

Evaluación de la asociación de la microbiota vaginal en semana 11 a 13 de embarazo con el parto prematuro espontáneo en una cohorte de gestantes de la zona metropolitana de Bucaramanga.

Eliana Marcela Mora Guevara

Trabajo de Grado para Optar al Título de Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas

Director

Bladimiro Rincón Orozco

Doctor en Ciencias Naturales

Codirector

María Carolina Velásquez Martínez

Doctora en Fisiología Humana

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Medicina

Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

Bucaramanga

2024

Agradecimientos

Agradezco a mi familia por todo el amor y el apoyo que me han dado para cumplir cada meta propuesta.

A mi mamá y hermana por ser mi soporte e inspiración, mis ganas de salir adelante y mejorar cada día. Este logro es por ustedes. Las amo.

Al laboratorio GEMEICA de la UIS por darme la oportunidad de formarme profesional y académicamente durante todos estos años.

A mi director de tesis el Dr. Bladimiro Rincón por dirigirme en este trabajo, por darme la oportunidad de trabajar en su equipo desde que estaba en el pregrado. Agradezco todo lo aprendido y el crecimiento a nivel profesional que pude tener.

A mi codirectora de tesis la Dra. María Carolina Velásquez y los evaluadores el Dr. Jezid Miranda y el Dr. Edinson Puentes por ayudar a mejorar el trabajo con sus sugerencias y seguimiento.

Al Dr. Carlos Becerra por guiarme y enseñarme tanto de este tema tan bonito, e inspirarme a siempre hacer las cosas de la mejor manera. Estoy profundamente agradecida por la oportunidad de trabajar de la mano en cada uno de los proyectos desarrollados.

A la Dra. Ruth Aralí Martínez por acompañarme en el análisis estadístico de mis resultados, que de no ser por su ayuda nada de esto hubiera sido posible.

A mis amigos del pregrado, Cami, Tefa, Eli, Stefy, Mao y Juli, que en el camino se convirtieron en mi segunda familia y me han ayudado a construir una mejor versión de mí, capaz de culminar este sueño.

A mis amigos del trabajo, Kari, Natha, Brayan, Oscar y Aleja que sin su apoyo en el laboratorio con todo el trabajo que se debía cumplir no hubiera podido culminar esta meta en el tiempo planeado.

A kari y Natha especialmente por volverse el apoyo más grande y las amigas más incondicionales, que estuvieron alentándome en cada momento difícil e impulsándome para que diera lo mejor de mí. Las amo.

A los amigos que me encontré en el camino, Andrés y Alejo que terminaron siendo una gran apoyo para terminar de analizar los datos de mi tesis. Gracias por todo.

Finalmente, a la Universidad Industrial de Santander por haberme formado como profesional y ser una de las mejores experiencias de vida.

Tabla de contenido

Introducción.....	10
2 Planteamiento del problema y justificación	13
3 Marco teórico y estado del arte.....	17
3.1 Factores de riesgo del PP	18
3.2 Fisiopatología del Parto Prematuro	20
3.3 Microbiota.....	22
3.4 Microbiota vaginal.....	24
3.5 Microbiota vaginal y embarazo.....	27
3.6 Microbiota vaginal y PP.....	28
4 Objetivos	33
4.1 Objetivo General:	33
4.2 Objetivos Específicos:.....	33
5 Metodología	34
5.1 Tipo de estudio.....	34
5.2 Población objeto	34
5.3 Obtención de las participantes	34
5.4 Extracción de ADN a partir de muestra cervicovaginal.....	35
5.5 Construcción de librerías y secuenciación de la región V3/V4 del gen 16S rRNA por Illumina	36

EVALUACIÓN DE LA MICROBIOTA VAGINAL EN EL EMBARAZO	5
5.6 Análisis bioinformático de los datos obtenidos por Illumina.....	36
5.7 Análisis de abundancia y diversidades de la microbiota vaginal.	37
5.8 Análisis estadístico.	38
5.9 Construcción de librerías y secuenciación del gen 16S rRNA por Oxford Nanopore.....	39
5.10 Análisis bioinformático y estadístico de los datos obtenidos por Oxford Nanopore.	39
6 Resultados.....	40
6.1 Descripción de la cohorte y variables sociodemográficas y clínicas	40
6.2 Abundancias relativas de géneros y especies e índices de diversidades de la microbiota vaginal	42
6.2.1 Abundancias relativas de géneros y especies.....	42
6.2.2 Diversidades alfa y beta.....	51
6.3 Tipos de estado comunitario (CSTs) de la microbiota vaginal.	53
6.4 Comparación de la de la abundancia, las diversidades y los CSTs entre las mujeres con y sin parto prematuro espontáneo.....	54
6.5 Comparación de resultados obtenidos con dos tecnologías de NGS diferentes.	58
7 Discusión	60
8 Conclusiones	67
Referencias bibliográficas	68

Lista de figuras

Figura 1 Comunidades bacterianas por etnia	26
Figura 2 Porcentaje de abundancia relativa de las 10 especies más abundantes en la microbiota vaginal en los grupos caso (PPE) y control (PT).....	44
Figura 3. Abundancias relativas de <i>L. crispatus</i> y <i>L. iners</i> en los grupos PPE temprano (< 34 semanas), PPE tardío (> 34 semanas) y PT (> 37 semanas).	48
Figura 4. Abundancia relativa de especies de la microbiota vaginal clasificada por variables.....	50
Figura 5. Índices de diversidad alfa para el grupo de PPE y PT	52
Figura 6. Diversidad beta por índice de disimilitud de Bray Curtis representada en un análisis de coordenadas principales (PcoA).....	52
Figura 7. Perfiles de microbiota vaginal de mujeres que tuvieron PPE y PT representados en CSTs.....	54
Figura 8. Abundancias relativas entre la tecnología de Oxford Nanopore e Illumina.	58
Figura 9. Similitud de las abundancias relativas entre la tecnología de Oxford Nanopore e Illumina.	59

Lista de tablas

Tabla 1. Descripción de las características sociodemográficas, clínicas y del parto de las pacientes incluidas en el estudio en los grupos de PPE y PT.....	41
Tabla 2. Géneros y especies más abundantes en la microbiota vaginal de mujeres con PP (casos) y PT (controles).....	43
Tabla 3. Mediana y rango intercuartil (RIQ) de las abundancias relativas de las especies más representativas de la microbiota vaginal por caso y control.....	45
Tabla 4. Presencia de cada especie en los grupos de PPE (caso) y PT (control)	46
Tabla 5. Presencia de especies con baja abundancia en los grupos de PPE (caso) y PT (control).....	47
Tabla 6. Abundancias relativas de las especies representativas de la microbiota vaginal por grupos PPE temprano (<34 semanas), PPE tardío (>34 semanas) y PT (>37 semanas).....	49
Tabla 7. Asociación de las variables clínicas de las participantes incluidas con el PPE.	56
Tabla 8. Asociación entre la abundancia relativa de las especies que conforman la microbiota vaginal con el PPE.....	56
Tabla 9. Asociación entre la presencia de las especies que conforman la microbiota vaginal con el PPE.	57

Resumen

Título: Evaluación de la asociación de la microbiota vaginal en semana 11 a 13 de embarazo con el parto prematuro espontáneo en una cohorte de gestantes de la zona metropolitana de Bucaramanga.*

Autor: Eliana Marcela Mora Guevara.^{†‡}

Palabras clave: Microbiota vaginal, Lactobacillus, Parto Prematuro Espontáneo, Secuenciación de Nueva Generación.

Descripción:

El parto prematuro espontáneo (PE) es considerado un síndrome ocasionado por múltiples mecanismos. Actualmente, no se cuenta con herramientas para identificar a las mujeres con posible riesgo PPE. La microbiota desempeña un papel importante en la salud vaginal y el embarazo. Su alteración puede llevar a otros desenlaces perinatales adversos con mayor frecuencia como preeclampsia y corioamnionitis además riesgo de otras infecciones de tipo de transmisión sexual. El presente estudio evaluó la asociación de la microbiota vaginal en semana 11 a 13 de embarazo con el parto prematuro. se extrajo ADN a partir de muestras cervicovaginales, se amplificaron las regiones V3-V4 del gen 16S rRNA y se secuenció usando la plataforma Illumina MiSeq/NextSeq 1000/2000.

Los resultados mostraron que tanto los casos de PPE como los de parto a término PT tenían una microbiota dominada por el género *Lactobacillus*, principalmente por las especies *L. crispatus* y *L. iners*. El 20% restante de la composición de la microbiota correspondía bacterias anaerobias como *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *P. amnii* y *Snethia sp.* La subclasificación del parto prematuro menor a 34 semanas mostró una mayor abundancia relativa de *L. iners* en comparación con los demás grupos.

* Trabajo de grado

† Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director: Bladimiro Rincón Orozco. Doctor en Ciencias Naturales. Codirector: María Carolina Velásquez Martínez. Doctora en Fisiología Humana.

Abstract

Title: Evaluation of the Association between Vaginal Microbiota at 11 to 13 Weeks of Pregnancy and Spontaneous Preterm Birth in a Cohort of Pregnant Women from the Metropolitan Area of Bucaramanga.[§]

Author: Eliana Marcela Mora Guevara.**

Keywords: Vaginal Microbiota, Lactobacillus, Spontaneous Preterm Birth, Next-Generation Sequencing.

Description:

Spontaneous preterm birth (PTB) is considered a syndrome caused by multiple mechanisms. Currently, there are no tools to identify women at potential risk for PTB. The microbiota plays an important role in vaginal health and pregnancy. Its alteration can lead to other adverse perinatal outcomes, more frequently including preeclampsia and chorioamnionitis, as well as an increased risk of sexually transmitted infections. This study evaluated the association between vaginal microbiota at 11 to 13 weeks of pregnancy and preterm birth. DNA was extracted from cervicovaginal samples, the V3-V4 regions of the 16S rRNA gene were amplified, and sequencing was performed using the Illumina MiSeq/NextSeq 1000/2000 platform.

The results showed that both PTB and full-term (FT) cases had a microbiota dominated by the genus *Lactobacillus*, primarily by the species *L. crispatus* and *L. iners*. The remaining 20% of the microbiota composition included anaerobic bacteria such as *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *P. amnii*, and *Snethia* sp. The sub-classification of preterm births before 34 weeks revealed a higher relative abundance of *L. iners* compared to other groups.

[§] Degree Work

**Faculty of Health. School of Medicine. Master's in Basic Biomedical Sciences. Director: Bladimiro Rincón Orozco. Doctor in Natural Sciences. Co-director María Carolina Velásquez Martínez Doctor of Human Physiology

Introducción

El parto prematuro (PP) es considerado como un problema de salud pública global (Barfield, 2018). Se estima que el 11,1% de los nacimientos a nivel mundial se da antes de las 37 semanas y, hasta el momento, no se ha logrado disminuir su incidencia de manera significativa (Blencowe et al., 2012; Chawanpaiboon et al., 2019; Walani, 2020). El PP es la principal causa de muerte en niños menores de cinco años, representando el 70% de las muertes neonatales en el mundo (Couceiro et al., 2021), y un factor de riesgo que tiene un impacto en la salud, el bienestar y el desarrollo en la vida adulta (Vogel et al., 2018) (5). En Colombia, entre 2018 y 2022 el porcentaje de nacimientos menor a 37 semanas completas alcanzó el 11% (Dane, 2023). Aunque la atención y los cuidados a recién nacidos prematuros ha mejorado considerablemente (Barfield, 2018), en nuestro país la prematuridad sigue siendo la segunda causa de muerte perinatal y neonatal tardía (Instituto Nacional de Salud, 2023)

El parto prematuro espontáneo (PPE) es considerado como un síndrome ocasionado por múltiples mecanismos como la isquemia uteroplacentaria, sobredistensión uterina, senescencia decidual, interrupción de la tolerancia materna, disminución de la acción de progesterona y la infección e inflamación, razón por la se ha dificultado su detección y, a su vez, la creación de una herramienta diagnóstica (23, 33). (Goldenberg et al., 2008; R. Romero et al., 2006)

Actualmente, solo se cuenta con el antecedente de PP y la cervicometría medida en el segundo trimestre del embarazo como herramientas para identificar a las mujeres con posible riesgo de PPE. Sin embargo, estos factores sólo alcanzan a identificar el 40% de todas las gestantes y de estas, solo el 38% responden al tratamiento, logrando impactar solo un 10% de los casos.

Numerosas investigaciones se han enfocado en la búsqueda de marcadores bioquímicos involucrados en la patogénesis de este síndrome, que permitan realizar una identificación temprana del riesgo de PPE (Cook et al., 2019; DiGiulio et al., 2015; D’Silva et al., 2018; Lockwood et al., 1991; Peter Van Dorsten et al., 1996); no obstante, ninguno de los candidatos planteados ha demostrado tener una adecuada capacidad para identificar los cambios que conllevan a un PPE, más allá de las cifras mostradas por las medidas clásicas de longitud cervical y antecedente de PP (Son & Miller, 2017).

Dentro de los componentes más estudiados se encuentra la microbiota vaginal, la cual se ha logrado caracterizar en diferentes grupos de mujeres de forma eficiente con las tecnologías de secuenciación de nueva generación disponibles. Los principales resultados obtenidos sugieren que una alteración de esta microbiota vaginal podría estar relacionada con un aumento en el riesgo de presentar un PPE y aunque se cuenta con múltiples estudios sobre el tema, la heterogeneidad de los resultados obtenidos ha impedido que puedan ser usados como herramienta de identificación y diagnóstico (B. J. Callahan et al., 2017; DiGiulio et al., 2015; Romero et al., 2014; Shi et al., 2020). Esto puede relacionarse con las características propias del diseño de los estudios realizados, con diferencias en variables como el tamaño de la muestra, la edad gestacional evaluada, la etnia de las pacientes (R. Romero et al., 2014; Sun et al., 2022) y las tecnologías de secuenciación y análisis de datos implementadas (Peelen et al., 2019).

La etnia es uno de los factores determinantes de la composición de la microbiota vaginal y la mayoría de las investigaciones que se han llevado a cabo, han sido realizadas en mujeres afrodescendientes y blancas. La información en población hispana es muy limitada y, en Colombia, no se cuenta con información de la composición de la microbiota vaginal.

Es necesario, por tanto, realizar más investigación para esclarecer la asociación entre la modificación de la microbiota vaginal durante el embarazo con el desenlace de PPE, y para identificar biomarcadores más eficientes, que se puedan detectar en etapas tempranas de la gestación y en el diferencial de la composición microbiota vaginal.

Por tanto, esta propuesta tiene como objetivo evaluar la asociación de la microbiota vaginal en semana 11 a 13 de embarazo con el parto prematuro espontáneo en una cohorte de gestantes de la zona metropolitana de Bucaramanga.

2 Planteamiento del problema y justificación

El PP es una prioridad de salud pública mundial (Barfield, 2018). La Organización Mundial de la Salud (OMS) lo define como el nacimiento que se da antes de completar las 37 semanas de gestación. Se ha estimado que 15 millones de niños nacen en esta condición cada año y aproximadamente 1 millón de estos niños mueren por complicaciones relacionadas con la prematuridad (World Health Organization, 2020). Es considerado como la principal causa de muerte neonatal, la segunda causa de muerte en niños menores de 5 años (Blencowe et al., 2012). El PP está asociado con un mayor riesgo de complicaciones a corto plazo debido a la inmadurez de los múltiples sistemas, así como a los efectos en el desarrollo neurológico como la parálisis cerebral, problemas de aprendizaje y problemas de visión y audición (Mwaniki et al., 2012)

Según la edad gestacional del recién nacido, la prematuridad se puede clasificar como, extremadamente prematuro en aquellos bebés que nacen antes de las 28 semanas, prematuro los que nacen entre la semana 28 a 32 y, prematuro moderado a tardío los nacidos entre la semana 32 a 36. Estas subdivisiones tienen importancia clínica dado que a menor edad gestacional hay un aumento de la mortalidad, la discapacidad y la intensidad de la atención neonatal requerida (Blencowe et al., 2012).

En Colombia, según publicaciones referidas por el DANE, a nivel nacional, entre 2018 y 2022 se observó una tasa de nacimientos pretérmino creciente llegando hasta el 11%. En general, se pudo observar un incremento en la tasa de nacimientos pretérmino por cada 1.000 nacidos

vivos en todos los departamentos, con Atlántico como el que presentó el aumento más alto en la tasa de nacimientos pretérmino del país en ese periodo de tiempo. Según los grupos de edad de la madre, existe una mayor proporción de nacimientos pretérmino en mujeres entre el rango de 10 a 14 años o entre 45 y 49 años. Además, se evidencia a partir de los 30 años de edad, un crecimiento progresivo en la proporción de nacimientos pretérmino (Dane, 2023) Es importante destacar que estas cifras no discriminan entre los casos que son PPE de aquellos que son indicados, y que no se cuenta con una cifra real de nacimientos prematuros espontáneos en el país.

El Instituto Nacional de Salud de Colombia, en su boletín epidemiológico de la semana 30 del 2023, se reportó una razón de mortalidad perinatal y neonatal tardía de 12.2 muertes por cada 1.000 nacidos vivos, superior a la del año anterior y dentro de las causas, la prematuridad-inmaturidad sigue siendo la segunda más frecuente después de los trastornos de origen perinatal y placentarios (Instituto Nacional de Salud, 2023). La implementación de una atención de apoyo y cuidados intensivos neonatales son determinantes para garantizar la supervivencia del recién nacido y disminuir el riesgo de complicaciones y secuelas a largo plazo. La capacidad de estos cuidados está muy asociada con el nivel socio-económico del país, y aquellos con ingresos bajos, solo el 10% de los niños que nacen antes de las 28 semanas de gestación sobreviven, mientras que en los países con altos ingresos más del 90% de estos niños sobreviven (Blencowe et al., 2012)

El PP, al ser considerado como un síndrome obstétrico con múltiples etiologías, dificulta su comprensión y las posibles estrategias para su diagnóstico, prevención y tratamiento (R.

Romero et al., 2006). La comunidad científica ha enfocado sus esfuerzos en la búsqueda de indicadores clínicos y marcadores biológicos a partir de los mecanismos involucrados en el PPE, que permitan una identificación temprana de las pacientes que puedan presentar un PPE. De toda la investigación realizada, ninguna molécula de las propuestas ha sido útil para detectar gestantes asintomáticas en riesgo de un PPE, porque no han demostrado tener la suficiente sensibilidad para detectar a todas las pacientes en riesgo.

