

M.L. García-Peña
L. Martínez
J.A. Castilla
M. Blanco
A.I. Núñez
A. Fernández
J. Fontes
N. Mendoza
V. Maldonado

Unidad de Reproducción.
Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. España.

Correspondencia:

Dr. José Antonio Castilla.
Unidad de Reproducción. Hospital Virgen de las Nieves.
Avda. Coronel Muñoz, 2.
18014 Granada. España.
Correo electrónico: jcastilla@hvn.sas.junta-andalucia.es

Fecha de recepción: 2/9/02
Aceptado para su publicación: 3/12/02

Presencia de microorganismos oportunistas en el endocervix y su influencia en la tasa de gestación en un programa de FIV-ICSI

59

Presence of opportunistic microorganisms in the endocervix and their influence on pregnancy rates in an in vitro fertilization program

M.L. García-Peña, L. Martínez, J.A. Castilla, M. Blanco, A.I. Núñez, A. Fernández, J. Fontes, N. Mendoza, V. Maldonado. Presencia de microorganismos oportunistas en el endocervix y su influencia en la tasa de gestación en un programa de FIV-ICSI.

RESUMEN

Objetivos: Estudiar la asociación entre cultivos endocervicales positivos para microorganismos distintos de *Lactobacillus* spp. y las tasas de gestación obtenidas, en las técnicas de FIV-ICSI.

Métodos: Se recogieron muestras endocervicales para estudio microbiológico de 109 mujeres sometidas a técnicas de FIV-ICSI, en el momento de la transferencia embrionaria.

Resultados: Un total de 18 cultivos (16,5%) fueron positivos. El total de embarazos fue de 32 (un 29,35% por transferencia). Cinco correspondieron a mujeres con cultivo positivo (un 27,8% por transferencia) y 13 a mujeres con cultivo negativo

(un 29,7% por transferencia). Las causas de esterilidad, el número de FIV e ICSI, el número de ovocitos por punción y el número de embriones transferidos fue similar en ambos grupos, sin que se hayan encontrado diferencias significativas.

Conclusiones: La presencia en el endocervix de microorganismos oportunistas, en el momento de la transferencia embrionaria no es suficiente para alterar la implantación embrionaria, y por tanto disminuir las tasas de gestación.

PALABRAS CLAVE

Cultivo endocervical. Transferencia embrionaria. Fecundación *in vitro*.

60 SUMMARY

Objectives: To assess the relationship between positive endocervical culture for microorganisms other than *Lactobacillus* spp. and pregnancy rates in an *in vitro* fertilization program.

Methods: Microbiological culture was carried out in endocervical samples from 109 patients who underwent embryo transfer after *in vitro* fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI).

Results: Eighteen cultures (16.5%) were positive. The total number of pregnancies was 32 (29.35% per transfer). Five pregnancies were obtained in women with a positive culture (27.8% per transfer) and 13 were obtained in women with a negative culture (29.7% per transfer). No significant differences were observed between groups in the etiology of infertility, number of IVF or ICSI, number of oocytes per puncture, or number of embryos transferred.

Conclusions: The presence of opportunistic microorganisms in the endocervix at the time of embryo transfer does not alter embryo implantation or reduce pregnancy rates.

KEY WORDS

Endocervical culture. Embryo transfer. *In vitro* fertilization.

INTRODUCCIÓN

El número y la calidad de los embriones transferidos¹⁻⁶ así como el estado del endometrio^{1,2} son factores de gran importancia que condicionan e influyen en la implantación embrionaria y, por tanto, en las tasas de gestación en los programas de reproducción asistida^{7,8}. Entre los factores que llegan a interferir en el proceso de implantación embrionaria, vamos a destacar las infecciones genitales, particularmente las causadas por microorganismos de transmisión sexual, actualmente consideradas como unas de las principales causas de infertilidad^{7,9-12}.

