jorgensen JH, Pfaller MA, Carrol KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, Warnock DW, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th edition. Washington DC, ASM Press, 2015.
- Karas M, Krüger R. Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism. *Chem Rev*. 2003; 103(2):427-40.
- Tang YW, Lozano L, Chen X, Querec TD, Katabi N, Moreno-Docón A, *et al.* An Isothermal, Multiplex Amplification Assay for Detection and Genotyping of Human Papillomaviruses in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *J Mol Diagn* 2020; 22(3):419-28.
- Kyrgiou M, Mitra A, Moscicki AB. Does the vaginal microbiota play a role in the development of cervical cancer? *Transl Res* 2017; 179:168-82.
- González JV, Deluca GD, Liotta DJ, Correa RM, Basiletti JA, Colucci MC,

- et al; MALBRAN HPV Surveillance Study Group. Baseline prevalence and type distribution of Human papillomavirus in sexually active non-vaccinated adolescent girls from Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2021; 53(1):11-9.
28. Ciapponi A, Bardach A, Glujovsky D, Gibbons L, Picconi MA. Type-specific HPV prevalence in cervical cancer and high-grade lesions in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2011; 6(10):e25493.
29. Mitra A, MacIntyre DA, Marchesi JR, Lee YS, Bennett PR, Kyrgiou M. The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where are we going next? *Microbiome* 2016; (1):58.
30. Lewis FMT, Bernstein KT, Aral SO. Vaginal Microbiome and Its Relationship to Behavior, Sexual Health, and Sexually Transmitted Diseases. *Obstet Gynecol* 2017; 129(4):643-54.
31. Audirac-Chalifour A, Torres-Poveda K, Bahena-Román M, Téllez-Sosa J, Martínez-Barnetche J, Cortina-Ceballos B, López-Estrada G, Delgado-Romero K, Burguete-García AI, Cantú D, García-Carrancá A, Madrid-Marina V. Cervical Microbiome and Cytokine Profile at Various Stages of Cervical Cancer: A Pilot Study. *PLoS One* 2016; 11(4):e0153274.
32. Hillier SL, Lau RJ. Vaginal microflora in postmenopausal women who have not received estrogen replacement therapy. *Clin Infect Dis* 1997;25 Suppl S123-6.
33. Scott M, Stites DP, Moscicki AB. Th1 cytokine patterns in cervical human papillomavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6(5):751-5.
34. Lee JE, Lee S, Lee H, Song YM, Lee K, Han MJ, et al. Association of the vaginal microbiota with human papillomavirus infection in a Korean twin cohort. *PLoS One* 2013; 8(5):e63514.
35. Mitra A, MacIntyre DA, Lee YS, Smith A, Marchesi JR, Lehne B, et al. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. *Sci Rep* 2015; 5:16865.
36. Abdul-Aziz M, Mahdy MAK, Abdul-Ghani R, Alhilali NA, Al-Mujahed LKA, Alabsi SA, et al. Bacterial vaginosis, vulvovaginal candidiasis and trichomonal vaginitis among reproductive-aged women seeking primary healthcare in Sana'a city, Yemen. *BMC Infect Dis* 2019;19(1):879.
37. Buscemi L, Arechavala A, Negroni R. Estudio de las vulvovaginitis agudas en pacientes adultas, sexualmente activas, con especial referencia a la candidiasis, en pacientes del hospital de infecciosas Francisco J. Muñiz [Study of acute vulvovaginitis in sexually active adult women, with special reference to candidosis, in patients of the Francisco J. Muñiz Infectious Diseases Hospital]. *Rev Iberoam Micol* 2004; 21(4):177-81.
38. Kamara P, Hylton-Kong T, Brathwaite A, Del Rosario GR, Kristensen S, Patrick N, et al. Vaginal infections in pregnant women in Jamaica: prevalence and risk factors. *Int J STD AIDS* 2000; 11(8):516-20.
39. Kero K, Rautava J, Syrjänen K, Grenman S, Syrjänen S. Association of asymptomatic bacterial vaginosis with persistence of female genital human papillomavirus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017; 36(11):2215-9.
40. Murta EF, Souza MA, Araújo Júnior E, Adad SJ. Incidence of *Gardnerella vaginalis*, *Candida* sp. and human papilloma virus in cytological smears. *Sao Paulo Med J* 2000;118(4):105-8.
41. Dareng EO, Ma B, Famooto AO, Akarolo-Anthony SN, Offiong RA, Olaniyan O, Dakum PS, et al. Prevalent high-risk HPV infection and vaginal microbiota in Nigerian women. *Epidemiol Infect* 2016;144:123-37
42. Clarke MA, Rodriguez AC, Gage JC, Herrero R, Hildesheim A, Wacholder S, et al. A large, population-based study of age-related associations between vaginal pH and human papillomavirus infection. *BMC Infect Dis* 2012; 12:33.