Dentro de las medidas ecográficas que evalúan las características del cuello del útero y que permiten identificar pacientes que pueden presentar un PPE, la cuantificación de la longitud del cuello del útero (LC) es la de mejor rendimiento, (Peter Van Dorsten et al., 1996) demostrando que aquellas gestantes con una LC menor a 25 mm tienen un riesgo cercano al 30% de presentar un parto antes de las 37 semanas, Sin embargo, estudios que han realizado análisis sobre esta técnica han determinado que su sensibilidad solo llega hasta el 37,3% (Son & Miller, 2017). La fibronectina fue uno de los primeros marcadores biológicos que se propusieron para el tamizaje del riesgo de PP (Lockwood et al., 1991), no obstante, no ha demostrado tener un valor predictivo negativo confiable, y en ausencia de su detección, el riesgo de PP no cambia significativamente (Carvajal et al., 2017). Actualmente la medición de la fibronectina sirve principalmente en aquellas pacientes que han iniciado el trabajo de parto (Son & Miller, 2017).

La microbiota desempeña un papel importante en la salud vaginal y el embarazo. Su alteración puede llevar a otros desenlaces perinatales adversos con mayor frecuencia como preeclampsia y corioamnionitis además riesgo de otras infecciones de tipo de transmisión sexual. Los estudios que evalúan la composición diferencial de la microbiota vaginal en mujeres con PPE

han sido contradictorios. El último metaanálisis publicado en 2022 que reúne artículos entre el 2015 a 2022, concluye que la presencia de *L. crispatus* desempeña un papel protector para el PPE y por el contrario, la disminución de las especies de *Lactobacillus* incrementa el riesgo de PP (OR 1.69, 95% CI 1.15–2.49) (Gudnadottir et al., 2022).

En Colombia no se cuenta con información sobre la dinámica de la microbiota vaginal en mujeres gestantes y cuál es su posible asociación con el PP. Los pocos estudios publicados están enfocados en la detección de infecciones vaginales tipo Vaginitis o Vaginosis Bacteriana (VB), usando técnicas de cultivo y microscopía convencional para hacer el diagnóstico (Gómez-Rodríguez et al., 2019; Tamayo et al., 2016; Vivaset al., 2020). El desarrollo de tecnologías de secuenciación de segunda generación que han sido mejoradas con el paso del tiempo y el surgimiento de las tecnologías de tercera generación, han demostrado tener una mejor resolución en los resultados para la caracterización de comunidades microbianas que habitan diferentes partes de nuestro organismo. La falta de información sobre la composición de la microbiota vaginal en nuestra población demuestra la importancia de realizar estudios que nos brindan conocimiento sobre su estructura y dinámica en población gestante de nuestra región y confirmar con resultados de otros estudios las semejanzas y diferencias. Mientras más conocimiento exista sobre el tema, más fácil será a futuro integrar la información para identificar de manera temprana pacientes con riesgo de un PP.

Por tal razón, se hace pertinente continuar en la búsqueda de nueva información que respalde y confirme que el cambio en la composición de la microbiota vaginal durante el embarazo puede asociarse al desenlace de PPE, implementando las tecnologías de secuenciación disponibles.

Pregunta de investigación: ¿La composición de la microbiota vaginal durante el primer trimestre del embarazo en población gestante de la zona metropolitana de Bucaramanga está asociada con el del parto prematuro espontáneo?

3 Marco teórico y estado del arte

La definición de PP es dada por la OMS como aquellos recién nacidos vivos antes de las 37 semanas de embarazo (World Health Organization, 2020). En el 2010 se logró estimar aproximadamente 15 millones de nacimientos prematuros en todo el mundo, correspondiente a un índice global de natalidad del 11% (Blencowe et al., 2012). Se determinó que la incidencia de los casos estaba relacionada con el ingreso económico de los países y aquellos que tenían ingresos más bajos mostraban un índice de nacimientos prematuros más alto (11,8%), mientras que para los países con ingresos medios y altos los índices eran inferiores (9,4% y 9.3% respectivamente), con excepción de Estados Unidos y Australia que mostraron altos índices de nacimientos prematuros. Las regiones con las tasas de nacimientos prematuros más altas para ese año fueron el sudeste asiático, el sur de Asia y África subsahariana. La información sobre los casos de PP en Latinoamérica es limitada, sin embargo, se logró determinar que el porcentaje de nacimientos prematuros fue del 8,4%, con Brasil como uno de los países con más casos (9,2%) (Blencowe et al., 2012). Para el 2014 se encontró que la tendencia de nacimientos prematuros aumentó hasta el 10,6% en comparación con los años anteriores (Chawanpaiboon et al., 2019)

De todos los casos de partos pretérmino, aproximadamente 1 millón de neonatos mueren cada año, convirtiéndose en una de las principales causas de mortalidad infantil (unicef, 2023), asociadas principalmente al compromiso de diferentes sistemas orgánicos que aumentan el

riesgo de sufrir morbilidad a largo plazo y resultados adversos del desarrollo neurológico como déficits motor, neurosensorial, cognitivo y de conducta (Barfield, 2018).

Según la edad gestacional del recién nacido, la prematuridad se puede clasificar como extremadamente prematuro aquellos neonatos que nacen antes de las 28 semanas, prematuro moderado los que nacen entre semana 28⁺⁰ a 31⁺⁶ y prematuro tardío los nacidos entre semana 32⁺⁰ a 36⁺⁶ (World Health Organization, 2020). La mayor proporción de los PP son tardíos, alrededor del 10% nacen entre las 28⁺⁰ a 31⁺⁶ semanas y solo el 5% de los casos nacen antes de las 28 semanas de gestación (Walani, 2020). El PP también se puede clasificar según la presentación clínica en PP espontáneo (PPE), que se da cuando hay una ruptura prematura de membranas (RPM), por el inicio del trabajo de parto con dilatación cervical, o PP inducido que son aquellos que son iniciados por el personal médico por complicaciones maternas o fetales en la ausencia de contracciones o ruptura de membranas (Ananth et al., 2005). Alrededor del 30-35% de los nacimientos prematuros son indicados, del 40 al 45% son partos prematuros espontáneos y entre el 25 al 30% se dan por PPRM (Goldenberg et al., 2008).

3.1 Factores de riesgo del PP

Son múltiples los factores de riesgo que se han intentado asociar con la terminación del embarazo antes de las 37 semanas. Entre estas se cuentan causas médicas, genéticas y, factores ambientales y socioeconómicos. Uno de los que ha demostrado tener gran asociación es el antecedente de PP, y aquellas gestantes que han tenido un PPE tienen un 30% más de riesgo de volver a presentar el evento (Phillips et al., 2017). Como factores de riesgo médicos observados se pueden incluir ciertas infecciones, alteraciones maternas o fetales como la preeclampsia y

malformaciones fetales, embarazo múltiple, la edad materna extrema, anomalías cervicales, algunas etnias y el índice de masa corporal (Menon, 2008). También influyen ciertas conductas como tabaquismo, consumo de alcohol y drogas psicoactivas (Laelago et al., 2020).

Los factores socioeconómicos parecen jugar un papel importante en el riesgo de presentar un PP. Una revisión sistemática de 106 estudios observacionales en diferentes países reveló que el bajo nivel socioeconómico y el bajo peso del neonato al nacer se relacionan con el PP (Blumenshine et al., 2010). También se ha documentado que aquellos barrios que presentan altos niveles de pobreza tienen mayor riesgo de PP en comparación con aquellos con bajos niveles de pobreza (Margerison-Zilko et al., 2015).

Uno de los factores de riesgo más importantes asociados al PP es el origen racial y étnico de las mujeres. Aún no es bien comprendida la razón en las diferencias en las tasas de PP entre grupos étnicos y raciales. Se ha planteado como hipótesis una relación con las desigualdades sociales y económicas subyacentes, dado que, tanto la pobreza, la educación materna y el estrés están asociadas con un mayor riesgo de PP, pero se desconoce cómo estos factores interactúan entre sí y modifican la relación entre la etnia y el PP. Aunque las condiciones socioeconómicas son la principal razón del PP en la raza, otras investigaciones sugieren la ascendencia genética también parece estar implicada

En 2013, en Estados Unidos se reportó que el 16,3% de las mujeres negras no hispanas embarazadas dieron a luz antes de las 37 semanas en comparación con el 10,2% de las mujeres blancas no hispanas y el 11,3% de las mujeres hispanas (Frey & Klebanoff, 2016). Adicionalmente,

en una revisión sistemática se encontró que las mujeres afrodescendientes tienen un riesgo dos veces mayor de presentar PP en comparación con mujeres caucásicas (Schaaf et al, 2013).

La identificación de los factores que se involucran en el PP ayuda a tener una mejor comprensión de sus causas y la posibilidad de una intervención con el fin de prevenir complicaciones, o en el caso de mujeres embarazadas que presenten conductas de riesgo, permite que puedan evitarse o controlarse, como: dejar de fumar cigarrillo, tratar las comorbilidades maternas subyacentes y lograr el índice de masa corporal ideal (Wallace et al., 2017).

3.2 Fisiopatología del Parto Prematuro

El PP es considerado un síndrome multifactorial en el que los mecanismos moleculares involucrados en su activación aún no son claros. Tanto el PT como el PP involucran los mismos eventos clínicos que llevan a la activación de la vía común del parto con un aumento de la contractilidad uterina, dilatación cervical y ruptura de las membranas corioamnióticas (R. Romero, Dey, et al., 2014) .

Los mecanismos que permiten la activación del miometrio están dados por cambios en la señalización entre las vías antiinflamatorias y proinflamatorias, junto con la activación de proteínas asociadas a la contracción. En la dilatación cervical se generan cambios en la matriz extracelular y se da la activación de la decidua con posterior ruptura de membranas que está mediada por una mayor expresión de citocinas inflamatorias, quimiocinas y mayor actividad de proteasas (R. Romero, Dey, et al., 2014).

En el caso del PP, diferentes procesos patológicos junto con factores de riesgo pueden activar uno o más componentes de la vía común de parto antes del tiempo estimado. Evidencia de diversos estudios muestra que los mecanismos de enfermedad que se pueden asociar con el PP pueden ser la hemorragia decidual y enfermedad vascular, senescencia decidual, interrupción de la tolerancia materna, disminución de la acción de progesterona, sobredistensión uterina e inflamación inducida por microorganismos (R. Romero et al., 2006). Todos estos mecanismos inducen el parto a través de la liberación de mediadores que estimulan la contracción del miometrio, la degradación de los componentes de la matriz extracelular, la inducción de la inflamación y apoptosis de células que promueven la ruptura de las membranas, la maduración cervical y el vaciado uterino (Menon, 2008; Monangi et al, 2015).

Hallazgos histológicos y microbiológicos indican que la inflamación desempeña un papel importante en la patogénesis del PP y la RPM (Romero et al., 2006). En el caso de infección intraamniótica, cuando se aíslan los microorganismos del fluido amniótico estos son similares a los que infectan normalmente el tracto genital inferior, demostrando que existe una vía de ascenso de estos patógenos que infectan la vía vaginal (Erchick, 2020). Todos estos microorganismos son reconocidos por el sistema inmune a través de receptores específicos e inducen la producción de quimiocinas como IL-8, IL-1, CCL-2, citocinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF- α , prostaglandinas y proteasas que conducen a la activación de la vía común de parto (Romero, 2001) (48). Sin embargo, no todas las mujeres con infección vaginal terminan desarrollando una infección intraamniótica y parece ser que la microbiota vaginal desempeña un papel importante para el control de estas infecciones. Esto demuestra la importancia de una

comprensión integral en su composición y dinámica durante el embarazo, así como su interacción con otros factores, como la activación de la respuesta inmune inflamatoria (Macones et al, 2004).

3.3 Microbiota

El término microbiota hace referencia al conjunto de microorganismos que habitan diferentes superficies y cavidades en el cuerpo humano. Existe una gran diversidad de microorganismos conformados por bacterias, arqueas, protistas, hongos y virus, que tienen la particularidad de encontrarse distribuidos de forma diferencial dependiendo la zona del cuerpo e inclusive entre las personas (The Human Microbiome Project Consortium, 2012) y pueden convivir de manera comensal, simbiótica o patógena en nuestro organismo (Marchesi & Ravel, J., 2015). Se ha estimado que la microbiota asociada a los humanos está conformada por al menos 40.000 cepas bacterianas distribuidas en 1.800 géneros, y que en conjunto reúnen al menos 9.9 millones de genes no humanos (Schwiertz, 2016). Una característica fundamental es su relación con diversos estados de salud y su participación en procesos biológicos como la homeostasis metabólica, captación de nutrientes, adquisición programada de inmunidad, protección contra patógenos, entre otros (Barrientos-Durán et al., 2020). El desbalance de la microbiota normal se ha asociado con múltiples enfermedades incluidas esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes tipo 1 y 2, alergias, asma, autismo y cáncer (Lloyd-Price et al., 2016).

La evolución de las nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento ha facilitado la identificación de comunidades microbianas complejas, y la obtención de información más completa sobre las especies presentes en un hábitat (Schwiertz, 2016). Dentro de las metodologías implementadas en la secuenciación masiva aplicada a la microbiología se

encuentran la secuenciación dirigida basada en la amplificación de pequeños fragmentos blanco de ADN y la secuenciación en *shotgun*, cuyo objetivo es la identificación del genoma completo, el cual previamente se fragmenta de forma aleatoria y posteriormente se ensambla con herramientas bioinformáticas (Hernández et al., 2020).

Las características que destacan las tecnologías de secuenciación de nueva generación son su capacidad para generar gran cantidad de información que permite la lectura de millones de secuencias de forma masiva, una mayor precisión en la identificación de los microorganismos y una reducción en los costos del procesamiento y el tiempo de análisis. La tecnología Illumina es una de las principales implementadas en la generación de información sobre la microbiota por su alto rendimiento, precisión y bajas tasas de error. Puede secuenciar fragmentos de hasta 300 pares de bases (pb) y generar secuencias en una única dirección o en ambas direcciones. Nuevas tecnologías desarrolladas como las de tercera generación que incluye la tecnología de secuenciación de Oxford Nanopore, ha surgido con la intención de mejorar la capacidad para secuenciar fragmentos de mayor tamaño de ADN, para obtener una mejor profundidad en la identificación, además de una reducción en los costos del procesamiento (Regueira-Iglesias et al., 2023).

Existen genes considerados marcadores moleculares que sirven para la identificación de la microbiota y han sido de gran utilidad para estudios de filogenia y evolución genética. En el caso de las bacterias y arqueas se usa el gen 16S que codifica el ARN de la subunidad pequeña de los ribosomas de estos microorganismos (Schwiertz, 2016) . La secuencia de este gen, que tiene un tamaño de aproximadamente 1500 pb, contiene 3 tipos de regiones importantes: Las regiones altamente conservadas son comunes a todas las bacterias y se han usado como blanco para el

diseño de cebadores que permiten la amplificación del gen y las regiones variables e hipervariables proporcionan la información específica para la identificación de géneros y especies bacterianas. El gen cuenta con 9 regiones variables y en la mayoría de los estudios se usan entre 1 a 2 para discriminar entre los diferentes taxones bacterianos y es importante resaltar que algunas de estas regiones permiten una mejor diferenciación entre taxones estrechamente relacionados.

3.4 Microbiota vaginal

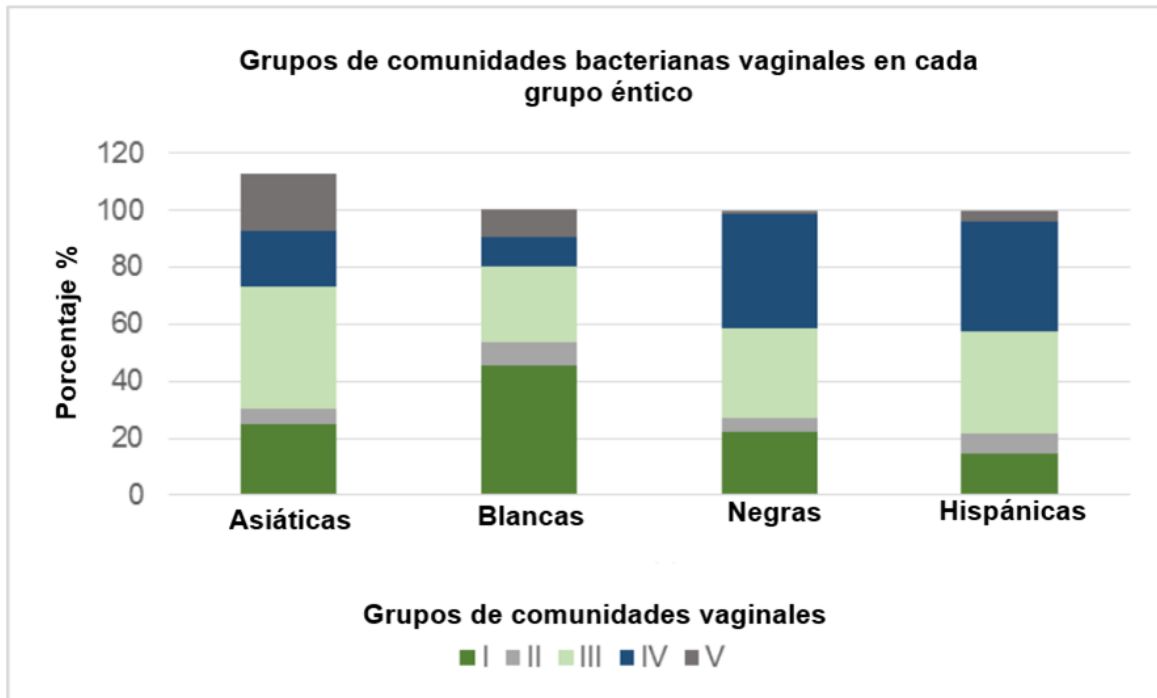
En el tracto vaginal, la comunidad de microorganismos reside principalmente en el epitelio escamoso y cumplen un papel fundamental en el bienestar y la salud de las mujeres (Lamont et al., 2011), actuando como un componente clave en la defensa contra patógenos y enfermedades. Se ha caracterizado al género bacteriano *Lactobacillus* como el dominante de esta comunidad de microorganismos. Las primeras clasificaciones sobre su composición se hicieron con base en su presencia y se establecieron las categorías de biota dominante o no dominante por *Lactobacillus* (Cruickshank, 1934).

Los *Lactobacillus* son bacterias gram positivas en su mayoría anaerobias, que desempeñan una función importante en el control de infecciones por otros patógenos a través de dos mecanismos. El primero, es por medio de la adhesión a glicoproteínas presentes en las células epiteliales, y el segundo, es por la producción de compuestos microbianos, como el ácido láctico, que mantiene un pH ácido en la luz vaginal, generando un ambiente protector al inhibir el crecimiento de otros microorganismos (Nagy et al, 1992). El papel que desempeña la microbiota vaginal está relacionado con la prevención de la vaginosis bacteriana (VB), infecciones

por levadura, infecciones de transmisión sexual, infecciones del tracto urinario e infección por VIH (Ravel et al., 2011).