La cavidad endometrial es estéril, pero a veces microorganismos localizados en el endocérnix son capaces de ascender a la cavidad uterina, interfiriendo en la implantación embrionaria¹³.

En mujeres asintomáticas en edad fértil, la flora vaginal y cervical normal está formada principalmente por *Lactobacillus*, y en menor proporción se suelen aislar otros microorganismos, como *Streptococcus viridans*, *Streptococcus agalactiae*, estafilococos coagulasa negativos, levaduras (principalmente *Candida albicans*) y bacterias anaerobias, entre otros. En ocasiones esta flora puede verse alterada por diversos factores, como la profilaxis antibiótica o por intervenciones quirúrgicas¹⁴, produciendo un sobrecrecimiento de estos microorganismos que están en minoría en condiciones normales, que puede causar distintas enfermedades, como vaginosis bacteriana, vaginitis o cervicitis.

La transferencia embrionaria en las técnicas FIV-ICSI puede ser causa de contaminación del endometrio por microorganismos de la flora vaginocervical, cuyas consecuencias son desconocidas, pero podría darse el caso que, sin causar infección, se creara un ambiente hostil para el proceso de implantación embrionaria, disminuyendo por tanto las tasas de gestación^{8,15,16}.

En el presente trabajo, nuestro objetivo es estudiar la asociación entre cultivos endocervicales positivos para microorganismos distintos de *Lactobacillus* spp. y las tasas de gestación obtenidas tras la transferencia embrionaria en las técnicas de fertilización *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el momento de la transferencia embrionaria se recogieron muestras endocervicales de 109 mujeres sometidas a técnicas de FIV-ICSI. Ninguna de las mujeres incluidas en el estudio presentaba evidencias de vaginitis o cervicitis y cada una de ellas participó una sola vez en el estudio. No se administraron antibióticos durante el proceso de estimulación ovárica ni tras la recuperación de ovocitos. El rango de edad estaba comprendido entre 26 y 40 años. El estudio se llevó a cabo entre marzo y julio de 2001. Las muestras recogidas (dos por paciente) fueron enviadas inmediatamente al laboratorio de microbiología en medios de transporte adecuados. Los me-

Tabla 1 Microorganismos aislados de los 18 cultivos endocervicales positivos

Microorganismo aislado en cultivo positivo	Nº de cultivos positivos (n = 18)	Porcentaje de cultivos positivos	Nº de embarazos
<i>Streptococcus agalactiae</i>	8/18	44,5%	4
<i>Candida</i> spp.	4/18	22,2%	1
<i>Mycoplasma hominis</i>	2/18	11,1%	0
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	2/18	11,1%	0
<i>Enterococcus</i> spp.	2/18	11,1%	0

dios de cultivo empleados fueron: New York City (para el estudio de *Neisseria gonorrhoeae*), y Agar sangre (para el estudio de levaduras y otras bacterias facultativas) que se incubaron a 37 °C en atmósfera al 5% de CO₂ durante 24-48 h; para el estudio de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* se utilizó caldo urea-arginina y Agar A7 (Biomérieux), incubándose a 37 °C en un 10% de CO₂ hasta 5 días. Para el estudio de *Chlamydia trachomatis* se realizó cultivo celular en tubos de fondo plano con células McCoy, incubándose a 37 °C 48-72 h y posterior inmunofluorescencia directa (*Chlamydia trachomatis* Culture Confirmation Test; Microtrak).

Se definió como cultivo positivo el aislamiento de microorganismos distintos de *Lactobacillus* en cultivo puro o mixto, pero con abundante desarrollo.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test de la χ^2 o el exacto de Fisher para la comparación de variables cualitativas, y el test de la t de Student para variables cuantitativas. Se calculó la media y la desviación estándar (DE) de las variables cuantitativas.