Haciendo uso de pirosecuenciación del gen 16S rRNA, en 2010 Ravel y colaboradores logró caracterizar la microbiota vaginal de 396 pacientes norteamericanas de cuatro grupos étnicos diferentes: blancas, negras, asiáticas e hispanas. Encontró que la mayoría de las comunidades vaginales están dominadas por una o más especies de *Lactobacillus*. A partir de esta información se realizó la construcción de cinco grupos principales de comunidades microbianas denominadas tipos de estado comunitario (CTS, por sus siglas en inglés). El grupo CTS I obtuvo un 26,6% de mujeres con dominancia de *L. crispatus*, en el grupo CTS II, 6,3% de *L. gasseri*, grupo CTS III 34,1% de *L. iners* y el grupo CTS V un 5,3% de dominancia por *L. jensenii*. El grupo CTS IV formó un grupo heterogéneo principalmente de bacterias estrictamente anaerobias de los generos *Prevotella*, *Dialister*, *Atopobium*, *Gardnerella*, *Megasphaera*, *Peptoniphilus*, *Sneathia*, *Eggerthella*, *Aerococcus*, *Fingoldia*, y *Mobiluncus*.

En este estudio los principales *Lactobacillus* encontrados fueron *L. iners* y *L. crispatus*. Las diferencias entre estas comunidades vaginales están potenciadas por factores culturales, conductuales, genéticos y otros que aún permanecen desconocidos. La composición del grupo CTS IV es similar a los criterios de Nugent para diagnosticar VB y, además, ha demostrado tener una fuerte asociación entre el aumento del riesgo de adquirir infecciones de transmisión sexual (ITS). El análisis de la proporción de cada comunidad según la etnia demostró tener diferencias significativas, logrando concluir que las comunidades bacterianas vaginales no dominadas por especies de *Lactobacillus* son comunes y parecen normales en las mujeres de etnias negras e hispanas (Ravel et al., 2011).

Figura 1*Comunidades bacterianas por etnia*

Estudios posteriores confirmaron las diferencias que existen entre la composición de la microbiota vaginal y la etnia. Un estudio realizado por Fettweis et al. en 2014, comparó la microbiota vaginal de mujeres afroamericanas con y sin diagnóstico de VB, con mujeres de ascendencia europea con las mismas características. El estudio encontró que, en mujeres de ascendencia europea, la microbiota vaginal tiene baja diversidad y está dominada por especies de *Lactobacillus*, mientras que en las mujeres afroamericanas hay una mayor diversidad microbiana y poca presencia de *Lactobacillus*. La importancia de esta información radica en que las mujeres afroamericanas presentan con mayor frecuencia VB y tienen mayor riesgo de terminar en un PP (Fettweis et al., 2014).

Se cree que las diferencias en la composición de las comunidades vaginales entre los grupos étnicos pueden estar relacionados con diferencias genéticas del hospedador, influyendo directamente en los sistemas inmune innato y adaptativo, las secreciones vaginales y ligandos de superficies de las células epiteliales vaginales, entre otros. Factores como hábitos de higiene personal, el uso de métodos anticonceptivos y estilo de vida sexual también pueden influir en las diferencias de la microbiota vaginal entre las mujeres (Schwebke, 2009).

En algunas mujeres sanas de edad reproductiva se ha evidenciado que la microbiota vaginal es dinámica en el tiempo y pueden cambiar de una comunidad microbiana a otra, mientras que en otras es más estable, probablemente por tener una mayor dominancia de ciertas especies de *Lactobacillus* productores de ácido láctico (59). Los estudios longitudinales resaltan que las comunidades microbianas vaginales tienen una naturaleza altamente dinámica y es necesario comprender mejor los factores biológicos subyacentes que modulan las transiciones en la composición y las funciones de la microbiota que puedan afectar la fisiología del hospedero (Smith & Ravel, 2017).

3.5 Microbiota vaginal y embarazo

Durante el embarazo la microbiota vaginal parece sufrir algunas modificaciones en su composición y estabilidad. Se ha sugerido que puede deberse a los cambios fisiológicos propios del embarazo y a implicaciones funcionales para el hospedero.

Los primeros estudios basados en secuenciación dirigida al gen 16S rRNA lograron determinar que, durante la gestación, el género *Lactobacillus* spp. se encontraba predominante (Aagaard, 2012), y con investigaciones posteriores se logró diferenciar y caracterizar la

microbiota vaginal de mujeres embarazadas y no embarazadas. De este estudio se determinó al tipo de estado comunitario IV-B (CST IV-B), caracterizado por una alta abundancia relativa de especies de *Atopobium* más la presencia de *Prevotella*, *Sneathia*, *Gardnerella*, *Ruminococcaceae*, *Parvimonas*, *Mobiluncus*, en menor proporción en el grupo de mujeres con embarazo a término y, que las diferencias entre los dos grupos de comparación en relación a este CST fue significativa. También se evidenció una mayor abundancia de algunas especies de *Lactobacillus* como *L. vaginalis*, *L. crispatus*, *L. gasseri* y *L. jensenii* durante el embarazo, además de una mayor estabilidad de todos estos microorganismos durante el tiempo de seguimiento en el estudio y que el cambio de CST fue más frecuente entre aquellas comunidades dominadas por *Lactobacillus* (Romero, 2014).

3.6 Microbiota vaginal y PP

La microbiota desempeña un papel fundamental en nuestro organismo en labores como adquisición de nutrientes, programación inmunitaria y protección contra patógenos. Su alteración se ha asociado con el desarrollo de enfermedades (Dethlefsen, 2007). En el caso de la microbiota vaginal, cuando esta se altera se relaciona con un mayor riesgo de infecciones de transmisión sexual, incluido el VIH (Fredricks, 2005), eventos perinatales adversos como abortos recurrentes, corioamnionitis histológica o inclusive el parto prematuro. Gran cantidad de estudios se han realizado para determinar si los cambios en la composición de la microbiota vaginal durante el embarazo se relaciona con la culminación del embarazo de manera anticipada.

Las asociaciones entre las comunidades bacterianas vaginales, la vaginosis bacteriana (VB) y el parto prematuro están ampliamente reportadas (Stafford et al., 2017; Sun et al., 2022).

Uno de los primeros estudios realizados para caracterizar la microbiota vaginal durante el embarazo, utilizó técnicas basadas en pirosecuenciación para poder establecer si los cambios en la composición de la microbiota vaginal ocurren antes del inicio del parto prematuro espontáneo. Sin embargo, en los resultados no se detectaron diferencias en los taxones bacterianos, la abundancia relativa y la frecuencia de los tipos de estado comunitario (CST) entre las pacientes que dieron a luz a término y las que tuvieron un parto prematuro espontáneo (Romero et al., 2014). Contrario a estos resultados, estudios como el de DiGiulio et al. pudieron demostrar que aquellas pacientes que tienen un PP tienen una dominancia del CST IV a lo largo del embarazo y su asociación fue estadísticamente significativa, aun corrigiendo el efecto de la raza sobre la correlación (DiGiulio et al., 2015).

Respecto a la diversidad alfa y beta, se encontró que estos no sufren cambios significativos entre las semanas de embarazo de las pacientes estudiadas y, por tanto, no hay una semana en particular en la que ocurran grandes cambios en la microbiota. Estos resultados iniciales sugieren que la progresión del embarazo no está asociada con una remodelación dramática de la diversidad y composición de la microbiota normal de una mujer, pero sí que la alta diversidad de CST IV está asociado con un riesgo más alto de incidencia del PP, sugiriendo que la evaluación de esta comunidad sería de utilidad en la predicción del PP desde etapas tempranas del embarazo (DiGiulio et al., 2015).

Investigaciones posteriores como el realizado por Freitas y colaboradores, encontraron en una cohorte de 170 pacientes con parto a término y 46 mujeres con parto prematuro espontáneo, que la riqueza y la diversidad de la microbiota vaginal se relaciona con un riesgo más alto de terminar en un PP (Freitas et al., 2018). Los resultados obtenidos fueron consistentes

estudios previos como el de Hyman y colaboradores, con la diferencia que se incluyó un mayor número de participantes, que tenían una predominancia de raza blanca y se hizo una única medición en la semana 16 del embarazo (Hyman et al., 2014).

Para el año 2019, Fettweis et al. realizó un análisis de la microbiota vaginal en el embarazo en el que se incluyeron dos grupos de estudio diferentes: el primero fue un estudio de casos y controles que incluyó 45 mujeres que terminaron en un PPE y 90 mujeres con un PT y en el cual había predominancia de ancestría africana. El otro grupo incluía una cohorte retrospectiva de 90 mujeres que tuvieron parto normal y un parto pretérmino, con una diversidad étnica mayor (Gajer et al., 2012). Los resultados más significativos mostraron que las mujeres que dieron a luz a término tenían más probabilidades de mostrar un predominio de *L. crispatus* en su microbiota vaginal. La diversidad general aumentó en las muestras de mujeres que tuvieron PP y los 12 taxones caracterizados, mostraron diferencias significativas en la abundancia entre los grupos de PP y parto a término. Como microorganismos más representativos en las muestras de PP, se encontró mayor abundancia de BVAB1, *Prevotella* cluster 2 y *Sneathia amnii*, mientras que *L. crispatus* se redujo significativamente. En el segundo grupo estudiado se identificaron los taxones *Megasphaera* tipo 1 y TM7-H1 como adicionales asociados con el PP. Como herramienta de diagnóstico del riesgo de PP, los investigadores construyeron un modelo de predicción haciendo uso de los taxones más asociados al PP, obteniendo resultados positivos y sugiriendo que su detección en etapas tempranas del embarazo es el mejor momento para hacer la predicción de posibles complicaciones a futuro (J. M. Fettweis et al., 2019). Posteriores estudios realizados confirmaron estos resultados (Chang et al., 2020; Dunlop et al., 2021).

Una característica importante de los estudios de microbiota vaginal y PP a tener en cuenta, ha sido la disparidad de variables incluidas, generando que los resultados obtenidos no reflejan los mismos cambios y variaciones asociados al PP. Una de las principales variables que difiere entre estudios y puede influir en el desenlace del PP es la etnia, ya que las mujeres de etnia negra tienen una asociación más alta con el PP (OR) de 2.0 (95% CI: 1.8-2.2) (Schaafet al., 2013), además de las diferencias que también se presentan en la composición de la microbiota entre estos grupos (Fettweis et al., 2014; Ravel et al., 2011). La mayoría de la información con la que se cuenta actualmente se deriva de análisis de la microbiota realizados en población afroamericana, y blanca no hispánica (J. M. Fettweis et al., 2019; Romero et al., 2014), con población hispana muy reducida o nula (Hyman et al., 2014). La edad gestacional en la que se evalúa la composición de la microbiota es otra variable que comúnmente cambia entre los estudios. Los análisis realizados han sido principalmente longitudinales, con muestras tomadas semanalmente o en cada trimestre. La secuenciación de segunda generación es la metodología más usada para caracterizar la microbiota vaginal, principalmente a través de la amplificación del gen 16S rRNA, sin embargo, los estudios difieren en la región del gen amplificada para la caracterización de la microbiota. Las regiones V1/2, V3/4, V1/V3 y V4 son las más utilizadas en estos estudios. Además de estas variables, Peelen et al. en su análisis sistemático sobre la influencia de la microbiota vaginal en el PP, describe que el diseño del estudio, el número de participantes, el riesgo de tener un PP y la edad gestacional del embarazo para la toma de la muestra son otras de las variables que cambian en los estudios (Peelen et al., 2019).

Gudnadottir y colaboradores en su trabajo sobre el riesgo de PP y la microbiota vaginal pudo realizar un metaanálisis de red, incluyendo estudios longitudinales, que caracterizaban la

microbiota en al menos 3 CST, para calcular intervalos de confianza del 95% y OR asociados al riesgo de PP con la información extraída de los estudios. Los resultados obtenidos demostraron que hay una mayor proporción de microbiota con "bajos *Lactobacillus*" en el grupo de pacientes con PP en comparación con las de parto a término. El riesgo de parto prematuro fue mayor entre las mujeres que presentaban "bajos *Lactobacillus*" en comparación con *L. crispatus* (OR 1.69, IC 95% 1.15 - 2.49). Como conclusión final los investigadores concluyen que la diversidad de la microbiota vaginal parece desempeñar un papel importante en el riesgo de PP, donde las mujeres con baja abundancia de *Lactobacillus* tenían un mayor riesgo de presentar PP en comparación con las mujeres con una microbiota dominante de *L. crispatus*, y que este microorganismo había demostrado ser la mejor composición de microbiota vaginal, presente principalmente en pacientes con parto a término (Gudnadottir et al., 2022).

4 Objetivos

4.1 Objetivo General:

Evaluación de la asociación de la microbiota vaginal en semana 11 a 13 de embarazo con el parto prematuro espontáneo en una cohorte de gestantes de la zona metropolitana de Bucaramanga.

4.2 Objetivos Específicos:

Describir las abundancias relativas y las diversidades de las especies más representativas en las pacientes con parto prematuro espontáneo y parto a término.

Determinar las comunidades bacterianas en tipos de estado comunitario (CST) presentes en las mujeres que tuvieron un parto prematuro espontáneo y las que presentaron parto a término.

Comparar la abundancia, las diversidades y los CST entre las mujeres con y sin parto prematuro espontáneo.

5 Metodología

5.1 Tipo de estudio

Estudio de casos y controles anidado en una cohorte con seguimiento longitudinal

5.2 Población objeto

Mujeres en el primer trimestre de embarazo único atendidas en el Centro de Atención Materno Fetal Inutero de la clínica Foscal Internacional y el Hospital Universitario de Santander.

5.3 Obtención de las participantes

Las participantes fueron seleccionadas de las bases de datos creadas a partir de los proyectos internos de Universidad Industrial de Santander con código de referencia 2542 y 2841, en los cuales se incluyeron 340 gestantes y 400 gestantes respectivamente, en semana 11 a 13 de embarazo, entre los años 2019 y 2022. Todas las pacientes cuentan con el consentimiento informado debidamente firmado el día de la realización de la ecografía de tamizaje genético del primer trimestre en los centros de captación autorizados para el proyecto. Con el fin de proteger la identidad de las participantes, la información sociodemográfica, clínica y de culminación de su embarazo se codificó alfanuméricamente.

A partir de la base de datos se realizó la identificación de las participantes que culminaron su embarazo antes de las 37 semanas de gestación para incluirlas en el grupo de casos de parto prematuro espontáneo. Para este grupo se tuvieron en cuenta los partos que culminaron por ruptura prematura de membranas (RMP) o actividad uterina. La selección de los controles se realizará pareando cada caso con 2 participantes con un embarazo superior a las 37 semanas de

gestación, teniendo en cuenta las variables edad, índice de masa corporal y número de embarazos previos para su selección. Se manejó una relación de casos y controles de 1:2, y se incluyó un total de 50 casos de parto prematuro espontáneo y 100 controles de parto a término, para un total de 150 participantes.

5.4 Extracción de ADN a partir de muestra cervicovaginal

La extracción del material genético de las muestras cervicales se realizó con el método de extracción por *salting-out*. Inicialmente, se tomó 500 ul de la muestra almacenada y se lavó en 500 ul de Buffer PBS 1X para limpiar las células de los componentes del líquido conservador. Seguido de esto se realizó la lisis de las células con 600 ul de buffer de lisis (10mM Tris-Cl pH 7,5, 10 mM EDTA pH 8,0 y 50mM NaCl) más 10 ul del reactivo SDS al 20% y se incubaron durante una hora a 56 °C en agitación constante, dando vortex cada 15 minutos durante el tiempo de incubación. Posteriormente se realizó la precipitación de los restos celulares con 200 ul de cloruro de sodio en una concentración de 6M (NaCl 6M) y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos para separar del material genético de los restos celulares. El sobrenadante fue recuperado y se pasó a un nuevo vial y el ADN se precipitó usando isopropanol, seguido de un ciclo de centrifugación a 12,000 rpm por 5 minutos para peletear el material genético, y posteriormente un lavado con etanol de grado biología molecular al 70% con un posterior ciclo de centrifugación. El etanol residual se dejó evaporar por 30 minutos y finalmente, el ADN se resuspendió en buffer TE 1X (Tris-EDTA 1X pH 7,5) y se almacenó a -70°C. La cuantificación y verificación de la calidad del ADN se hizo por absorbancia con el equipo DeNovix Inc (Wilmington, Estados Unidos).

5.5 Construcción de librerías y secuenciación de la región V3/V4 del gen 16S rRNA por Illumina

Inicialmente al ADN extraído se le realizó un control de calidad usando el sistema LabChipGX para determinar el tamaño, cuantificación y pureza de las muestras. Se amplificaron las regiones hipervariables V3-V4 del gen 16S rARN usando los primers 16S V3-V4 Forward y 16S V3-V4 Reverse, siguiendo el protocolo del kit 16s rRNA-seq kit V3V4 (NEXTFLEX 16S, n.d.). Se usó la plataforma Illumina MiSeq/NextSeq 1000/2000 y se obtuvieron fragmentos de 300 pb x2. Los archivos de las secuencias se almacenaron en formato fastq para su posterior análisis. (GenXpro, Frankfurt, Alemania).

5.6 Análisis bioinformático de los datos obtenidos por Illumina

Las muestras se demultiplexaron y a las lecturas se les removió el adaptador y se hizo un control de calidad de corte utilizando Cutadapt (versión 3.4) (Martin, 2011). Basado en los informes obtenidos del programa FastQC (0.11.9) se verificó la calidad de las lecturas en cada muestra teniendo en cuenta que los fragmentos cumplieran con una longitud de 300 pb y tuvieran un puntaje de calidad superior a 30 (Babraham bioinformatics Fast QC, s.f.). Los archivos fastq junto con la metadata se procesaron en el programa Nextflow: 23.04.3 con el pipeline nf-core/ampliseq: 2.6.1 (Di Tommaso, 2017). La clasificación de las lecturas se realizó en variantes de secuencias de amplicones (ASV) y la asignación taxonómica se infirió hasta mayor nivel sistemático usando la base de datos Silva 138.1, con el pipeline del paquete DADA2 versión 1.22.0 (Callahan, et al., 2016). La especie identificada se confirmó realizando una alineación en el programa Blastn y aquellas secuencias que fueron identificadas sólo hasta nivel de género, se les

asignó la especie si tenían un porcentaje de identidad superior al 99% (NCBI blastn, n.d.). Para el cálculo de las diversidades alfa y beta, y sus respectivos índices, se utilizó el programa QIIME2 versión 2022.11.1 (Hall & Beiko, 2018).