RESULTADOS

De los 109 cultivos endocervicales realizados, 18 de ellos resultaron positivos (16,5%). Los microorganismos aislados fueron los siguientes (tabla 1): *Streptococcus agalactiae* (44,5%), *Candida* spp. (22,2%), *Mycoplasma hominis* (11,1%), *Ureaplasma urealyticum* (11,1%) y *Enterococcus faecalis* (11,1%); no se obtuvo ningún cultivo positivo para *N. gonorrhoeae* ni para *C. trachomatis*. En ningún caso hubo ausencia de crecimiento bacteriano y en 91 (83,5%) existió un claro predominio de *Lactobacillus* spp., con

Tabla 2 Variables clínicas estudiadas en los grupos de mujeres con cultivo positivo y cultivo negativo

Variable	Grupo 1 (cultivos positivos, n = 18)	Grupo 2 (cultivos negativos, n = 91)	p
Edad	32,4 ± 2,7	33,5 ± 3,4	0,17
FIV	5 (28%)	27 (30%)	0,90
ICSI	13 (72%)	64 (70%)	0,90
Tiempo de estimulación	12,2 ± 1,9	11,8 ± 1,8	0,40
Número de ovocitos obtenidos	7,2 ± 2,8	7,9 ± 3,6	0,41
Fecundados (%)	65,6 ± 28,8	56,0 ± 23,4	0,13
Número de embriones obtenidos	4,1 ± 2,5	3,9 ± 2,3	0,73
Embriones transferidos	2,5 ± 0,9	2,6 ± 0,7	0,79
Embriones de tipo I	2,2 ± 1,2	2,1 ± 1,0	0,78
Embriones de tipo I (%)	60,0 ± 33,4	62,0 ± 33,2	0,81
Embarazos/transferencia	5 (27,8%)	27 (29,7%)	0,90

Resultados expresados como media ± desviación estándar.

muy escasa presencia de otros microorganismos que habitualmente forman parte de la flora genital femenina (enterobacterias, estafilococos, estreptococos, enterococos) y que fueron incluidos dentro del grupo de mujeres con cultivos considerados negativos.

Las indicaciones más frecuentes para las técnicas de FIV-ICSI fueron factor masculino, factor tubárico y esterilidad sin causa aparente en ambos grupos.

La media ± DE de ovocitos recuperados por punción fue de 7,2 ± 2,8 en el grupo de cultivos positivos y de 7,9 ± 3,6 en el de cultivos negativos; la media ± DE de embriones transferidos fue de 2,5 ± 0,9 en el grupo de cultivos positivos y de 2,6 ± 0,8 en el de cultivos negativos, siendo la mayoría embriones de tipo I. En el grupo de cultivos positivos se realizaron 5 FIV (28%) y 13 ICSI (72%), mientras que en el de cultivo negativo fueron 27 FIV (30%) y 64 ICSI (70%) (tabla 2).

El total de embarazos fue de 32 (29,35%), de los cuales cinco correspondieron a mujeres con cultivo positivo (el 27,8% de las mujeres con cultivo positivo) y el resto (27) correspondieron a mujeres con cultivo negativo (el 29,7% de las mujeres con cultivo negativo); no existieron diferencias significativas en las tasas de gestación entre mujeres con cultivos positivo y negativo (tabla 2). No se observaron diferencias entre las variables clínicas estudiadas entre

- 62 mujeres con cultivos positivos y negativos (edad, protocolo de estimulación, técnica de reproducción asistida, estradiol/día de hCG, número de folículos mayores de 18 mm/día de hCG, número de ovocitos, tasa de fecundación, número de embriones obtenidos, número de embriones transferidos, calidad embrionaria y dificultad de la transferencia).

DISCUSIÓN

Hoy día, nadie pone en duda la importancia que determinados microorganismos tienen en la génesis de la esterilidad. La Organización Mundial de la Salud (OMS) desde 1987 cita la infección genital como la principal causa de esterilidad¹⁷.