Para la construcción de los CSTs se empleó el método VALENCIA (VAGinal community state type Nearest Centroid classifier por sus siglas en inglés), que permite clasificar la microbiota basado en el cálculo de centroide de referencia, los cuales representan el perfil típico de cada CST. VALENCIA utiliza la medida de similitud de Yue y Clayton's θ para comparar el perfil de microbiota de una nueva muestra con los centroides de referencia (France, 2020).

5.7 Análisis de abundancia y diversidades de la microbiota vaginal.

Para el análisis de abundancias de taxones se incluyeron únicamente las muestras que tuvieran un número de lecturas superior a 10.000. En cada muestra se sumaron los recuentos de lectura de ASVs asignados a la misma taxonomía.

Las abundancias relativas a nivel de género y especie con un umbral de detección superior al 1% y un umbral de prevalencia del 5% fueron tenidas en cuenta para el análisis. Se hizo una comparación de los taxones entre los grupos de PPE y PT aplicando la prueba U de Mann-Whitney y Kruskal Wallis con el fin de identificar diferencias en la abundancia a nivel de especie.

Para representar la diversidad alfa se calcularon los índices de Chao1, Shannon y Simpson, y se aplicó la prueba U de Mann-Whitney como test estadístico. La diversidad beta se representó con la disimilitud de Bray Curtis y se graficó como un análisis de coordenadas principales (PcoA). Para determinar las diferencias estadísticas entre los grupos PPE y pt se usó el análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA).

5.8 Análisis estadístico.

Para realizar el análisis estadístico, las variables cualitativas se describen con frecuencias absolutas y relativas. Para las variables cuantitativas, inicialmente se realizó el test de Shapiro Wilk para comprobar si las variables tenían un comportamiento normal. Las variables que tuvieron una distribución normal se describieron con media y desviación estándar (DE) y las que no tuvieron distribución normal con mediana y rango intercuartil. Se aplicó la prueba *t* de student para aquellas variables que obtuvieron significancia en el test de normalidad. Como pruebas no paramétricas para realizar la comparación de variables continuas entre 2 grupos se aplicó la prueba de U de Mann Whitney, mientras que la comparación de más de más grupos se usó la prueba de Kruskal Wallis. Para el análisis de las variables categóricas se empleó la prueba exacta de Fisher. Se tomó como significancia el valor de *p* que estuviera menor a 0,05. Para realizar los test estadísticos y gráficas se usó el programa Stata versión 16.1 (95) y GraphPad Prism versión 8.0.2 (96).

Para evaluar la asociación entre el desenlace del PPE con las variables clínicas y las abundancias relativas de las especies identificadas en la microbiota vaginal, se utilizó una regresión logística condicional. Adicionalmente, se evaluó el porcentaje de abundancia (cuantitativo), así como los quintiles y la presencia de las especies bacterianas de forma cualitativa. Se realizó análisis univariante, reportando el Odds Ratio crudo (OR), con su respectivo intervalo de confianza del 95% (IC 95%). Posteriormente se realizó un análisis multivariante, reportando los Odds Ratio ajustado (ORa) con su respectivo IC 95%. Los test estadísticos y gráficas se realizaron en el programa Stata versión 16.1 (95) y GraphPad Prism versión 8.0.2 (96).

5.9 Construcción de librerías y secuenciación del gen 16S rRNA por Oxford Nanopore.

Se seleccionó una submuestra de 20 participantes, 12 casos de PPE y 8 casos de PT, para la amplificación de las regiones V1-V9 del gen 16S rARN con los primers 16S-27F y 16S-149R (97). Se usó el kit Rapid PCR Barcoding Kit 24 V14 (SQK-RPB114.24) para la construcción de las librerías (98). La librería se cargó en una celda flonge FLO-FLG 114 versión R10.4.1 y la secuenciación se corrió en el equipo MinION Mk1C durante 24 horas.

5.10 Análisis bioinformático y estadístico de los datos obtenidos por Oxford Nanopore.

Los archivos de las secuencias fastq se procesaron en el programa EPI2ME labs siguiendo el flujo de trabajo epi2me-labs/wf-16s para análisis de secuenciación de lecturas largas. La calidad de las secuencias se verificó teniendo en cuenta un puntaje de calidad superior a 8 y la longitud del fragmento obtenido. La clasificación de las secuencias se hizo con el programa Kraken versión 2.1.3 frente a la base de datos de referencia NCBI RefSeq _16s_18s para inferir el mejor nivel taxonómico. Se tuvieron en cuenta para los taxones con un umbral de abundancia superior al 1% en el total de muestras analizadas (99). Las abundancias relativas de las especies identificadas se compararon entre las dos tecnologías de secuenciación con el índice de correlación intraclase usando el programa Stata versión 16.1 (95).

6 Resultados

6.1 Descripción de la cohorte y variables sociodemográficas y clínicas

En el estudio se incluyeron un total de 150 participantes, 50 de ellas con PPE y 100 con PT. Después de aplicar los filtros de calidad de la secuenciación se obtuvo un total de 45 casos de PPE y 91 controles de PT. Los criterios de inclusión de las participantes en los proyectos macro de donde se seleccionaron las muestras fueron estar en el primer trimestre del embarazo, embarazo único, no tener malformaciones müllerianas ni enfermedades infecciosas como VIH, no haber usado antibióticos mínimo hace 1 semana o tener sangrado al momento de la toma de muestra.

La edad materna tuvo un promedio de 27,8 años. Dentro de las variables sociodemográficas y clínicas incluidas, solo la edad gestacional del parto y el antecedente de PP mostraron diferencias significativas entre los dos grupos (test de Mann-Whitney $p < 0,001$ y prueba exacta de Fisher $p 0,03$ respectivamente). Las demás variables no tuvieron significancia estadística. Con relación a la información clínica del parto, en el grupo de casos la mediana de la edad gestacional del nacimiento de los neonatos fue de 36,1 semanas (34,4 - 36,4), con una mayor proporción de nacimientos por encima de las 34 semanas de gestación (80%). La principal causa del PPE se dio por actividad uterina con un 62,2% en comparación con la RPM que estuvo en el 37,8%. En el grupo de PT, la mediana de la edad gestacional fue de 39 semanas (38-39,4) con la mayoría de los nacimientos superiores a 37,6 semanas.

Tabla 1.

Descripción de las características sociodemográficas, clínicas y del parto de las pacientes incluidas en el estudio en los grupos de PPE y PT

Característica	PT (controles) (n= 91)	PPE (casos) (n=45)	p*
Edad materna promedio (DE)	27,8 (5,1)	28,2 (5,5)	0,69
Edad gestacional promedio (DE)	12,6 (0,71)	13,1 (0,83)	0,22
IMC mediana (RIQ)	26,17 (22,48-28,52)	27,34 (23,19-29,97)	0,36
Edad gestacional del parto mediana (RIQ)	39 (38-39,4)	36,1 (34,4-36,4)	<0,001
Patologías durante el embarazo n (%)	12 (13,2)	8 (17,8)	0,61
Diabetes gestacional n (%)	6 (6,6)	4 (8,9)	0,73
Preeclampsia n (%)	4 (4,4)	2 (4,4)	1,00
Hipotiroidismo n (%)	2 (2,2)	2 (4,4)	0,60
Índice de consistencia cervical < 0,74 n (%)	13 (14,2)	10 (22,2)	0,50
Tabaquismo previo n (%)	8 (8,7)	4 (8,8)	0,60
Antecedente parto prematuro n (%)			
Si	5 (5,4)	9 (20)	0,03
No	61 (67,0)	25 (55,6)	
Primer embarazo	25 (27,4)	11 (24,4)	

DE: desviación estándar.

RIQ: rango Inter cuartil.

*prueba exacta de Fisher, prueba U de Mann Whitney o t de student según corresponda.

6.2 Abundancias relativas de géneros y especies e índices de diversidades de la microbiota vaginal

6.2.1 Abundancias relativas de géneros y especies

Basándose en la literatura (108) y la curva de la rarefacción obtenida de los datos, se excluyeron 14 muestras de los análisis de abundancia y diversidades por tener menos de 10.000 lecturas en su recuento total. Se identificaron un total de 139 géneros y más de 250 especies entre todas las participantes incluidas. Al filtrar los taxones teniendo en cuenta el umbral de detección y prevalencia, a nivel de género, sólo 6 se encontraron de forma representativa en la microbiota vaginal, mientras que los demás estaban en menos del 1% del total de las lecturas por muestra. *Lactobacillus* fue el género que tuvo la mayor abundancia (81,3%), seguido de *Gardnerella* (7,7%).

Por su parte, géneros como *Shuttleworthia*, *Atopobium*, *Meghaspera* y *Prevotella* tuvieron una prevalencia total menor al 5%. Al respecto, la predicción a nivel de especies reveló que, con excepción de los *Lactobacillus*, los demás géneros se encuentran representados, en su mayoría, por una única especie. Del género *Lactobacillus* se identificaron en total 13 especies y solo 5 ellas con abundancias significativas, siendo *L. crispatus* y *L. iners*, las especies predominantes. En la tabla 2 se puede observar la abundancia relativa de los géneros y las especies identificadas teniendo en cuenta la cohorte completa.

Tabla 2.

Géneros y especies más abundantes en la microbiota vaginal de mujeres con PP (casos) y PT (controles).

Géneros	Abundancia relativa (%)	Especies (closest relative species)	Abundancia relativa (%)	Identidad (%)
<i>Lactobacillus</i>	81,32	<i>L. crispatus</i>	38,3	99
		<i>L. iners</i>	35,9	99
		<i>L. jensenii</i>	3,32	99
		<i>L. helveticus</i>	2,45	99
		<i>L. gasseri</i>	0,79	99
<i>Gardnerella</i>	7,75	<i>G. vaginalis</i>	7,75	99
<i>Shuttleworthia</i>	4,6	<i>Shuttleworthia sp</i>	4,60	99
<i>Atopobium</i>	2,26	<i>A. vaginae</i>	2,26	99
<i>Megasphaera</i>	1,69	<i>Megasphaera sp</i>	3,39	99
<i>Prevotella</i>	0,50	<i>P. amnii</i>	0,26	99

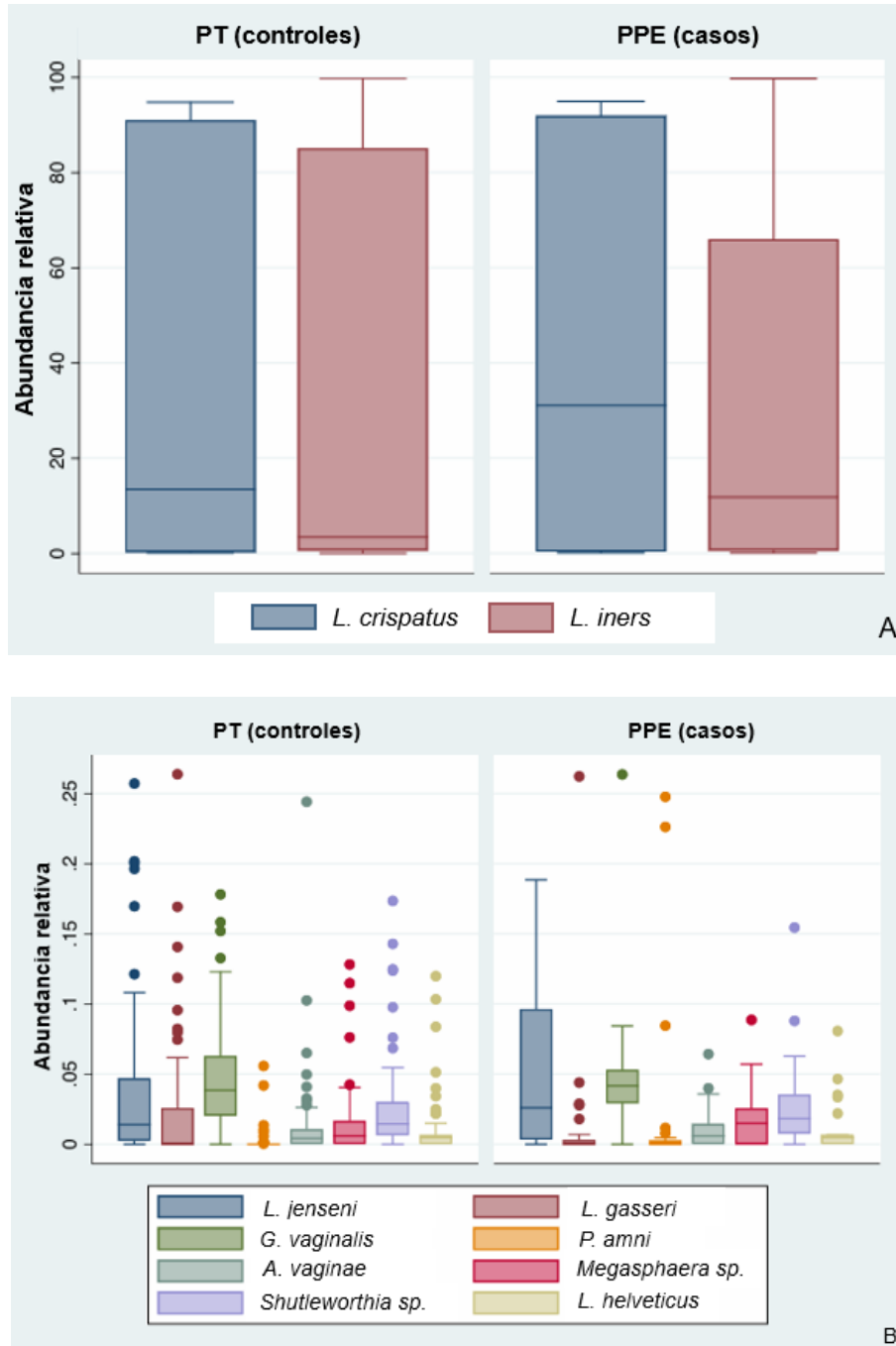
Se realizó un análisis descriptivo y comparativo de las especies predominantes en la microbiota vaginal entre los grupos de PPE y PT con el fin de identificar taxones que tuvieran diferencias en las abundancias relativas entre ambos grupos. Como se observa en la Figura 2A, las dos especies dominantes de la microbiota vaginal para ambos grupos fueron *L. crispatus* y *L. iners*, con un porcentaje de abundancia en los casos de 31,1% (0,4- 91,9) para *L. crispatus* y 11,78% (0,63 – 66) para *L. iners*, mientras que en los controles *L. crispatus* tuvo un porcentaje de abundancia de 13,4% (0,3 – 91,0) y *L. iners* de 3,45% (0,62 – 85, 09). A pesar de haber una mayor abundancia de estas especies en los casos las diferencias no fueron significativas (Tabla 3).

Es importante destacar la alta variabilidad de la abundancia para estos dos microorganismos tanto en casos como en controles, dado que algunas mujeres tenían abundancias cercanas a cero, mientras que otras mostraron abundancias superiores al 90%. A

pesar de esto, las 136 participantes evidenciaron la presencia de estas dos especies en su microbiota vaginal.

Figura 2.

Porcentaje de abundancia relativa de las 10 especies más abundantes en la microbiota vaginal en los grupos caso (PPE) y control (PT).



Nota: A) Porcentaje de abundancia relativa en casos y controles de *L. crispatus* y *L. iners*. **B)** Porcentaje de abundancia relativa en casos y controles de *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *G. vaginalis*, *P. amnii*, *A. vaginae*, *Megasphaera sp.* y *Shuttleworthia sp.*

Al evaluar el porcentaje de abundancia de las demás especies, se puede observar que la mediana tiene valores inferiores al 1% cuando se evalúa individualmente en los grupos caso y control. Adicionalmente, la variabilidad de los datos es mucho menor en comparación con *L. crispatus* y *L. iners*, y en la mayoría de las especies de la figura 2b se pueden apreciar muestras que tuvieron abundancias con valores atípicos y extremos. En el análisis se destacan *P. amnii* y *Megashaera sp.* que tuvieron un valor de *p* cercano a 0,05; sin embargo, las abundancias de estos dos microorganismos se encuentran en baja proporción respecto a las demás especies (Tabla 3).

Tabla 3.

Mediana y rango intercuartil (RIQ) de las abundancias relativas de las especies más representativas de la microbiota vaginal por caso y control.

Especie	Total (n=136) Mediana (RIQ)	Min - Max	PT Controles (n=91) Mediana (RIQ)	PPE Casos (n=45) Mediana (RIQ)	Valor p*
<i>L. crispatus</i>	21,8 (0,27 – 91,2)	0,07 – 94,98	13,4 (0,3 – 91,0)	31,1 (0,4- 91,9)	0,78
<i>L. iners</i>	3,53 (0,62 – 74,30)	0,06 – 99,7	3,45 (0,62 – 85, 09)	11, 78 (0,63 – 66)	0,98
<i>L. jensenii</i>	0,02 (0,003 – 0,09)	0 – 2,1	0,02 (0,002 – 0,08)	0,04 (0,01 – 0,1)	0,26
<i>L. gasseri</i>	0 (0 – 0,02)	0 – 0,75	0 (0 – 0,03)	0 (0 – 0,006)	0,18
<i>L. helveticus</i>	0,04 (0 – 0,006)	0 – 6,14	0,004 (0 – 0,006)	0,004 (0 – 0,006)	0,59
<i>G. vaginalis</i>	0,04 (0,02 – 0,08)	0 – 2,7	0,04 (0,02 – 0,08)	0,04 (0,03 – 0,08)	0,97
<i>P. amnii</i>	0 (0 – 0)	0 – 0,24	0 (0 – 0)	0 (0 – 0,008)	0,08
<i>A. vaginae</i>	0,006 (0 – 0,21)	0 – 1,18	0,006 (0 – 0,021)	0,006 (0 – 0,021)	0,96
<i>Megasphaera sp.</i>	0,06 (0 – 0,02)	0 – 0,76	0,002 (0 – 0,02)	0,015 (0 – 0,04)	0,07

<i>Shuttleworthia sp.</i>	0,01 (0,007 – 0)	0 – 0,58	0,01 (0,006 – 0,03)	0,01 (0,008 – 0,04)	0,71
---------------------------	------------------	----------	---------------------	---------------------	------

Nota: *Prueba U de Mann-Whitney

En comparación con *L. crispatus* y *L. iners*, las demás especies no tuvieron un porcentaje de abundancia en todas las muestras analizadas (Tabla 4), sin embargo, algunas de ellas se encontraban en una proporción alta como es el caso de *G. vaginalis* que estuvo presente en el 96,7% de todos los controles, junto con *L. jensenii* con un 86,8% de presencia y *Shuttleworthia sp.* con el 81,3 %. El grupo de PPE tuvo un comportamiento similar respecto a las especies mencionadas anteriormente (*G. vaginalis* 95,6%, *L. jensenii* 86,7% y *Shuttleworthia sp.* 77,8%). No se encontraron diferencias significativas al realizar la comparación (prueba exacta de Fisher $p > 0,05$).

Tabla 4.

Presencia de cada especie en los grupos de PPE (caso) y PT (control)

Especie	Total (n=136) n (%)	Controles (n=91) n (%)	Casos (n=45) n (%)	Valor p*
<i>L. crispatus</i>	136 (100)	91 (100)	45 (100)	
<i>L. iners</i>	136 (100)	91 (100)	45 (100)	
<i>L. jensenii</i>	118 (86,8)	79 (86,8)	39 (86,7)	1,00
<i>L. gasseri</i>	59 (43,4)	43 (47,2)	16 (35,6)	0,20
<i>L. helveticus</i>	92 (67,7)	60 (65,9)	32 (71,1)	0,56
<i>G. vaginalis</i>	131 (96,3)	88 (96,7)	43 (95,6)	1,00
<i>P. amnii</i>	25 (18,4)	13 (14,3)	12 (26,7)	0,10
<i>A. vaginae</i>	91 (66,9)	62 (68,1)	29 (64,4)	0,70
<i>Megasphaera sp.</i>	76 (55,9)	49 (51,7)	29 (64,4)	0,19
<i>Shuttleworthia sp.</i>	109 (80,2)	74 (81,3)	35 (77,8)	0,65

Nota: *Prueba exacta de Fisher

Como último análisis a nivel de taxones individuales, se calcularon las abundancias relativas de las 10 especies por debajo de los umbrales de detección y prevalencia, con el fin de

determinar si había alguna tendencia en la abundancia de estos taxones en los grupos PPE y PT. La mayoría de las abundancias para ambos grupos en cualquiera de los taxones estuvieron por debajo del 0,001%. Al evaluar la presencia de las especies, se observó que *A. christensenii* y *D. micraerophilus* estaban en el 44% de las muestras, sin diferencias significativas entre casos y controles. Los demás taxones estuvieron por debajo del 35% de todas las muestras (Tabla 5).

Tabla 5.

Presencia de especies con baja abundancia en los grupos de PPE (caso) y PT (control).

Especie	Total (n=136) n (%)	Controles (n=91) n (%)	Casos (n=45) n (%)	Valor p*
<i>S. agalactiae</i>	19 (13,97)	11 (12,09)	8 (17,78)	0,43
<i>Lactobacillus sp.</i>	22 (16,18)	15 (16,48)	7 (15,56)	1,00
<i>DNF00809 sp.</i>	32 (23,53)	21 (23,08)	11 (24,44)	1,00
<i>Fastidiosipila sp.</i>	30 (22,06)	15 (16,48)	15 (33,33)	0,03
<i>A. christensenii</i>	60 (44,12)	39 (42,86)	21 (46,67)	0,71
<i>Dialister sp.</i>	46 (33,82)	28 (30,77)	18 (40)	0,33
<i>HT002 sp.</i>	52 (33,82)	38 (41,76)	14 (31,11)	0,26
<i>L. gallinarum</i>	6 (4,41)	5 (5,49)	1 (2,22)	0,66
<i>D. micraerophilus</i>	60 (44,12)	40 (43,96)	20 (44,44)	1,00
<i>P. buccalis</i>	24 (17,65)	14 (15,38)	10 (22,22)	0,34

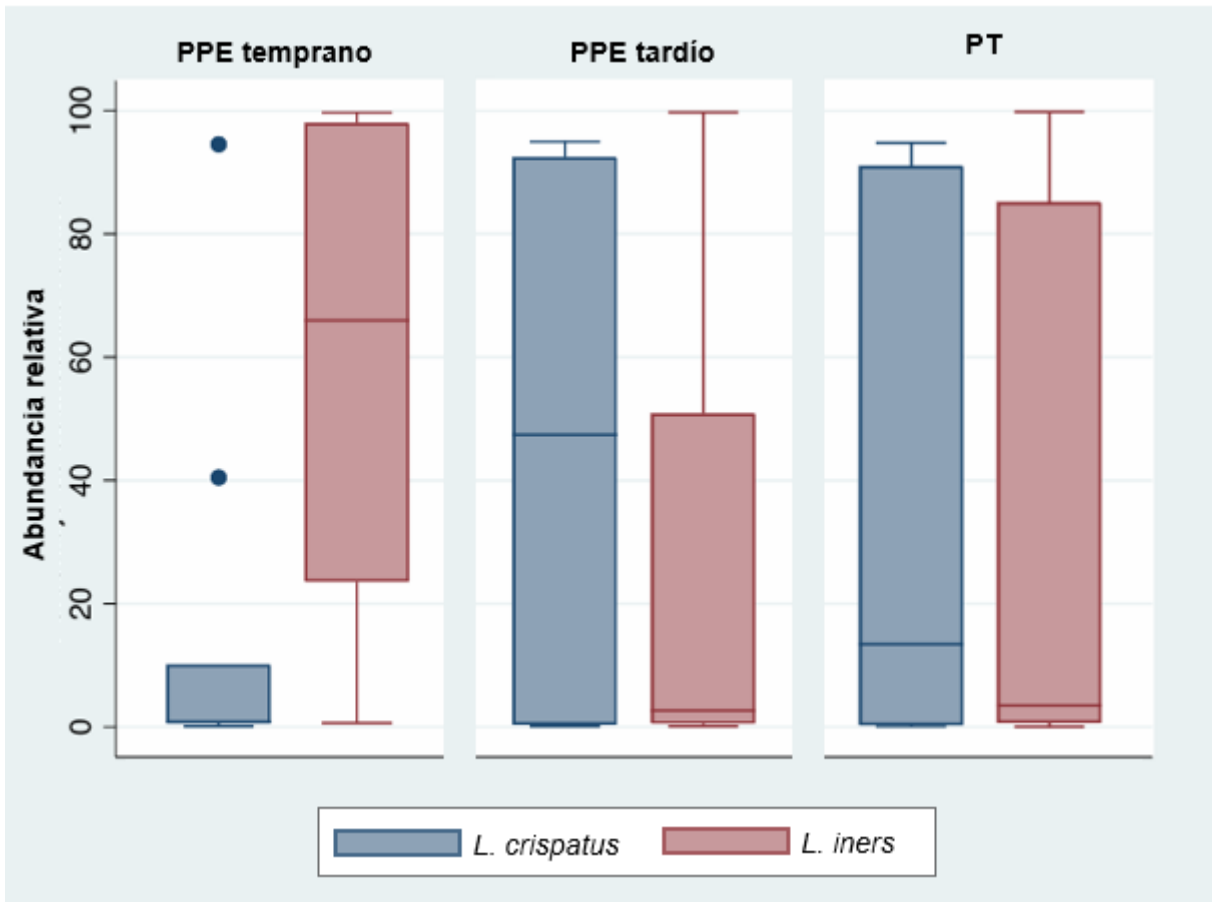
Nota: *Prueba exacta de Fisher

Con el fin de identificar si la composición de la microbiota vaginal se puede alterar dependiendo de la edad gestacional, se realizó una subclasificación del parto pretérmino en las categorías de prematuro temprano (< de 34 semanas de gestación) y prematuro tardío (> de 34,6 semanas de gestación). Como se puede observar en la figura 3, en el grupo PPE temprano *L. iners* tiene una mayor abundancia con una mediana de 66,00 (23,54-98,00) en comparación con las

categorías de PPE tardío y PT, mientras que *L. crispatus* disminuyó su abundancia hasta 0,81 (0,55-10,11). A pesar de los cambios observados en estas dos especies cuando se analiza el PPE en temprano y tardío o cuando se analiza como un grupo completo, no se pudo evidenciar que las diferencias fueran significativas (*L. crispatus* $p=0,5$ y *L. iners* $p=0,07$).

Figura 3.

Abundancias relativas de L. crispatus y L. iners en los grupos PPE temprano (< 34 semanas), PPE tardío (> 34 semanas) y PT (> 37 semanas).



El comportamiento de la abundancia de *L. iners* en el grupo PPE tardío fue similar al del grupo PT, con una mediana de abundancia relativa de 2,63 (0,52-50,85) y 3,45 (0,63-85,10), respectivamente. Las demás especies que componen la microbiota vaginal presentaron un comportamiento similar en el porcentaje de la mediana de las abundancias relativas entre los 3 grupos analizados y no se observaron diferencias estadísticas (Tabla 6).

Tabla 6.

Abundancias relativas de las especies representativas de la microbiota vaginal por grupos PPE temprano (<34 semanas), PPE tardío (>34 semanas) y PT (>37 semanas).

Espece	Casos PPE temprano (n=9) Mediana (RIQ)	Casos PPE tardío (n= 36) Mediana (RIQ)	Controles PT (n=91) Mediana (RIQ)	Valor p*
<i>L. crispatus</i>	0,81 (0,55-10,11)	47,42 (0,32-92,42)	13,44 (0,26-91,00)	0,54
<i>L. iners</i>	66,00 (23,54-98,00)	2,64 (0,52-50,85)	3,45 (0,63-85,10)	0,07
<i>L. jenseni</i>	0,019 (0,011-0,04)	0,059 (0,009-0,12)	0,027 (0,002-0,081)	0,21
<i>L. gasseri</i>	0 (0-0,003)	0 (0-0,012)	0 (0-0,03)	0,38
<i>L. helveticus</i>	0 (0-0,04)	0 (0-0,01)	0 (0-0,01)	0,74
<i>G. vaginalis</i>	0,03 (0,01-0,06)	0,05 (0,03-0,08)	0,04 (0,02-0,08)	0,53
<i>P. amnii</i>	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0,18
<i>A. vaginae</i>	0 (0-0,18)	0,01 (0-0,02)	0,01 (0-0,02)	0,99
<i>Megasphaera sp.</i>	0,01 (0,01-0,05)	0,02 (0-0,04)	0 (0-0,02)	0,16
<i>Shuttleworthia sp.</i>	0,01 (0-0,05)	0,02 (0,01-0,04)	0,02 (0,01-0,04)	0,75

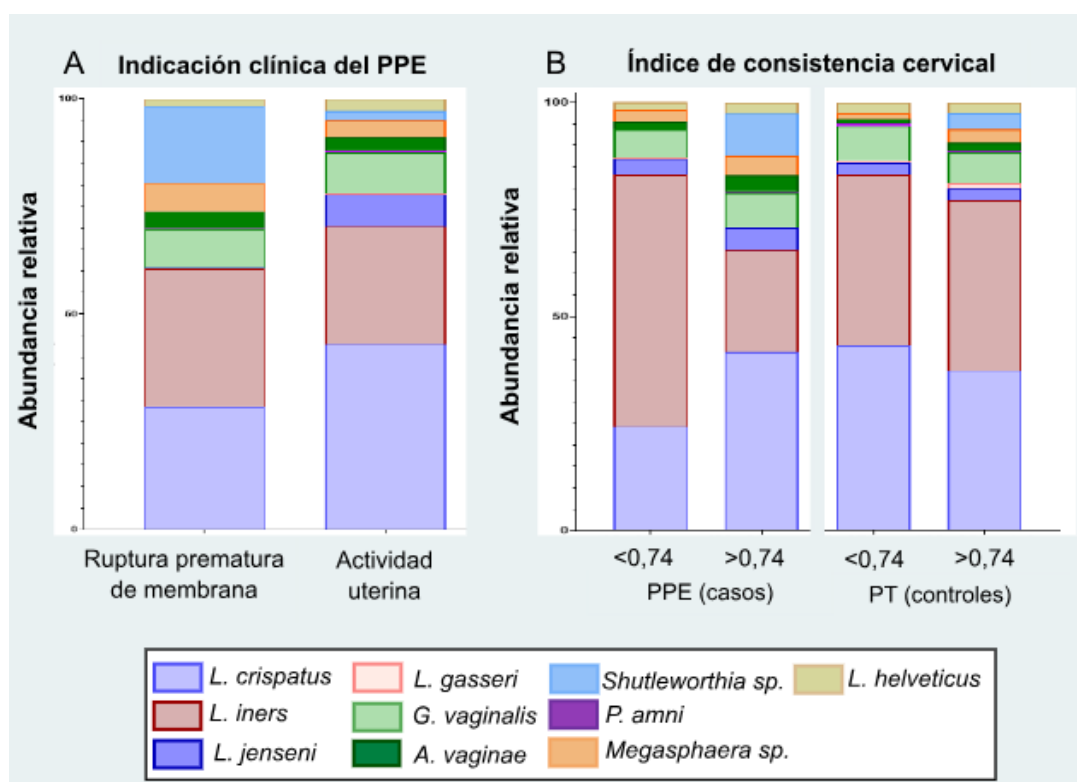
Nota: *Prueba Kruskal Wallis

Como análisis complementario, para observar el comportamiento de otras variables como la indicación clínica del PPE (RPM y actividad uterina) y el ICC, se hizo una comparación del promedio de las abundancias relativas de cada especie, para observar las tendencias de las abundancias relativas en cada uno de ellos (Figura 4).

En el caso de la indicación clínica, se puede resaltar que las pacientes con un PPE por RPM tienen la microbiota vaginal dominada en un 62,4% por especies de *Lactobacillus*, mientras que los casos de PPE por actividad uterina tiene un 80% de *Lactobacillus* en su microbiota. También es importante resaltar que *L. iners* tuvo el mayor porcentaje de abundancia en el grupo de RPM (32% vs 28%), mientras que *L. crispatus* tuvo un mayor porcentaje en el grupo de actividad uterina (43% vs 27%). Finalmente, se destaca que microorganismos de tipo anaerobio como *Megasphaera sp.* y *Shuttleworthia sp.* mostraron mayores porcentajes promedio de la abundancia en el grupo de RPM (6,5% y 17,8%).

Figura 4.

Abundancia relativa de especies de la microbiota vaginal clasificada por variables.



Nota: A) Clasificación del PPE según su indicación clínica por ruptura prematura de membranas o actividad uterina. *B)*, Clasificación del PPE y PT teniendo en cuenta el ICC (índice de consistencia cervical).

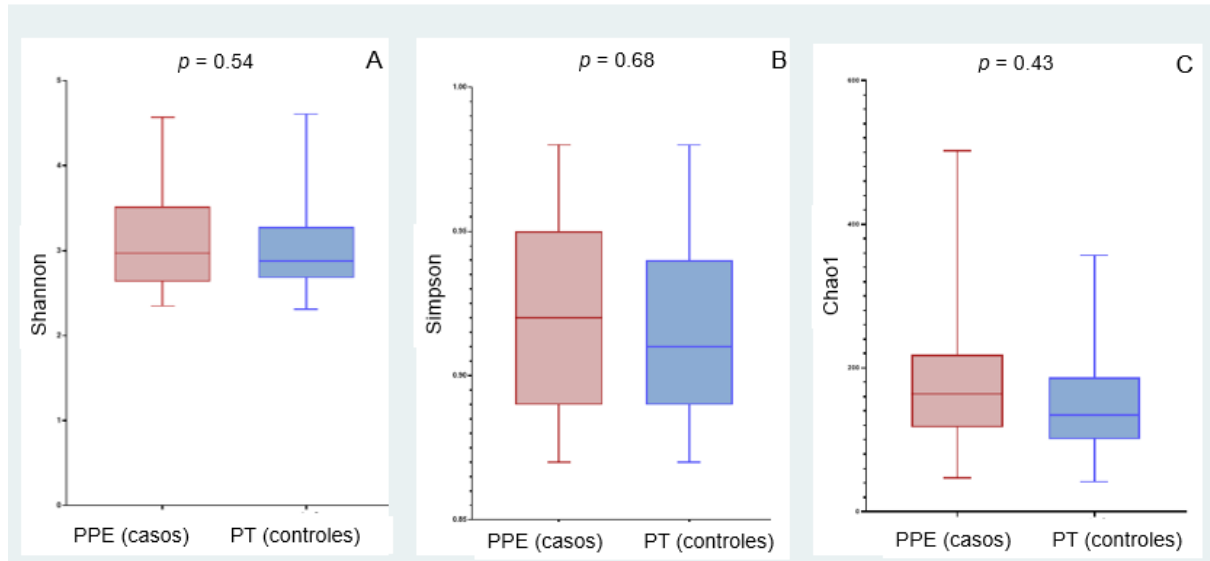
Con respecto al ICC, la variable se evaluó en las categorías de menor de 0,74 y mayor de 0,74 tanto para los casos como los controles. Este análisis se basó en estudios previos realizados en los proyectos macro de la Universidad Industrial de Santander (código 2542 y 2841), donde se demostró que un valor inferior a 0,74 se asociaba a los casos de PPE, principalmente aquellos con menos de 34 semanas (Becerra-Mojica., et al., 2024). En la microbiota se evidenció que el grupo de PPE con un ICC <0,74 presentó mayor abundancia relativa de *L. iners* (58,9%), en comparación con los demás grupos, y que *L. crispatus* se encuentra en menor proporción respecto a los demás grupos. Las medianas de las abundancias relativas de las especies en las variables indicación clínica e ICC no mostraron diferencias significativas con el test U de Mann-Whitney.

6.2.2 Diversidades alfa y beta

El test de normalidad para los diferentes índices de diversidad alfa calculados, mostró que los datos no tenían un comportamiento normal. La mediana en los diferentes índices de diversidad fue mayor en el grupo de PPE (Figura 5), sin embargo, La prueba U de Mann-Whitney no tuvo diferencias significativas entre los dos grupos de análisis.

Figura 5.