Lactobacillus es la bacteria predominante de la flora vaginocervical en la mayoría de las mujeres sin infección genital. Las especies de este microorganismo desempeñan un papel importante en el equilibrio de la flora del tracto genital femenino, probablemente al reducir el número de otras bacterias e inhibir el crecimiento de otras potencialmente patógenas por la producción de ácido láctico y peróxido de hidrógeno¹³.

El impacto que tendrían las alteraciones de la flora del tracto genital femenino en las tasas de gestación dentro de un programa de reproducción asistida no está del todo claro y es un tema que despierta gran interés.

El presente trabajo se ha realizado para determinar la influencia en las tasas de gestación, dentro de un programa de FIV/ICSI, de la presencia de bacterias distintas de *Lactobacillus* en el endocérnix en el momento de la transferencia embrionaria. Debido a que el número de cultivos positivos obtenidos es bajo, no se ha podido estudiar la influencia de cada uno de los microorganismos aislados por separado con las tasas de gestación.

En nuestro estudio preferimos realizar el cultivo de muestras endocervicales tomadas con escobillón, con el fin de poder detectar la presencia de clamidias, en lugar de realizar el cultivo de la punta de catéter de transferencia, que es la muestra elegida en otros trabajos^{7,15,17}, ya que el estudio de este microorganismo requiere la presencia, en la muestra, de células epiteliales, que no están presentes en cantidad suficiente en las muestras recogidas con la punta de catéter.

Los microorganismos aislados de los 18 cultivos positivos (tabla 1) son similares a los encontrados en otros estudios^{7,15,17} aunque las tasas de aislamiento son diferentes, ya que nosotros, con el objetivo de estudiar exclusivamente la presencia de microorganismos con significación clínica, únicamente hemos tenido en cuenta la presencia de microorganismos en cultivo puro o en cultivo mixto, pero con moderado o abundante desarrollo¹³, considerando que cuando se encuentran en escasa presencia junto con *Lactobacillus* se considera flora normal del tracto genital (exceptuando *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*), y no se han incluido dentro del grupo de cultivos positivos.

La tasa global de gestaciones por transferencia obtenidas en este estudio (29,35%) no difiere de la obtenida habitualmente en nuestro centro¹⁸, por lo que podemos descartar que la toma de cultivos endocervicales comprometa las tasas de embarazo.

No hemos encontrado diferencias significativas en las tasas de gestación entre los grupos de mujeres con cultivos positivo y negativo. Nuestros resultados no concuerdan con los obtenidos en otros trabajos^{7,15,17}, que encuentran en algunos casos hasta un 50% de descenso en las tasas de gestación en mujeres con cultivos positivos. Esta diferencia puede deberse a que la mayoría de estos trabajos^{7,15,17}, al contrario que en nuestro grupo, administran profilaxis antibiótica de forma sistemática durante el proceso de recogida de ovocitos, 48 h antes de la transferencia embrionaria, con lo que las pacientes con cultivos positivos en el momento de la transferencia presentarían cepas más resistentes, que podrían ser más virulentas que las detectadas en nuestro estudio, por lo que es lógico pensar que en pacientes con cultivos positivos tras 48 h de profilaxis antibiótica exista mayor posibilidad de afección de la implantación que en aquellos con cultivo positivo sin profilaxis antibiótica. La citada profilaxis antibiótica podría explicar el hecho de que no siempre se relaciona con un descenso de las tasas de gestación la presencia de un determinado microorganismo, en unos casos *E. coli*⁷ y en otros distintas especies de estreptococos^{7,17}; en otras publicaciones no se menciona esta posible relación¹⁵. Otro aspecto que se debe tener en cuenta es si la carga bacteriana o la presencia de determinadas bacterias pueden interferir en el proceso de implantación y gestación, o bien si lo hace la propia alteración de la flora normal del

tracto genital femenino independientemente de otros factores, ya que son pocos los estudios al respecto¹⁹.