Índices de diversidad alfa para el grupo de PPE y PT

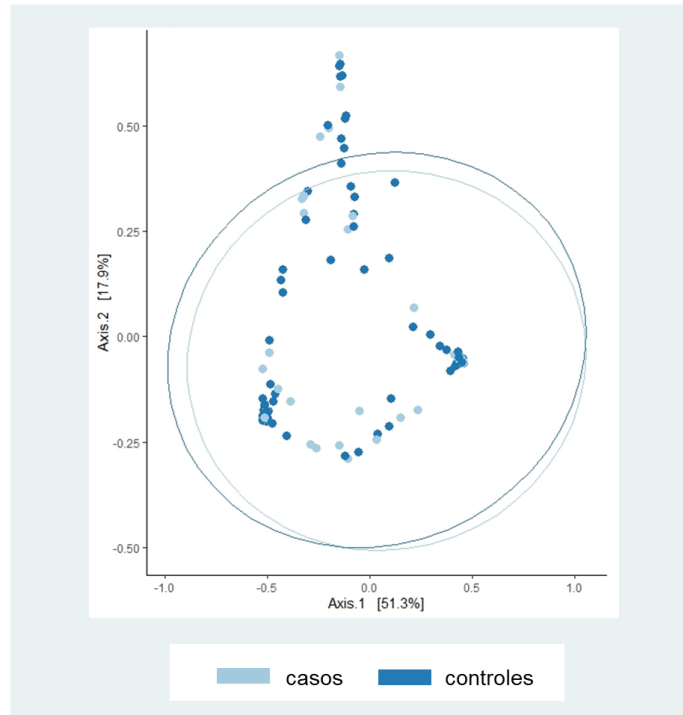


Nota: **A)** índice de Shannon. **B)** índice de Simpson. **C)** índice de Chao1.

La diversidad beta de la microbiota vaginal se evaluó calculando el índice de Bray Curtis, que mide la disimilitud entre los microorganismos presentes en el tracto vaginal entre dos grupos diferentes. Como se puede observar en la Figura 6, ninguno de los dos grupos muestra una tendencia de distribución de separación y el test estadístico no mostro diferencias significativas al hacer la comparación. (PERMANOVA p= 0.6091).

Figura 6.

Diversidad beta por índice de disimilitud de Bray Curtis representada en un análisis de coordenadas principales (PcoA).



6.3 Tipos de estado comunitario (CSTs) de la microbiota vaginal.

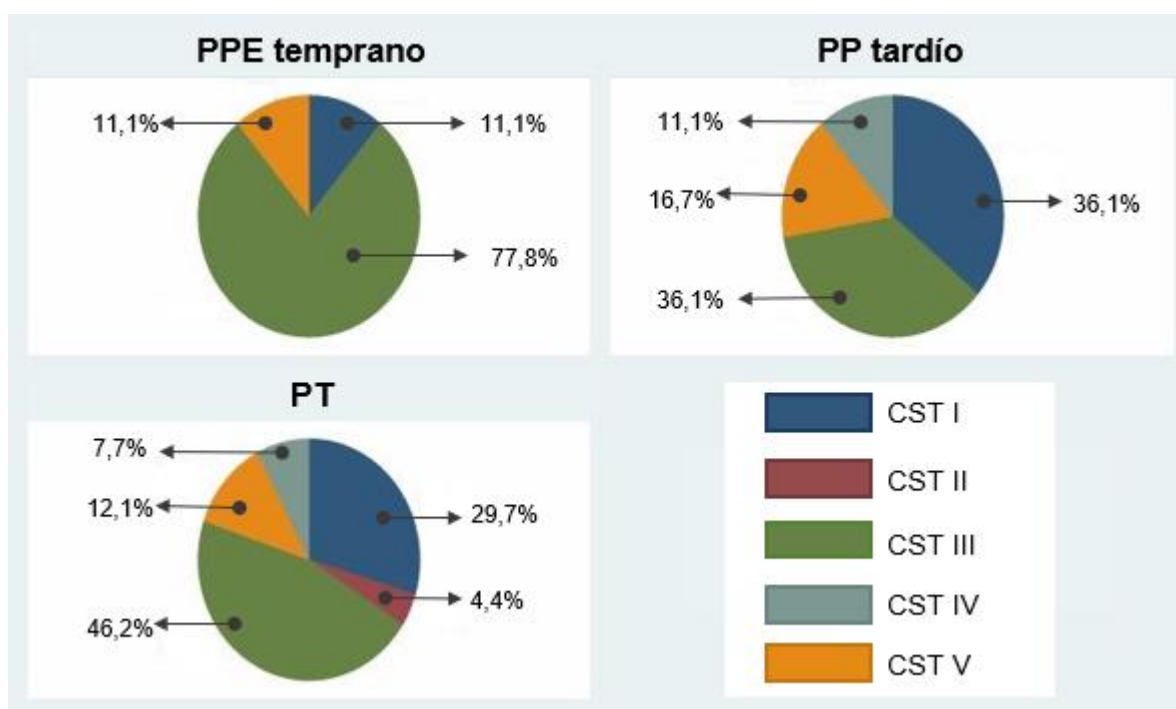
La agrupación jerárquica de los perfiles de microbiota vaginal dio como resultado la construcción de 5 tipos de estado comunitario, 4 de ellos con una dominancia de especies de *Lactobacillus*, con el CST I conformado por *L. crispatus*, CST II por *L. gasseri*, CST III por *L. iners* y, finalmente, el CST V por *L. jensenii*. Las especies anaerobias, *G. vaginalis* y *A. vaginae* se agruparon en el CST IV. La Figura 7 representa el porcentaje promedio de cada uno de los CSTs encontrados en los grupos PPE temprano, PPE tardío y PT. Como se puede observar, el CST I se encuentra en bajo proporción en el grupo del PPE antes de la 34 semanas de gestación (11,1%), mientras que para las categorías de PPE con más de 34 semanas y PT este grupo muestra la mayor proporción de esta especie (36,1% y 46.2% respectivamente). El CST III es el grupo predominante en los PPE temprano (77,2%) comparado con el PPE tardío y el PT. El porcentaje del CST I y CST

IV mostró la misma proporción en la categoría PPE(11,1%). (Figura 7).

La comparación de los diferentes estados comunitarios entre los grupos caso y control no mostraron diferencias significativas (prueba exacta de Fisher $p = 0,56$). Al hacer una agrupación de los PPE tardíos con los PT y comparar con el grupo PPE temprano se observa una $p = 0,08$, lo que sugiere que el tamaño de muestra puede ser aumentado para lograr obtener una diferencia entre los grupos.

Figura 7.

Perfiles de microbiota vaginal de mujeres que tuvieron PPE y PT representados en CSTs.



6.4 Comparación de la de la abundancia, las diversidades y los CSTs entre las mujeres con y sin parto prematuro espontáneo

Inicialmente se realizó una comparación del porcentaje de abundancia relativa entre los 45 casos de PPE y 91 controles de PP haciendo uso del test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Ninguno de los 10 taxones identificados a nivel de especies mostró diferencias significativas (Tabla 3). Solo las especies *P. amnii* y *Megashaera sp.* tuvieron un valor de p cercano a 0,05 (0,08 y 0,07, respectivamente).

Se tuvieron en cuenta los mismos taxones en la comparación de los grupos PPE temprano, PPE tardío y PT. La prueba U de Mann-Whitney aplicada mostró que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre la abundancia relativa de los tres grupos de mujeres analizados. Sin embargo, en el grupo de PP con menos de 34 semanas, se vio un marcado aumento de la abundancia de *L. iners* con una p de 0,07, que podría mejorarse aumentando el número de muestras para el análisis.

Se determinó la presencia y ausencia, tanto de las especies más abundantes como las menos abundantes en los grupos caso y control y se encontró que la especie *Fastidiosipila sp.* tuvo diferencia significativa ($p = 0,0302$), indicando mayor presencia de esta especie en los casos de PPE en comparación con el grupo de PT. Sin embargo, es importante destacar que la abundancia relativa de estos microorganismos en la microbiota vaginal corresponden a menos del 0,01% de la abundancia total.

En los índices usados para determinar la diversidad alfa y beta y los estados comunitarios identificados tampoco se evidenció alguna diferencia estadística al comparar los grupos PT y PPE, teniendo en cuenta la subclasificación en PPE temprano y tardío.

Con el fin de determinar si existía asociación de las variables clínicas analizadas y la abundancia relativa de las especies que se mostraron en mayor proporción en la microbiota vaginal con el PPE, se realizó una regresión logística condicional, entre cada una de estas variables

y el desenlace del PPE. Como variable clínica, solo el antecedente de PP mostro significancia, indicando que hay un mayor riesgo de desarrollar PP cuando la variable está presente (Tabla 7).

Tabla 7.

Asociación de las variables clínicas de las participantes incluidas con el PPE.

Variables clínicas	OR	IC 95%	<i>p</i> *
Edad gestacional semanas	1,37	0,84-2,21	0,21
Patologías durante el embarazo	1,43	0,51-4,00	0,48
Diabetes gestacional	1,44	0,34-6,11	0,62
Preeclampsia	1	0,18-5,45	1,00
Hipotiroidismo	2	0,28-14,2	0,49
ICC < 0,74	1,82	0,72-4,61	0,20
Tabaquismo previo	1	0,30-3,32	1,00
Antecedente PP			
No	ref		
Si	4,17	1,27-13,65	0,018
Primer embarazo	0,42	0,04-4,61	0,48

Respecto a la microbiota vaginal, se buscó asociación usando la abundancia relativa y sus respectivos quintiles y la presencia/ausencia de las especies bacterianas. No se evidencio ninguna asociación de riesgo entre la abundancia relativa con el PPE (Tabla 8) y en el análisis por quintiles, solo se observó asociación con *Megasphaera sp.* con el quintil 4 ($p= 0,03$) y una tendencia de asociación con el quintil 5 ($p= 0,09$).

Tabla 8.

Asociación entre la abundancia relativa de las especies que conforman la microbiota vaginal con el PPE

Abundancia relativa de especies	OR	IC 95%	<i>p</i> *
<i>L. crispatus</i>	0,99	0,99-1,01	0,93
<i>L. iners</i>	0,99	0,99-1,01	0,83
<i>L. jensenii</i>	1,55	0,46-5,22	0,48
<i>L. helvetivus</i>	0,77	0,37-1,62	0,50
<i>L. gasseri</i>	6,62	0,33-131,1	0,21
<i>G. vaginalis</i>	0,78	0,31-2,00	0,61
<i>Shuttleworthia sp</i>	0,30	0,008-11,23	0,51
<i>A. vaginae</i>	0,96	0,50-1,84	0,90
<i>Megasphaera sp</i>	1,84	0,27-12,72	0,54
<i>P. amnii</i>	0,89	0,03-23,87	0,94

Teniendo en cuenta el antecedente de PP y la abundancia relativa de *Megasphaera sp.* $\geq 0,014$, se realizó una regresión logística condicional entre estas variables asociadas y el PPE. Se encontró que, independientemente de la presencia de *Megasphaera sp.* $\geq 0,014$, el antecedente de PP fue una variable asociada al PPE.

De igual forma, *Megasphaera sp.* $\geq 0,014$ mostro una asociación significativa, indicando un mayor riesgo del PP cuando está presente (Tabla 9).

Tabla 9.

Asociación entre la presencia de las especies que conforman la microbiota vaginal con el PPE.

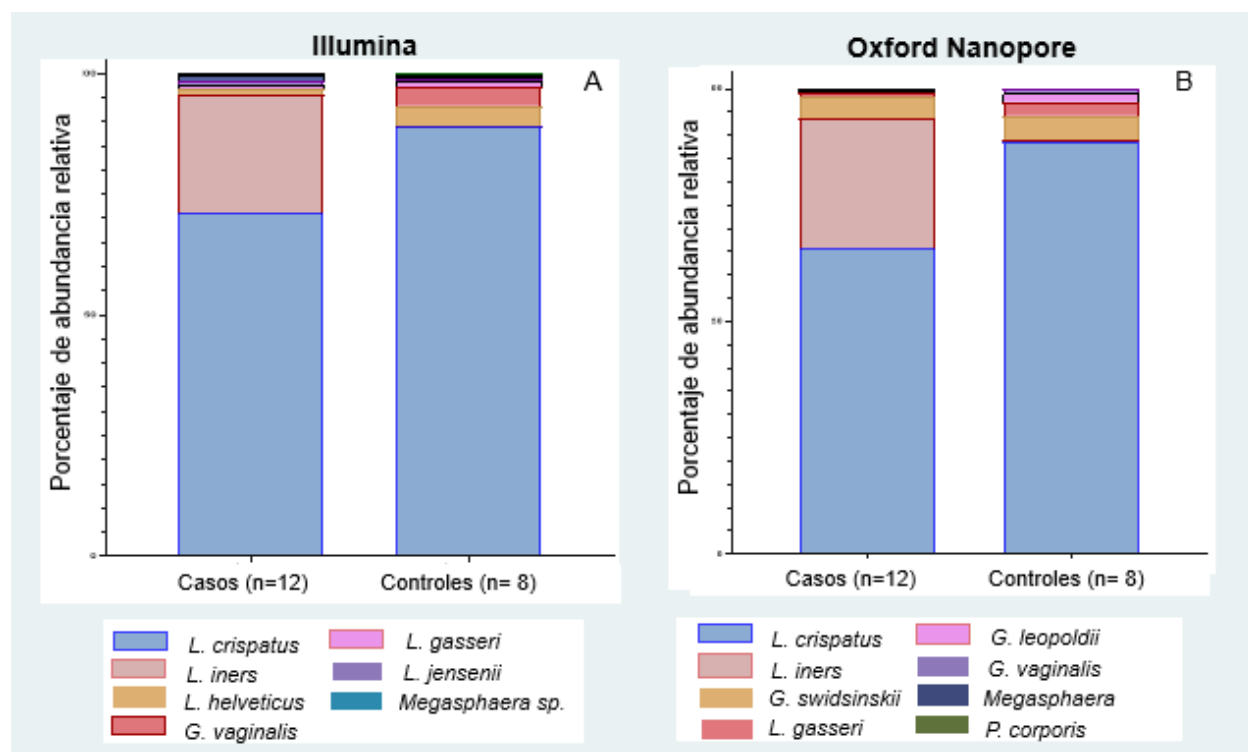
Variable	ORa	IC 95%	<i>p</i> *
Antecedente de PP			
No	ref		
Si	4,14	1,19-14,29	0,025
Primer embarazo	0,44	0,41-4,82	0,50
<i>Megasphaera sp.</i> $\geq 0,014$	2,98	1,32-6,74	0,009

6.5 Comparación de resultados obtenidos con dos tecnologías de NGS diferentes.

Como análisis complementario, se realizó la secuenciación de 12 casos y 8 controles haciendo uso de la tecnología de tercera generación de Oxford Nanopore. El diseño experimental permitió realizar la secuenciación de las regiones V1 a V9 del gen 16S rARN, y el cálculo de las abundancias relativas de las especies que se lograron inferir a partir del procesamiento de los datos.

Figura 8.

Abundancias relativas entre la tecnología de Oxford Nanopore e Illumina.

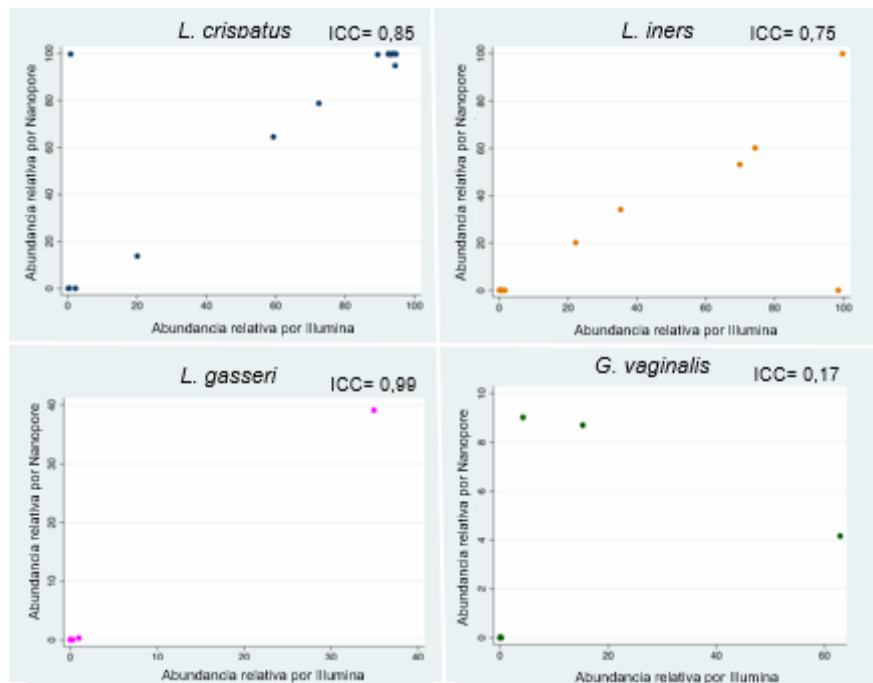


Las muestras analizadas por las dos tecnologías corresponden a los mismos casos y controles. Se incluyeron solo aquellos taxones que tuvieron una abundancia mayor al 1% (Figura 8).

Cinco de las especies más abundantes se identificaron en las dos tecnologías. Oxford Nanopore permitió identificar hasta nivel de especie a *M. lornae*. En ambas tecnologías, el taxón predominante en la composición de la microbiota vaginal fue *L. crispatus*, con una abundancia relativa superior al 70% en Illumina y 65% con Oxford Nanopore, teniendo en cuenta el total de las muestras analizadas. Adicionalmente, en ambas tecnologías se obtuvo una mayor proporción en la abundancia de *L. iners* en el grupo de PPE (Figura 8).

Figura 9.

Similitud de las abundancias relativas entre la tecnología de Oxford Nanopore e Illumina.



Al hacer la comparación de las abundancias relativas calculadas en cada muestra entre las tecnologías, se observó una alta correlación con las diferentes especies de Lactobacillus (Figura 9) y una correlación media con Megasphaera. Por el contrario, al analizar la abundancia

relativa de *G. vaginalis* en las dos tecnologías, se obtuvo un índice de correlación bajo (ICC= 0,17), indicando que hay diferencias en la identificación de esta especie.

7 Discusión

Este estudio evaluó la composición de la microbiota vaginal de muestras cervicovaginales, en 136 gestantes que se encontraban en el primer trimestre de embarazo de la ciudad de Bucaramanga y su área metropolitana, haciendo uso de secuenciación de segunda y tercera generación. Del total de las participantes, 45 tuvieron PPE y las 91 restantes PT. En el análisis se compararon la abundancia de taxones individuales identificados, los índices de diversidades alfa y beta y, los CSTs característicos.

Los datos se obtuvieron a partir de la secuenciación de la región V3-V4 del gen 16S rARN, ampliamente usado para la clasificación bacteriana (Bars-Cortina et al., 2023). No, obstante, la mayoría de los estudios relacionados con microbiota vaginal y PP que se han realizado desde el 2014, hicieron la clasificación taxonómica de la microbiota vaginal usando la información obtenida de las regiones V1-V2 y V1-V3 del gen 16S rARN (Romero et al., 2014; Sun et al., 2022). Se ha demostrado que la selección de la región variable puede afectar la capacidad de identificar especies bacterianas específicas (Pascoal et al., 2024) y evidencian que el uso de la región V3-V4 ofrece ventajas significativas para el estudio de comunidades microbianas, ya que proporciona una mejor resolución para identificar la diversidad y precisión en la identificación de bacterias (Fadeev et al., 2021). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la información obtenida corresponde a un fragmento del gen completo y para mejorar la resolución taxonómica de niveles taxonómicos más específicos se podría tener en cuenta la amplificación de varias regiones o el

gen completo (Fuks et al., 2018). Las investigaciones de microbiota vaginal y PP, de los últimos 2 años, han secuenciado la región V3-V4 del gen (Park et al., 2022; Schuster et al., 2024).

Otra de las diferencias entre los estudios realizados previamente es la clasificación de las secuencias obtenidas en OTUs, que realiza su agrupamiento basado en un umbral de similitud entre las secuencias obtenidas y tiene como desventaja el agrupamiento erróneo de las diferencias en las secuencias y el no identificar adecuadamente variaciones dentro de una misma especie. Por tal razón, se han empezado a implementar como nuevo método la clasificación de secuencias por ASVs, que tienen la capacidad de representar diferencias exactas, mejorando la resolución taxonómica y la exactitud de las variantes presentes en una muestra (B. J. Callahan, McMurdie, et al., 2017).

La asignación taxonómica de los ASVs identificados se realizó usando la base de datos Silva 138.1, que reúne una colección de secuencias de ARN ribosomal de organismos procariotas y eucariotas actualizada, y que es usada principalmente para análisis taxonómicos de datos obtenidos por secuenciación del gen 16S rARN (6.10). Debido a que esta versión de la base de datos no incluye *L. crispatus*, todas las secuencias de *Lactobacillus* sin asignación de especie se alinearon con la función Nucleotide BLAST (BLASTn) en el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica NCBI y adicionalmente se confirmó la asignación taxonómica de las especies que se mostraron como representativas en la microbiota vaginal (Schuster et al., 2024). Como ultimo filtro de calidad se analizaron únicamente aquellas muestras que hayan obtenido una profundidad de secuenciación superior a 10,000 lecturas, según lo sugerido por la literatura

para garantizar que se capture la diversidad microbiana de manera efectiva (Bars-Cortina et al., 2023).

En los resultados obtenidos, se encontró que la microbiota vaginal estaba conformada principalmente por especies del género *Lactobacillus*, tanto para el grupo de PPE como PT. De igual forma, en ambos grupos el segundo género más abundante fue *Gardnerella*, representando un 7.7% de la abundancia relativa. En este estudio, se identificó el género *Shuttleworthia* y se posicionó como el tercero más abundante en la microbiota vaginal (4,6%). Los demás géneros identificados corresponden a taxones con bacterias de tipo anaerobio que se han asociado fuertemente con VB como *Atopobium*, *Megasphaera* y *Prevotella*, que por debajo del 3% de la abundancia relativa general. Durante el embarazo, la vaginosis bacteriana se asocia con resultados adversos como enfermedad inflamatoria pélvica, aborto espontáneo el PP (Redelinguys et al., 2020). Adicionalmente, cuando hay una disminución de especies de *Lactobacillus* en la microbiota vaginal se favorece la colonización de estos patógenos en el epitelio del tracto vaginal (Redelinguys et al., 2020).

En el caso de *Megasphaera sp.*, los estudios que identifican este microorganismo lo reportan hasta nivel de género o por la agrupación de las secuencias obtenidas por OTUs (B. J. Callahan, DiGiulio, et al., 2017; J. M. Fettweis et al., 2019) y los resultados no son uniformes respecto a su aumento en los casos de PP (B. J. Callahan, DiGiulio, et al., 2017; Nelson et al., 2014), sin embargo, también se ha estudiado su actividad transcriptómica, mostrando ser más alta en comparación con sus niveles de abundancia relativa, y adicionalmente, con una asociación

positiva con citoquinas proinflamatorias, indicando que este microorganismo está altamente activo en la microbiota vaginal (J. M. Fettweis et al., 2019).

El análisis de taxones hasta nivel de especie se hizo basado en los datos obtenidos de la asignación taxonómica de DADA2 y confirmando con el programa BLASTn. Tanto para el grupo de PPE como el de PT, *L. crispatus* y *L. iners* tuvieron un porcentaje de abundancia relativa en conjunto del 74% y 83.9% respectivamente, siendo los dos microorganismos dominantes en la composición de la microbiota. Estudios previos también han encontrado a las especies *L. crispatus* y *L. iners* predominando la microbiota vaginal de forma similar a nuestros resultados (Hyman et al., 2014; Stout et al., 2017). En nuestro caso, al hacer el análisis a nivel de taxón por grupos, se observó que había una mayor abundancia relativa de *L. iners* en el grupo control mientras que *L. crispatus* fue mayor en los casos: sin embargo, las pruebas estadísticas aplicadas no mostraron diferencias significativas al hacer la comparación.

Los estudios realizados hasta la fecha sobre la composición de la microbiota vaginal y el embarazo, han obtenido resultados diversos y los cambios encontrados en muchas investigaciones no son constantes (R. Romero et al., 2022). Gran parte de la información reportada no ha encontrado diferencias significativas en las variables comúnmente estudiadas como la abundancia relativa de taxones, diversidades alfa, beta, y CSTs (Nelson et al., 2016; Romero et al., 2014). Las dificultades en la unificación de los resultados están asociadas principalmente con las diferencias de las variables de las pacientes incluidas en los estudios, como el tamaño de muestra, la edad gestacional de la toma de muestra, la etnia, y definición del PP (R. Romero et al., 2022). Adicionalmente, las herramientas bioinformáticas con las que se

desarrollaron los diferentes estudios pueden contribuir a la diversidad de la información (R. Romero et al., 2022).

Al realizar una subclasificación del PPE se logra obtener una mejor discriminación de los taxones dominantes y como resultado se observa que *L. iners* es la principal especie entre el género *Lactobacillus*, con una mediana de 66,00 (23,54 - 98,00) y a pesar de no mostrar diferencias significativas tuvo p valor de 0,07. Las principales razones que explican este comportamiento pueden estar asociadas con la alta variabilidad de los datos de la abundancia relativa y un tamaño de muestra insuficiente en el grupo de PPE menor a 34 semanas. *L. crispatus* se observó en una menor abundancia relativa (mediana de abundancia relativa de 0,81 (0,55-10,11)), comparada con los otros dos grupos, pero sin mostrar diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,54$).

En los últimos años se ha confirmado que la abundancia de especies de *Lactobacillus* difiere en los casos de PP y PT, principalmente con una depleción en la abundancia de *L. crispatus* en casos de PP y una predominancia casi total de esta especie en el PT (Gudnadottir et al., 2022). Adicionalmente, se ha destacado la importancia de evaluar el PP según la edad gestacional y hacer una clasificación en PPE temprano y tardío (Huang et al., 2023). La revisión sistemática y meta-análisis realizada por U. Gudnadottir et al. en la que calcularon intervalos de confianza y OR para determinar si la información de la microbiota vaginal de 17 estudios longitudinales publicados entre el 2014 y el 2021 tenía asociación con un mayor riesgo de PP. Se encontró que la categoría denominada “*Lactobacillus* bajos” estaba en mayor proporción en los PP y que el riesgo de PP es hasta 1.79 más alto en las pacientes con una baja abundancia de *Lactobacillus* en

su microbiota vaginal en comparación con una alta abundancia de *L. crispatus* (Gudnadottir et al., 2022).

La información de la asociación entre la abundancia de *L. iners* como predominante en la microbiota vaginal de mujeres que tuvieron un PPE es más diversa y no ha permitido llegar a una conclusión clara sobre su papel en el parto prematuro. En 2017, L. Kindinger et al. realizó una de los primeros estudios subclasificado el PP en donde evaluó la composición de la microbiota vaginal en semana 16 del embarazo en un grupo de 34 mujeres con PPE y 127 mujeres con PT. Los resultados mostraron diferencias importantes en las comunidades microbianas vaginales específicamente en la mujeres que dieron a luz con menos de 34 semanas de gestación, las cuales tenía una microbiota dominada por *L. iners* (67%), mientras que *L. crispatus* se asoció principalmente al grupo de PT (46%) (Kindinger et al., 2017). De manera similar, un estudio del 2019 realizado por J. Fettweis y colaboradores, que incluyó 45 casos de PPE menores a 32 semanas y 90 casos de PT mayores a 39 semanas de gestación, encontró que *L. crispatus* era predominante en la microbiota vaginal de las mujeres con PT ($p= 0.014$), mientras que *L. iners* presentó una baja abundancia. En dicho estudio, no se encontró una asociación directa con las mujeres del grupo de PP; sin embargo, se evidenció que *L. iners* tuvo una correlación positiva con niveles elevados de IP-10/CXCL10, quimioquina cuya función es inducir la quimiotaxis de las células inmunes y promover la apoptosis, el crecimiento celular, la angiostasis y generalmente se considera proinflamatoria (J. M. Fettweis et al., 2019).

L. iners aparentemente proporciona un entorno mucoso vaginal permisible para la colonización por patógenos asociados a VB, permitiendo la coexistencia con estos patógenos, además de inducir la secreción de citocinas proinflamatorias (Kindinger et al., 2017).

Además de las especies de *Lactobacillus*, otros taxones de interés clínico se han estudiado para intentar asociarlos a un mayor riesgo de PP como es el caso de las bacterias implicadas en la VB, sin embargo, no todos los estudios han logrado demostrar una asociación con estos taxones (Stout et al., 2017) y aquellos que han encontrado mayor abundancia, no han identificado las mismas especies bacterianas. Shi y colaboradores en 2020 identificaron a *Ureaplasma* en abundancias significativamente mayores en el grupo de PP (Shi et al., 2020), mientras que M. Elovitz y colaboradores en 2019 identificaron siete taxones bacterianos con diferencias estadísticas entre el grupo de mujeres con parto menor a 37 semanas entre los que se incluyen *M. curtsii/mulieris*, *S. sanguinegens*, *Atopobium* y *Megasphaera* (Elovitz et al., 2019). Una de las principales especies analizadas en la asociación de mayor riesgo de PPE ha sido *G. vaginalis* por ser la principal causante de VB; sin embargo, los resultados tampoco muestran uniformidad y muchos no han encontrado evidencia clara de su contribución con el PP (Huang et al., 2023). En los resultados obtenidos en este estudio, los taxones asociados a VB identificados fueron *G. vaginalis*, *P. amnii*, *A. vaginae* y *Megasphaera sp.*, sin observar diferencias significativas, pero con una *p* cercana a 0,05 en los taxones *P. amnii* y *Megasphaera sp* ($p= 0,08$ y $p= 0,07$ respectivamente).

Para la clasificación de la microbiota vaginal en CSTs se usó el programa VALENCIA, un clasificador que utiliza secuencias del gen 16S rARN según las especies bacterianas dominantes y se ha implementado en los últimos estudios de microbiota vaginal y PP (19,77, 4.36). Se

identificaron los 5 CSTs característicos, con el CST I conformado por *L. crispatus*, CST II por *L. gasseri*, CST III por *L. iners*, CST V por *L. jensenii* y el CST IV conformado por *G. vaginalis*, *P. amnii* y *A. vaginae*. A pesar que los casos de PPE temprano estaban dominados en gran proporción por el CST III, no se observaron diferencias estadísticamente significativas con los grupos PPE tardío y PT (prueba exacta de Fisher: $p= 0,56$). El CST IV se mostró con un porcentaje similar en los 3 grupos, indicando que la microbiota vaginal de mujeres en primer trimestre de embarazo no tiene diferencias en su composición con respecto a microorganismos anaerobios asociados a VB.

Con respecto a la diversidad de la microbiota vaginal de los casos y controles de nuestro estudio, no se encontró ninguna diferencia significativa, tanto para los índices de diversidad alfa como el índice de diversidad beta, lo que significa que la composición de la microbiota vaginal en mujeres con PPE y PT tiene una estructura similar en el primer trimestre de embarazo, equivalente a lo observado en otros estudios (DiGiulio et al., 2015; Nelson et al., 2016; Stout et al., 2017). Aquellos estudios que identificaron diferencias significativas han evaluado la diversidad en una edad gestacional del embarazo diferente o tienen una dominancia de mujeres de etnia afroamericana en sus estudios.

8 Conclusiones

La microbiota vaginal en mujeres gestantes en semana 11 a 13 de embarazo de la ciudad de Bucaramanga y el área metropolitana tiene una dominancia de especies del género *Lactobacillus*, principalmente *L. crispatus*, tanto en el grupo de PPE (casos) como en el grupo de PT (control).

No existen diferencias significativas en la composición de la microbiota vaginal al evaluar las abundancias relativas las especies más representativas, las diversidades alfa y beta y los CSTs entre los grupos PPE y PT.

La subclasificación del PPE según su edad gestacional muestra una tendencia diferencial en la composición de la microbiota vaginal en las pacientes con PPE temprano, con una abundancia relativa de *L. iners* mayor en comparación con los grupos PPE tardío y PT, pero sin diferencias estadísticamente significativas en la cohorte analizada.

Hay una asociación significativa entre el antecedente de PP y la abundancia relativa de *Megasphaera sp.* y el PPE.

Referencias bibliográficas

- Aagaard, K. , R. K. , M. J. , S. N. , M. T.-A. , C. C. , R. S. , R. S. , V. den V. I. , M. A. , G. D. , H. C. , P. J. , & V. J. (2012). A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. . *PloS One*, 7(6).
- Ananth, C. V., Joseph, K. S., Oyelese, Y., & Vintzileos, A. M. (2005). Trends in preterm birth and perinatal mortality among singletons: united states, 1989 through 2000. *Obstetrics and Gynecology*, 105(5), 1084–1091. <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000158124.96300.c7>
- Babraham bioinformatics Fast QC. (n.d.). *Babraham institute*.
- Barfield, W. D. (2018). Public Health Implications of Very Preterm Birth. In *Clinics in Perinatology* (Vol. 45, Issue 3, pp. 565–577). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2018.05.007>

- Barrientos-Durán, A., Fuentes-López, A., de Salazar, A., Plaza-Díaz, J., & García, F. (2020). Reviewing the composition of vaginal microbiota: Inclusion of nutrition and probiotic factors in the maintenance of eubiosis. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu12020419>
- Bars-Cortina, D., Moratalla-Navarro, F., García-Serrano, A., Mach, N., Riobó-Mayo, L., Veá-Barbany, J., Rius-Sansalvador, B., Murcia, S., Obón-Santacana, M., & Moreno, V. (2023). Improving Species Level-taxonomic Assignment from 16S rRNA Sequencing Technologies. *Current Protocols*, 3(11). <https://doi.org/10.1002/cpz1.930>
- Becerra-Mojica, C. H. , P.-S. M. A. , M.-V. R. A. , D.-M. L. A. , M.-P. R. J. , T.-T. J. , & R.-O. B. (2024). Performance of the First-Trimester Cervical Consistency Index to Predict Preterm Birth. *Journal of Clinical Medicine*, 13(13), 3906.
- Blencowe, H., Cousens, S., Oestergaard, M. Z., Chou, D., Moller, A. B., Narwal, R., Adler, A., Vera Garcia, C., Rohde, S., Say, L., & Lawn, J. E. (2012). National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: A systematic analysis and implications. *The Lancet*, 379(9832), 2162–2172. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60820-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60820-4)
- Blumenshine, P. , E. S. , B. C. J. , C. C. , & B. P. A. (2010). Socioeconomic disparities in adverse birth outcomes: a systematic review. *American Journal of Preventive Medicine*.
- Callahan, B. J. , M. P. J. , R. M. J. , H. A. W. , J. A. J. A. , & H. S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583.
- Callahan, B. J., DiGiulio, D. B., Aliaga Goltsman, D. S., Sun, C. L., Costello, E. K., Jeganathan, P., Biggio, J. R., Wong, R. J., Druzin, M. L., Shaw, G. M., Stevenson, D. K., Holmes, S. P., & Relman, D. A. (2017). Replication and refinement of a vaginal microbial signature of preterm birth in two racially

- distinct cohorts of US women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(37), 9966–9971. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705899114>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME Journal*, *11*(12), 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Carvajal, J. A., María, D., & Barriga, I. (2017). *OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA*.
- Chang, D. H., Shin, J., Rhee, M. S., Park, K. R., Cho, B. K., Lee, S. K., & Kim, B. C. (2020). Vaginal microbiota profiles of native Korean women and associations with high-risk pregnancy. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*(2), 248–258. <https://doi.org/10.4014/jmb.1908.08016>
- Chawanpaiboon, S., Vogel, J. P., Moller, A. B., Lumbiganon, P., Petzold, M., Hogan, D., Landoulsi, S., Jampathong, N., Kongwattanakul, K., Laopaiboon, M., Lewis, C., Rattanakanokchai, S., Teng, D. N., Thinkhamrop, J., Watananirun, K., Zhang, J., Zhou, W., & Gülmezoglu, A. M. (2019). Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis. *The Lancet Global Health*, *7*(1), e37–e46. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(18\)30451-0](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(18)30451-0)
- Cook, J., Bennett, P. R., Kim, S. H., Teoh, T. G., Sykes, L., Kindinger, L. M., Garrett, A., Binkhamis, R., MacIntyre, D. A., & Terzidou, V. (2019). First Trimester Circulating MicroRNA Biomarkers Predictive of Subsequent Preterm Delivery and Cervical Shortening. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42166-1>
- Couceiro, J., Matos, I., Mendes, J. J., Baptista, P. V., Fernandes, A. R., & Quintas, A. (2021). Inflammatory factors, genetic variants, and predisposition for preterm birth. In *Clinical Genetics* (Vol. 100, Issue 4, pp. 357–367). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/cge.14001>

- Cruickshank, R. , & S. A. (1934). The biology of the vagina in the human subject. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*.
- Dane. (n.d.). *Boletín Técnico Estadísticas Vitales (EEVV)*. Retrieved May 6, 2023, from <https://www.dane.gov.co/files/operaciones/EEVV/pres-EEVV-Iltrim2023.pdf>
- Dethlefsen, L. , M.-N. M. , & R. D. A. (2007). An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. *Nature*, *449*(7164), 811–818.
- Di Tommaso, P. , C. M. , F. E. W. , B. P. P. , P. E. , & N. C. (2017). Nextflow enables reproducible computational workflows. *Nature Biotechnology*, *35*(4), 316–319.
- DiGiulio, D. B., Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Costello, E. K., Lyell, D. J., Robaczewska, A., Sun, C. L., Goltsman, D. S. A., Wong, R. J., Shawa, G., Stevenson, D. K., Holmes, S. P., & Relman, D. A. (2015). Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(35), 11060–11065. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502875112>
- D’Silva, A. M., Hyett, J. A., & Coorsen, J. R. (2018). Proteomic analysis of first trimester maternal serum to identify candidate biomarkers potentially predictive of spontaneous preterm birth. *Journal of Proteomics*, *178*, 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.02.002>
- Dunlop, A. L., Satten, G. A., Hu, Y. J., Knight, A. K., Hill, C. C., Wright, M. L., Smith, A. K., Read, T. D., Pearce, B. D., & Corwin, E. J. (2021). Vaginal Microbiome Composition in Early Pregnancy and Risk of Spontaneous Preterm and Early Term Birth Among African American Women. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.641005>