Nuestros resultados indican que la presencia en el endocérnix de microorganismos oportunistas pro-

cedentes de la flora vaginocervical en el momento de la transferencia embrionaria no es suficiente para alterar la implantación embrionaria y disminuir, por tanto, las tasas de gestación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Paulson RJ, Sauer MV, Lobo RA. Factors affecting embryo implantation after human in vitro fertilization: a hypothesis. *Am J Obstet Gynecol* 1990;163:2020-3.
2. Templeton A, Morris JK. Reducing the risk of multiple births by transfer of two embryos after in vitro fertilization. *N Engl J Med* 1998;339:573-7.
3. Sheth KV, Roca GL, Al-Sedairy ST, Parther RS, Hamilton CJCM, Al-Abdul Jabar F. Prediction of successful embryo implantation by measuring interleukin-1- α and immunosuppressive factors in preimplantation embryo culture fluid. *Fertil Steril* 1991; 55:952-1957.
4. Miller KF, Goldberg JM. In vitro development implantation rates of fresh and cryo preserved sibling zygotes. *Obstet Gynecol* 1995;85:999-1002.
5. Tatbibzadeh S, Babaknia A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Hum Reprod* 1995;10:1579-602.
6. Ben-Shlomo I, Wiener-Megnagi Z, Golan J, Eyal V, Geslevich J, Shalev E. Individual implantation rate: proposal for a new index for evaluation of assisted reproduction result. *Fertil Steril* 1997;68:816-9.
7. Fanchin R, Harman A, Benaoudia F, Lundkvist U, Olivennes F, Frydman R. Microbial flora of the cervix assessed at the time of embryo transfer adversely affects in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1998;70:866-70.
8. Spandorfer SD, Neuer A, Giraldo PC, Rosenwaks Z, Witkin SS. Relationship of abnormal vaginal flora, proinflammatory cytokines and idiopathic infertility in women undergoing IVF. *J Reprod Med* 2001;46:806-10.
9. Rodríguez R, Hernández R, Fuster F, Torres A, Prieto P. Infección genital y esterilidad. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001;19:261-6.
10. Westrom L. Effect of acute pelvic inflammatory disease on fertility. *Am J Obstet Gynecol* 1975;121:707-13.
11. Faro S. Chlamydia trachomatis: female pelvic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164:1767-70.
12. Witkin SS, Kligman II, Grifo JA, Rosenwaks Z. Chlamydia trachomatis detected by polymerase chain reaction in cervixes of culture-negative women correlates with adverse in vitro fertilization outcome. *J Infect Dis* 1995;17:1657-9.
13. Lewis B. Identification of aerobic bacteria from genital specimens. In: Isenberg HD, editor. *Clinical microbiology procedures handbook*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992; p. 7-9.
14. García-Rodríguez JA, Picazo JJ. *Microbiología clínica*. Vol II. Madrid: Mosby, 1996; p. 350-51.
15. Egbase PE, Udo EE, Al-Sharhan M, Grudzinskas JG. Prophylactic antibiotics and endocervical microbial inoculation of the endometrium at embryo transfer. *Lancet* 1999;354:651-2.
16. Gauddoin M, Rekha P, Morris A, Lynch J, Acharya U. Bacterial vaginosis and past chlamydial infection are strongly and independently associated with tubal infertility but do not affect in vitro fertilization success rates. *Fertil Steril* 1999;72:730-2.
17. Moore DE, Soules MR, Klein NA, Fujimoto VY, Agnew KJ, Eschenbach DA. Bacteria in the transfer catheter tip influence the live-birth rate after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2000;74:1118-24.
18. Mendoza N, Maldonado V, Villegas R, Sedeño S, López MD, Martínez I, et al. Efecto del tabaco sobre los resultados de un programa de fecundación in vitro. *Prog Obstet Ginecol* 2002;45:273-9.
19. Salim R, Shlomo B, Colodner R, Keness Y, Shalev E. Bacterial colonization of the uterine cervix and success rate in assisted reproduction: results of a prospective survey. *Hum Reprod* 2002;17:337-40.