- Elovitz, M. A., Gajer, P., Riis, V., Brown, A. G., Humphrys, M. S., Holm, J. B., & Ravel, J. (2019). Cervicovaginal microbiota and local immune response modulate the risk of spontaneous preterm delivery. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09285-9>
- Erchick, D. J. , K. S. K. , A. N. K. , K. J. , L. S. C. , R. B. , R. M. A. , & M. L. C. (2020). Risk of preterm birth associated with maternal gingival inflammation and oral hygiene behaviours in rural Nepal: a community-based, prospective cohort study. *BMJ Open*.
- Fadeev, E., Cardozo-Mino, M. G., Rapp, J. Z., Bienhold, C., Salter, I., Salman-Carvalho, V., Molari, M., Tegetmeyer, H. E., Buttigieg, P. L., & Boetius, A. (2021). Comparison of Two 16S rRNA Primers (V3–V4 and V4–V5) for Studies of Arctic Microbial Communities. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.637526>
- Fettweis, J. M. , B. J. P. , S. M. G. , S. N. U. , G. P. H. , E. D. J. , S. J. F. , T. V. M. C. J. K. K. , & B. G. A. (2014). Differences in vaginal microbiome in African American women versus women of European ancestry. *Microbiology*.
- Fettweis, J. M., Serrano, M. G., Brooks, J. P., Edwards, D. J., Girerd, P. H., Parikh, H. I., Huang, B., Arodz, T. J., Edupuganti, L., Glascock, A. L., Xu, J., Jimenez, N. R., Vivadelli, S. C., Fong, S. S., Sheth, N. U., Jean, S., Lee, V., Bokhari, Y. A., Lara, A. M., ... Buck, G. A. (2019). The vaginal microbiome and preterm birth. *Nature Medicine*, *25*(6), 1012–1021. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0450-2>
- France, M. T. , M. B. , G. P. , B. S. , H. M. S. , H. J. B. , . . . & R. J. (2020). VALENCIA: a nearest centroid classification method for vaginal microbial communities based on composition. *Microbiome*, *8*, 1–15.
- Fredricks, D. N. , F. T. L. , & M. J. M. (2005). Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *New England Journal of Medicine*, *353*(18), 1899–1911.

- Freitas, A. C., Bocking, A., Hill, J. E., & Money, D. M. (2018). Increased richness and diversity of the vaginal microbiota and spontaneous preterm birth. *Microbiome*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0502-8>
- Frey, H. A., & Klebanoff, M. A. (2016). The epidemiology, etiology, and costs of preterm birth. In *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* (Vol. 21, Issue 2, pp. 68–73). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2015.12.011>
- Fuks, G., Elgart, M., Amir, A., Zeisel, A., Turnbaugh, P. J., Soen, Y., & Shental, N. (2018). Combining 16S rRNA gene variable regions enables high-resolution microbial community profiling. *Microbiome*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0396-x>
- Gajer, P., Brotman, R. M., Bai, G., Sakamoto, J., Schütte, U. M. E., Zhong, X., Koenig, S. S. K., Fu, L., Ma, Z. S., Zhou, X., Abdo, Z., Forney, L. J., & Ravel, J. (2012). *Temporal Dynamics of the Human Vaginal Microbiota*. www.ScienceTranslationalMedicine.org
- Goldenberg, R. L., Culhane, J. F., Iams, J. D., & Romero, R. (2008). Preterm Birth 1 Epidemiology and causes of preterm birth. In *www.thelancet.com* (Vol. 371). www.thelancet.com
- Gómez-Rodríguez, L. del C., Campo-Urbina, M. L., Ortega-Ariza, N., Bettin-Martínez, A., & Parody-Muñoz, A. (2019). Prevalence of potentially pathogenic microbiological agents in vaginal exudates of asymptomatic pregnant women, Barranquilla, Colombia, 2014-2015. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 70(1), 49–56. <https://doi.org/10.18597/rcog.3183>
- Gudnadottir, U., Debelius, J. W., Du, J., Hugerth, L. W., Danielsson, H., Schuppe-Koistinen, I., Fransson, E., & Brusselaers, N. (2022). The vaginal microbiome and the risk of preterm birth: a systematic review and network meta-analysis. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12007-9>

- Hall, M. , & Beiko, R. G (2018). 16S rRNA gene analysis with QIIME2. *Microbiome Analysis: Methods and Protocols*, 113–129.
- Hernández, M. , Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., & Eiros, J. M. (2020). Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. *Revista Argentina de Microbiología*.
- Huang, C., Gin, C., Fettweis, J., Foxman, B., Gelaye, B., MacIntyre, D. A., Subramaniam, A., Fraser, W., Tabatabaei, N., & Callahan, B. (2023). Meta-analysis reveals the vaginal microbiome is a better predictor of earlier than later preterm birth. *BMC Biology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-023-01702-2>
- Hyman, R. W., Fukushima, M., Jiang, H., Fung, E., Rand, L., Johnson, B., Vo, K. C., Caughey, A. B., Hilton, J. F., Davis, R. W., & Giudice, L. C. (2014). Diversity of the vaginal microbiome correlates with preterm birth. *Reproductive Sciences*, 21(1), 32–40. <https://doi.org/10.1177/1933719113488838>
- Instituto Nacional de Salud. (2023). *Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico semanal*. https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2023_Boletin_epidemiologico_semana_8.pdf
- Kindinger, L. M., Bennett, P. R., Lee, Y. S., Marchesi, J. R., Smith, A., Cacciatore, S., Holmes, E., Nicholson, J. K., Teoh, T. G., & MacIntyre, D. A. (2017). The interaction between vaginal microbiota, cervical length, and vaginal progesterone treatment for preterm birth risk. *Microbiome*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0223-9>
- Laelago, T., Yohannes, T., & Tsige, G. (2020). Determinants of preterm birth among mothers who gave birth in East Africa: Systematic review and meta-analysis. In *Italian Journal of Pediatrics* (Vol. 46, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13052-020-0772-1>

- Lamont, R. F. , Sobel, J. D., Akins, R. A., Hassan, S. S., Chaiworapongsa, T., Kusanovic, J. P., & Romero, R. (2011). The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*.
- Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., & Huttenhower, C. (2016). The healthy human microbiome. In *Genome Medicine* (Vol. 8, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0307-y>
- Lockwood, C. J. , Senyei, A. E., Dische, M. R., Casal, D., Shah, K. D., Thung, S. N., Jones, L., Deligdisch, L., & Garite, T. J. (1991). Fetal fibronectin in cervical and vaginal secretions as a predictor of preterm delivery. *The New England Journal of Medicine*.
- Macones, G. A. , Parry, S., Elkousy, M., Clothier, B., Ural, S. H., & Strauss III, J. F. (2004). A polymorphism in the promoter region of TNF and bacterial vaginosis: preliminary evidence of gene-environment interaction in the etiology of spontaneous preterm birth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*.
- Marchesi, J. R. , & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*.
- Margerison-Zilko, C., Cubbin, C., Jun, J., Marchi, K., Fingar, K., & Braveman, P. (2015). Beyond the cross-sectional: Neighborhood poverty histories and preterm birth. *American Journal of Public Health*, 105(6), 1174–1180. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2014.302441>
- Martin, M. (2011). Cutadapt Removes Adapter Sequences from High-Throughput Sequencing Reads. *EMBnet Journal*. *EMBnet Journal*, 17, 10–12.
- Menon, R. (2008). Spontaneous preterm birth, a clinical dilemma: Etiologic, pathophysiologic and genetic heterogeneities and racial disparity. In *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* (Vol. 87, Issue 6, pp. 590–600). <https://doi.org/10.1080/00016340802005126>

- Monangi, N. K. , Brockway, H. M., House, M., Zhang, G., & Muglia, L. J. (2015). The genetics of preterm birth: Progress and promise. *In Seminars in Perinatology*.
- Mwaniki, M. K., Atieno, M., Lawn, J. E., & Newton, C. R. J. C. (2012). Long-term neurodevelopmental outcomes after intrauterine and neonatal insults: a systematic review. *Www.TheLancet.Com*, 379, 445–452. <https://doi.org/10.1016/S0140>
- Nagy, E. , Fröman, G., & Mårdh, P. A. (1992). Fibronectin binding of Lactobacillus species isolated from women with and without bacterial vaginosis. *Journal of Medical Microbiology*.
- NCBI blastn. (n.d.). *NCBI blastn*. Retrieved November 7, 2024, from 92. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch
- Nelson, D. B., Hanlon, A., Nachamkin, I., Haggerty, C., Mastrogiannis, D. S., Liu, C., & Fredricks, D. N. (2014). Early pregnancy changes in bacterial vaginosis-associated bacteria and preterm delivery. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 28(2), 88–96. <https://doi.org/10.1111/ppe.12106>
- Nelson, D. B., Shin, H., Wu, J., & Dominguez-Bello, M. G. (2016). The Gestational Vaginal Microbiome and Spontaneous Preterm Birth among Nulliparous African American Women. *American Journal of Perinatology*, 33(9), 887–893. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1581057>
- NEXTFLEX 16S. (n.d.). *NEXTFLEX 16S V3 – V4 Amplicon-Seq Library Prep Kit*. NEXTFLEX 16S V3 – V4 Amplicon-Seq Library Prep Kit.
- Park, S., Moon, J., Kang, N., Kim, Y. H., You, Y. A., Kwon, E., Ansari, A. Z., Hur, Y. M., Park, T., & Kim, Y. J. (2022). Predicting preterm birth through vaginal microbiota, cervical length, and WBC using a machine learning model. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.912853>

- Pascoal, F., Duarte, P., Assmy, P., Costa, R., & Magalhães, C. (2024). Full-length 16S rRNA gene sequencing combined with adequate database selection improves the description of Arctic marine prokaryotic communities. *Annals of Microbiology*, 74(1). <https://doi.org/10.1186/s13213-024-01767-6>
- Peelen, M. J., Luef, B. M., Lamont, R. F., de Milliano, I., Jensen, J. S., Limpens, J., Hajenius, P. J., Jørgensen, J. S., & Menon, R. (2019). The influence of the vaginal microbiota on preterm birth: A systematic review and recommendations for a minimum dataset for future research. In *Placenta* (Vol. 79, pp. 30–39). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.03.011>
- Peter Van Dorsten, J., Steve, M. D., Caritis, N., Gary, M. D., & Thurnau, R. (1996). THE LENGTH OF THE CERVIX AND THE RISK OF SPONTANEOUS PREMATURE DELIVERY. In *Massachusetts Medical Society. Other contributing authors were Menachem Miodovnik* (Vol. 334).
- Phillips, C., Velji, Z., Hanly, C., & Metcalfe, A. (2017). Risk of recurrent spontaneous preterm birth: A systematic review and meta-analysis. In *BMJ Open* (Vol. 7, Issue 6). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-015402>
- Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S. K., McCulle, S. L., Karlebach, S., Gorle, R., Russell, J., Tacket, C. O., Brotman, R. M., Davis, C. C., Ault, K., Peralta, L., & Forney, L. J. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(SUPPL. 1), 4680–4687. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002611107>
- Redelinghuys, M. J., Geldenhuys, J., Jung, H., & Kock, M. M. (2020). Bacterial Vaginosis: Current Diagnostic Avenues and Future Opportunities. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00354>

- Regueira-Iglesias, A., Balsa-Castro, C., Blanco-Pintos, T., & Tomás, I. (2023). Critical review of 16S rRNA gene sequencing workflow in microbiome studies: From primer selection to advanced data analysis. In *Molecular Oral Microbiology* (Vol. 38, Issue 5, pp. 347–399). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/omi.12434>
- Romero, R. , Espinoza, J., Gonçalves, L. F., Kusanovic, J. P., Friel, L. A., & Nien, J. K. (2006). Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*.
- Romero, R. , Gómez, R., Chaiworapongsa, T., Conoscenti, G., Cheol Kim, J., & Mee Kim, Y. (2001). The role of infection in preterm labour and delivery. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*.
- Romero, R., Dey, S. K., & Fisher, S. J. (2014). Preterm labor: One syndrome, many causes. In *Science* (Vol. 345, Issue 6198, pp. 760–765). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.1251816>
- Romero, R., Espinoza, J., Kusanovic, J. P., Gotsch, F., Hassan, S., Erez, O., Chaiworapongsa, T., & Mazor, M. (2006). The preterm parturition syndrome. In *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* (Vol. 113, Issue SUPPL. 3, pp. 17–42). <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2006.01120.x>
- Romero, R., Hassan, S. S., Gajer, P., Tarca, A. L., Fadrosh, D. W., Bieda, J., Chaemsathong, P., Miranda, J., Chaiworapongsa, T., & Ravel, J. (2014). The vaginal microbiota of pregnant women who subsequently have spontaneous preterm labor and delivery and those with a normal delivery at term. <http://www.microbiomejournal.com/content/2/1/18>
- Romero, R., Hassan, S. S., Gajer, P., Tarca, A. L., Fadrosh, D. W., Nikita, L., Galuppi, M., Lamont, R. F., Chaemsathong, P., Miranda, J., Chaiworapongsa, T., & Ravel, J. (2014). The composition and

stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-4>

Romero, R., Tarca, A. L., Gomez-Lopez, N., Winters, A. D., Panzer, J., Lin, H., Gudicha, D. W., Galaz, J., Farias-Jofre, M., Kracht, D. J., Chaiworapongsa, T., Jung, E., Gotsch, F., Suksai, M., Berry, S. M., Ravel, J., & Peddada, S. D. (n.d.). *TITLE: The Vaginal Microbiota in Early Pregnancy Identifies a Subset of Women at Risk 1 for Early Preterm Prelabor Rupture of Membranes and Preterm Birth 2 3 RUNNING TITLE: Vaginal microbiota and spontaneous preterm birth 4 5 Authors 6.*

Schaaf, J. M. , Liem, S. M., Mol, B. W. J., Abu-Hanna, A., & Ravelli, A. C. (2013). Ethnic and racial disparities in the risk of preterm birth: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Perinatology*.

Schuster, H. J., Breedveld, A. C., Matamoros, S. P. F., van Eekelen, R., Painter, R. C., Kok, M., Hajenius, P. J., Savelkoul, P. H. M., van Egmond, M., & van Houdt, R. (2024). The interrelation between microbial immunoglobulin coating, vaginal microbiota, ethnicity, and preterm birth. *Microbiome*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-024-01787-z>

Schwebke, J. R. (2009). *New Concepts in the Etiology of Bacterial Vaginosis*.

Schwartz, A. (2016). Microbiota of the human body. In *Adv Exp Med Biol*.

Shi, Y., Tanimura, K., Sasagawa, Y., & Yamada, H. (2020). Vaginal microbiota associated with preterm delivery. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 26(11), 1134–1138. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2020.06.003>

Smith, S. B. , & Ravel, J. (2017). The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. . *The Journal of Physiology*, 595(2), 451–463.

- Son, M., & Miller, E. S. (2017). Predicting preterm birth: Cervical length and fetal fibronectin. In *Seminars in Perinatology* (Vol. 41, Issue 8, pp. 445–451). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2017.08.002>
- Stafford, G. P., Parker, J. L., Amabebe, E., Kistler, J., Reynolds, S., Stern, V., Paley, M., & Anumba, D. O. C. (2017). Spontaneous preterm birth is associated with differential expression of vaginal metabolites by lactobacilli-dominated microflora. *Frontiers in Physiology*, 8(AUG). <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00615>
- Stout, M. J., Zhou, Y., Wylie, K. M., Tarr, P. I., Macones, G. A., & Tuuli, M. G. (2017). Early pregnancy vaginal microbiome trends and preterm birth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 217(3), 356.e1-356.e18. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.05.030>
- Sun, S., Serrano, M. G., Fettweis, J. M., Basta, P., Rosen, E., Ludwig, K., Sorgen, A. A., Blakley, I. C., Wu, M. C., Dole, N., Thorp, J. M., Siega-Riz, A. M., Buck, G. A., Fodor, A. A., & Engel, S. M. (2022). Race, the Vaginal Microbiome, and Spontaneous Preterm Birth. *MSystems*, 7(3). <https://doi.org/10.1128/msystems.00017-22>
- Tamayo Acevedo, L. S. , Guevara Romero, E., & Álvarez Osorio, L. P (2016). *Vaginosis bacteriana, comportamiento sexual, higiene genital y estrés en embarazadas: estudio de casos y controles*. <https://bibliotecadigital.udea.edu.co/handle/10495/27699>
- The Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*.
- Unicef. (2023). *Levels and trends in child mortality*. Levels and Trends in Child Mortality.
- Vivas, M. C. , Blanco, L. G., Sotelo, J. C., Duran, K., & Ramírez, J. (2020). Prevalencia de infecciones vaginales en mujeres embarazadas y no embarazadas en un hospital de Cali, Colombia. *Revista*

*Ciencias**Biomédica.*

<https://revistas.unicartagena.edu.co/index.php/cbiomedicas/article/view/3157>

Vogel, J. P., Chawanpaiboon, S., Moller, A. B., Watananirun, K., Bonet, M., & Lumbiganon, P. (2018).

The global epidemiology of preterm birth. In *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* (Vol. 52, pp. 3–12). Bailliere Tindall Ltd.

<https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.04.003>

Walani, S. R. (2020). Global burden of preterm birth. In *International Journal of Gynecology and*

Obstetrics (Vol. 150, Issue 1, pp. 31–33). John Wiley and Sons Ltd.

<https://doi.org/10.1002/ijgo.13195>

Wallace, J. L. , Aland, K. L., Blatt, K., Moore, E., & DeFranco, E. A.. (2017). Modifying the risk of recurrent

preterm birth: influence of trimester-specific changes in smoking behaviors. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*.

World Health Organization. (2020). *Preterm birth. World Heal Organ*. [https://www.who.int/news-](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth)

[Room/Fact-Sheets/Detail/Preterm-Birth](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth).