

24.51

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA

DIAGNOSTICO EN EL LABORATORIO DEL
CHANCROIDE Y EL GRANULOMA INGUINAL

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :
BETHEL GONZALEZ RODRIGUEZ

México, D. F.



1 9 8 7

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

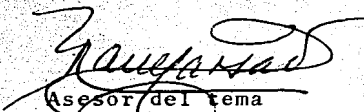
Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado según el tema:

Presidente	Prof: ELDA PENICHE QUINTANA
Vocal	Prof: MA. DEL CARMEN CORTES DECUIR
Secretario	Prof: RAUL GARZA VELASCO
1er. Suplente	Prof: MARIA ELSA ESCUDERO GARCIA
2do. Suplente	Prof: MAITE ASTIGARRAGA ZAVALETA

Sitio donde se desarrolló el tema: Biblioteca de la Facultad
de Química U.N.A.M.



Aseor del tema

Q.F.B. RAUL GARZA VELASCO

Bethel González R.
Sustentante

BETHEL GONZALEZ RODRIGUEZ

INDICE

	Página
INTRODUCCION.	1
OBJETIVOS	3

CAPITULO I

CHANCROIDE

1.1 GENERALIDADES SOBRE EL AGENTE ETIOLOGICO.	4
1.1.1 Antecedentes históricos.	4
1.1.2 Taxonomía, morfología y ultraestructura.	9
1.1.3 Características de cultivo	12
1.1.4 Identificación	25
1.1.5 Factores de virulencia	32
1.1.6 Resistencia a los antimicrobianos.	38
1.2 PATOLOGIA Y EPIDEMIOLOGIA	43
1.3 DIAGNOSTICO EN EL LABORATORIO	54
1.4 TRATAMIENTO	73

CAPITULO II

GRANULOMA INGUINAL

2.1 GENERALIDADES SOBRE EL AGENTE ETIOLOGICO.	82
2.1.1 Antecedentes históricos.	82
2.1.2 Taxonomía, morfología y ultraestructura.	84

	Página
2.1.3 Características de cultivo	88
2.2 PATOLOGIA Y EPIDEMIOLOGIA.	93
2.3 DIAGNOSTICO EN EL LABORATORIO.	102
2.4 TRATAMIENTO.	107

CAPITULO III

PREVENCION DE LAS ENFERMEDADES

DE TRANSMISION SEXUAL	110
-----------------------	-----

CAPITULO IV

CONCLUSIONES	117
--------------	-----

CAPITULO V

A Ñ E X O S	120
-------------	-----

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA	134
--------------	-----

INTRODUCCION

En la actualidad, las enfermedades de transmisión sexual afectan considerablemente a todo el mundo desde diversos puntos de vista, en virtud de que constituyen a uno de los grupos de padecimientos con mayor incidencia, por debajo tan sólo del de los gastrointestinales y el que integra a las afecciones de las vías respiratorias.

Sin lugar a dudas, entre las más importantes se cuentan la gonorrea, la sífilis, el herpes genital, la tricomoniasis y las entidades clínicas debidas a C. trachomatis; sin embargo, existen otras como el chancroide, el granuloma inguinal, la vaginitis inespecífica, etc., que aunque manifiestan una frecuencia menor, no deben ignorarse, ya que también suelen provocar cuadros graves y pueden diseminarse activamente entre la población.

En nuestro país, la mayoría de los laboratorios clínicos en los que se diagnostican enfermedades infecciosas de transmisión sexual sólo contemplan la búsqueda de gonococos, S. aureus, Pseudomonas sp., C. albicans, enterobacterias y la investigación directa e indirecta de la sífilis; así las cosas, difícilmente establecen al agente etiológico de los numerosos casos de clamidiasis y, lógicamente, los del resto de las afecciones genitales. Las razones de esta incongruencia varían desde el desconocimiento de los microorganismos que las

causan y/o de las técnicas que los ponen de manifiesto hasta la falta de recursos económicos para adquirir los reactivos, medios de cultivo, material y equipo necesarios.

Por lo anterior, el presente trabajo representa una seria aunque modesta contribución para que en un futuro cercano tanto el granuloma inguinal como el chancroide sean diagnosticados con acierto y, por ende, se traten adecuadamente para --- reducir al mínimo su incidencia.

OBJETIVOS

- Describir a los agentes etiológicos del chancroide y el granuloma inguinal.

- Dar a conocer a los profesionales de la Microbiología Clínica los aspectos que se relacionan con la patología, diagnóstico y tratamiento de dos padecimientos de transmisión sexual descritos escasamente en la literatura convencional.

CAPITULO I

CHANCROIDE

I. CHANCROIDE

1.1 GENERALIDADES SOBRE EL AGENTE ETIOLOGICO.

1.1.1 ANTECEDENTES HISTORICOS.

El padecimiento denominado chancroide o chancro blando se diferenci6 de la sfilis desde 1852²⁶, pero no fue sino -- hasta 1889 cuando Ducrey describi6 las caracterfsticas de su agente etiol6gico; por tal motivo, a dicho microorganismo se le conoce actualmente como bacilo de Ducrey. Aunque el mencionado investigador no fue capaz de cultivarlo in vitro, --- logr6 provocar lesiones en la piel del antebrazo de los enfermos al inocularles por vfa intrad6rmica las secreciones obtenidas de sus propias úlceras genitales; los bacilos encontrados en las afecciones originadas de este modo resultaban muy semejantes a los detectados en las mucosas genitales⁴³.

En 1900, Bezancon, Griffon y Le Sourd⁹⁷, empleando agar nutritivo enriquecido con 20% de sangre total fresca de conejo, obtuvieron en cultivo puro a Haemophilus ducreyi, notando que sus colonias presentaban una particular consistencia que permitfa desplazarlas enteras sobre la superficie de la gelosa, tal como si se tratara de lentejas. Esta propiedad del microorganismo se menciona constantemente, aún en las descripciones actuales^{104,139}.

Himmel, en 1901, cultivó al bacilo de Ducrey y demostró por primera vez su patogenicidad en animales al inocularlo -- intradérmicamente en conejos y cobayos. Así el chancro blanco llegó a ser investigado y posteriormente conocido clínicamente³.

Al observarse una marcada incidencia de esta enfermedad en el sexo masculino, se pensó que la infección podría cursar asintóticamente en la mujer; investigando esta posibilidad, Brams⁹⁷ en 1924, aisló microorganismos que semejaban a - - - - Haemophilus ducreyi a partir del clitoris y cérvix de pacientes sin úlceras; de esto se infirió que ciertas personas podrían ser portadoras.

Es interesante subrayar que, aunque desde 1920, Teague y Deibert⁹⁷ reportaron como favorable el uso del cultivo para efectuar el diagnóstico del chancroide en el laboratorio, en muchos casos éste se continúa llevando a cabo en base a la -- apariencia supuestamente típica de los bacilos en los frotis teñidos al Gram.

Saelhof⁹⁷, en 1924, realizó un trabajo tendiente a analizar las posibilidades para obtener el diagnóstico bacteriológico exacto y relativamente rápido de la enfermedad en cuestión; para ello inoculó unas gotas de secreciones provenientes de las lesiones chancroidales en un medio con sangre de -- conejo, con el cual obtuvo un 65% de éxito; los fracasos los

atribuy6 a variaciones en la temperatura de incubaci6n y a -- una composici6n probablemente inadecuada del medio.

Más tarde, con la introducci6n de las sulfonamidas, se ma-- nifest6 un notable inter6s por investigar el uso de agentes - antimicrobianos para el tratamiento del chancro blando, encon-- trándose la exitosa utilidad de la sulfanilamida y el sulfa-- tiazol; en 1941, Kornblith⁸² detect6 el fen6meno basándose en los resultados obtenidos al analizar a 175 pacientes.

En 1943, Greenwald⁵⁸ public6 su trabajo acerca del diag-- n6stico y tratamiento del chancroide, haciendo 6nfasis en que se trataba de una lesi6n ven6rea relativamente com6n; un estu-- dio posterior efectuado por Satulsky¹²⁴ en 1945, estableci6 - la evidencia de que el bacilo de Ducrey puede encontrarse en los genitales femeninos como sapr6fito, pero cuando alcanza - tejidos extragenitales se manifiesta como pat6geno.

Heyman, Beeson y Sheldon⁶⁹, utilizando sangre desfibrina-- da de conejo, obtuvieron aislamientos exitosos de Haemophilus ducreyi en 50 de 60 casos y, posteriormente, demostraron la - patogenicidad de las cepas realizando inoculaciones en cone-- jos.

En 1946, Beeson¹¹ estudi6 los requerimientos nutriciona-- les del microorganismo y su sensibilidad a diversos antibi6ti-- cos; en particular, este investigador demostr6 que el suero y

los eritrocitos lavados favorecían el crecimiento del bacilo de Ducrey cuando eran adicionados a las bases de agar; sin embargo reportó que la sangre completa era la más adecuada y -- subrayó la necesidad de proporcionar una elevada humedad a -- los cultivos, ya que el bacilo generalmente no crecía bajo -- condiciones simples de incubación.

En 1956, Ajello² intentó definir los requerimientos nutricionales para cultivar cepas virulentas de Haemophilus -- ducreyi, concluyendo que era indispensable la adición de gran cantidad de aminoácidos, los cuales podían ser sustituidos -- por la simple incorporación de suero de conejo al medio base.

Barile¹⁰, en 1962, realizó un estudio sobre las lesiones genitales que padecían los soldados de Estados Unidos de Norteamérica asentados en Japón, encontrando que el 31% del total de casos se debía a Herpesvirus y el 23% a Haemophilus -- ducreyi; además, en 2 pacientes detectó la presencia de ambos agentes.

Kerber, Rowe y Gilbert⁷⁴, en 1969, llevaron a cabo una investigación en el Centro Médico del Ejército de Saigón y -- determinaron que, en lo que se refería a las enfermedades de transmisión sexual, el chancroide ocupaba el segundo lugar en incidencia después de la gonorrea. Sin embargo, aunque utili -- zaron medios de transporte, los cultivos resultaron un fracaso; esto bien pudo deberse a la falta de humedad al efectuarse

las incubaciones correspondientes.

Después de lo anterior, el cuestionamiento sobre el verdadero valor del cultivo se incrementó y fue entonces cuando Borchardt y Hoke¹⁴ publicaron una técnica simplificada para diagnóstico de chancroide, la cual consistía en la inoculación del fluido proveniente de las lesiones en 10 ml. de sangre -- coagulada del paciente, sometida a 56°C durante 30 minutos; -- por este método, complementado con la observación de frotis -- al Gram, de los 24 casos con diagnóstico presuntivo de chancroide, 21 fueron confirmados; la revisión microscópica ponía de manifiesto las características del bacilo de Ducrey, cuya agrupación semeja cadenas entrelazadas o huellas dactilares^{14,104}.

Pero no fue sino hasta la década de los 70's cuando empezaron a ajustarse los conceptos acerca del chancroide. Antes se le consideraba como una enfermedad rara en países desarrollados, debido a que el microorganismo se aislaba difícilmente; sin embargo, los pocos laboratorios de Estados Unidos de Norteamérica e Inglaterra que proporcionaban el servicio de diagnóstico para especialidades genitales empezaron a tomarlo en cuenta como una seria posibilidad clínica.

En 1977, surgió una epidemia de chancroide en Groenlandia⁹⁰, en la que se presentaron 975 casos entre una población de --- 32,500 adultos, detectándose una relación masculino/femenina -- de 1.6:1; las cepas se reconocieron por microscopía directa o-

autoinoculación y aunque en general se obtuvo poco éxito en lo referente al cultivo del microorganismo, los escasos aislamientos correspondieron con las descripciones de Haemophilus ducreyi. El brote demostró tanto la capacidad del chancroide para difundirse rápidamente entre la población susceptible, como la gran utilidad de las sulfonamidas en lo que respecta a su tratamiento.

En 1978, Hammond⁶³ describió un medio adecuado para el aislamiento de Haemophilus ducreyi y con ello convenció a los infectólogos de que la sospecha clínica del chancroide puede confirmarse mediante el aislamiento del bacilo de Ducrey en el laboratorio; asimismo, comprobó que con dicho medio se pueden efectuar estudios más profundos del microorganismo.

1.1.2 TAXONOMIA, MORFOLOGIA Y ULTRAESTRUCTURA.

Haemophilus: del griego haima-sangre y philus-amor, se encuentra, según lo descrito en la 8a. Edición del Manual de Bergey (1974), en la Parte 8 (correspondiente a bacilos Gram-negativos anaerobios facultativos), que comprende las familias: I. Enterobacteriaceae, II. Vibrionaceae y los siguientes géneros considerados de afiliación incierta: Zymomonas, Chromobacterium, Flavobacterium, Haemophilus, Pasteurella, Actinobacillus, Cardiobacterium, Streptobacillus, y Calymatobacterium.

Sin embargo el "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" 9a. Edición (1984), ubica al microorganismo en cuestión - en la Sección 5, constituida por los bacilos Gram-negativos - facultativos de las siguientes familias: I. Enterobacteriaceae, II. Vibrionaceae y III. Pasteurellaceae, con los géneros: I. Pasteurella, II. Haemophilus y III. Actinobacillus. Otros-géneros pertenecientes a la misma sección, son: Zymomonas, -- Chromobacterium, Cardiobacterium, Calymmatobacterium, --- Gardnerella, Eikenella y Streptobacillus.

Por lo tanto, la clasificación más reciente de Haemophilus ducreyi es:

Sección 5
 Familia III. Pasteurellaceae
 Género II: Haemophilus
 Especie: H. ducreyi

Por lo que toca a su morfología, Haemophilus ducreyi es - un bacilo Gram-negativo que mide 0.5 μ de ancho por 1.5 a 2 μ de largo, que con frecuencia presenta coloración bipolar y se agrupa en pares o cadenas; es inmóvil, no esporulado y, en cuanto a cápsula, ésta aún no se ha puesto de manifiesto.

Por otra parte, aunque la información con la que se cuenta sobre la ultraestructura de Haemophilus ducreyi es escasa, existe un interesante trabajo de Kilian y Theilade⁷⁷ sobre el particular; ellos analizaron 4 cepas diferentes: 129, IX, X y CIP -- 542 del bacilo de Ducrey, encontrando que las 3 primeras --- se manifestaban como bacilos delgados sin agrupación característica y predominantemente Gram-negativos, aunque algunas células resistían la decoloración con alcohol-acetona. -- Asimismo, investigando cortes finos de las mencionadas 3 cepas al microscopio electrónico, observaron que muchas de las células presentaban septos transversos indicativos de una divi--

sión incompleta y que se rodeaban por una pared bastante homogénea de aproximadamente 10 a 15 nm. de espesor, aunque sus capas externa e interna se mostraban ligeramente más densas que la intermedia.

Además, observaron una capa extra de 5 nm de ancho que rodeaba a la pared celular, quedando entre ambas un espacio cuyo grosor era similar a las dimensiones mencionadas. La membrana citoplásmica se encontraba inmediata al borde inferior de la pared celular y manifestaba prolongaciones de ésta en donde se detectaban los septos; el citoplasma presentaba un aspecto denso y contenía abundantes mesosomas.

En lo referente a la cepa CIP 542, al microscopio de luz se comprobó que estaba formada totalmente por bacilos Gram_{neg} que se agrupaban en cadenas y el examen de cortes finos mostró que su pared celular tenía 10 nm de ancho y estaba constituida por 2 componentes estructurales: una capa externa, ocasionalmente con apariencia ondulante y otra, muy delgada y pobremente definida, situada en el espacio formado entre la capa externa y la membrana citoplásmica. Sus ribosomas se localizaban principalmente en la periferia del citoplasma.

Las características encontradas en las cepas analizadas condujeron a los investigadores a postular que, considerando la estructura de la pared celular y los requerimientos nutricionales, la cepa CIP 542 correspondía a Haemophilus ducreyi;

según sus observaciones las 3 restantes eran bacterias de crecimiento lento clasificadas erróneamente como Haemophilus --- ducreyi ya que, por un lado, la estructura de su pared celular era la típica de los microorganismos Gram-negativos y, -- por otro, se había comprobado que si bien requerían para desarrollarse un factor termoestable del suero y otro termolábil ligado a los eritrocitos, nunca se había demostrado su dependencia de la hemina o del NAD^+ como tales; esto último sí se investigó en la CIP 542 pudiéndose establecer su necesidad de hemina pero no de NAD^+ .

De acuerdo con las conclusiones de Kilian y Theilade⁷⁷, - la ultraestructura de Haemophilus ducreyi estaría representada por la de la cepa CIP 542; sin embargo, existen algunas situaciones que se contraponen a sus deducciones: las cepas 129, IX y X habían sido aisladas de lesiones de chancroide aproximadamente 20 años antes de que efectuaran su estudio y, posteriormente, cuando se inocularon en voluntarios humanos, provocaron úlceras chancroidales.

Como puede constatarse, es necesario la realización de un mayor número de estudios para establecer con exactitud los aspectos relacionados con la estructura del bacilo de Ducrey.

1.1.3 CARACTERISTICAS DEL CULTIVO.

El género Haemophilus recibe este nombre debido a que -- Las bacterias que lo integran sólo pueden desarrollarse en pre-

sencia del factor X que se encuentra en la hemoglobina (hemina) y otras porfirinas; además, algunas especies también son auxótrofas para el factor V (NAD^+)⁸. Sin embargo, un considerable número de publicaciones subraya la dificultad de cultivar a estos microorganismos, aún cuando se les proporcionen los elementos antes mencionados.

Por lo que respecta a Haemophilus ducreyi, los primeros reportes de investigadores tales como Beeson¹¹ y Ajello² establecieron erróneamente que no necesitaba hemina para crecer. Sin embargo, actualmente se sabe que el suministro de este compuesto (u otros similares) le es indispensable: Kilian⁷⁶ encontró que 2 cepas cuyas características coincidían con las del bacilo de Ducrey no podían sintetizar su propia hemina a partir del ácido δ -amino levulínico (δ -ALA) y que, por tanto, requerían que aquella se les proporcionara en forma exógena; para reforzar su versión subrayó el hecho de que la proporción Guanina + Citosina de su DNA es muy semejante a la que presentan las demás especies de Haemophilus cuya dependencia de factor X es inobjetable. En 1978, Hammond⁶⁴ terminó con la controversia, ya que realizó una serie de experimentos que demostraron el absoluto requerimiento de factor X exógeno en 19 cepas de Haemophilus ducreyi. Primero comprobó que para investigar confiablemente la capacidad de estos microorganismos para desarrollar alrededor de la fuente de hemina, no deben utilizarse los medios Trypticase soya y Eugonagar; ya antes se había

señalado que la elección del medio gravitaba en los resultados de la prueba del satelitismo para Haemophilus influenzae y Haemophilus parainfluenzae³⁷. Posteriormente, encontré que, además de la hemina, eran importantes otros suplementos nutricionales para lograr el crecimiento de Haemophilus ducreyi; para ello, incorporé diferentes sustancias a los medios TSA, Eugonagar y GC (enriquecidos con hemina) y seleccioné las que incrementaron el número de aislamientos de los microorganismos que requerían factor X. De esta manera determiné que un medio adecuado para realizar la prueba de requerimiento del factor en cuestión es el GC adicionado con glucosa (0.1%) y glutamina (0.01%); este resultó tan exitoso como el mismo medio con glucosa, tiamina, L-cistina, nitrato férrico, L-cistefna, guanina, adenina, L-glutamina, vitamina B-12, cocarboxilasa y ácido p-amino benzoico, contenidos en el suplemento nutricional IsoVitalex; el NAD⁺ se eliminó porque el mismo investigador observó previamente que la estimulación del crecimiento de Haemophilus ducreyi era independiente de la presencia de factor V. Finalmente, confirmé que el microorganismo requiere de hemina exógena al resultarle negativa la prueba de la porfirina, ya que con ello puso en evidencia su carencia de capacidad enzimática para sintetizar dicho compuesto a partir de δ -ALA.

Es obvio que los medios empleados para detectar esta necesidad nutricional no deben contener grupos heme; en este --

sentido, cabe mencionar que los constituidos por infusiones de carne conservan todavfa suficiente hemina para inducir al crecimiento visible de las bacterias que la requieren y, por el contrario, que los medios tales como el agar extracto de levadura y la proteosa peptona son adecuados porque no la contienen³⁷. De acuerdo a lo anterior, podria pensarse que el TSA, el Eugonagar y el GC redituarian resultados exitosos, -- pues los 3 están constituidos por peptonas de caseina y soya; no obstante, existen pruebas fehacientes de que en el TSA y el Eugonagar adicionados sólo de factor X no desarrolla Haemophilus ducreyi; probablemente esta circunstancia fue la que dio lugar a la confusión de Ajello² y Beeson¹¹, quienes al no obtener desarrollo en presencia de hemina establecieron que ésta no era indispensable.

Si se analizan más detenidamente los resultados de Hammond⁶⁴, es posible que surjan planteamientos interesantes que se relacionan con los comentarios anteriores: el citado investigador no obtuvo crecimiento del bacilo de Ducrey en TSA y Eugonagar adicionados solamente de hemina y sí lo logró, aunque en escaso nivel, en el GC; de ésto, puede deducirse que los 2 primeros medios carecen de algunos componentes esenciales presentes en el tercero o bien, que contienen algún inhibidor. La correspondiente comparación de los medios muestra que dicho(s) constituyente(s) puede(n) ser el almidón y/o amortiguador; en este sentido, se sabe que el almidón desempeña una función --

importante como atrapador de metales pesados que son tóxicos para el gonococo; aquí cabría preguntarse si Haemophilus ducreyi es sensible a este tipo de agentes y parte de la respuesta podría darla el trabajo de Evans³⁷; este autor encontró que para demostrar el requerimiento de NAD^+ en Haemophilus parainfluenzae era necesario agregar oleato de sodio al medio, debido a que éste neutralizaba a ciertos inhibidores.

Además de lo antes expuesto, cabe considerar que Hammond⁶⁴, al adicionar IsoVitaleX sin NAD^+ a los medios TSA, Eugonagar y GC, incrementó sus índices de desarrollo a 35, 39 y 100% -- respectivamente; por ello puede deducirse que además de los agentes detoxificadores y de la hemina, otros nutrimentos (pero no el factor V) pueden resultar indispensables.

La importancia del factor X en el medio es evidente si se toma en cuenta que con $10 \mu\text{g/ml}$ en agar GC suplementado con IsoVitaleX apenas se inicia el desarrollo de Haemophilus ducreyi y con concentraciones más altas (de 200 a $500 \mu\text{g/ml}$) se manifiesta un crecimiento óptimo; como se puede constatar, la concentración ideal para cultivarlo es mucho mayor que la que requieren otras especies de Haemophilus como H. influenzae que necesita entre 2 y $10 \mu\text{g/ml}$ ⁶⁴.

Cabe señalar que los medios utilizados para realizar pruebas bioquímicas, sólo contienen alrededor de $10 \mu\text{g/ml}$ ⁷⁶; éste podría ser el motivo de que se obtengan tantos falsos --

negativos, por lo que resulta necesario que se lleven a cabo las investigaciones correspondientes probando concentraciones más elevadas de hemina en los medios utilizados como base.

Los primeros medios exitosos para el cultivo de Haemophilus ducreyi los diseñó Hammond⁶³, quien empleó: agar chocolate -- con 1% de IsoVitaleX (CA), agar chocolate con 1% de IsoVitaleX y 3 μ g/ml de vancomicina (CA+v) y agar chocolate con 1% de -- IsoVitaleX más 3 μ g/ml de vancomicina y 7.5 μ g/ml de polimixina (CA+v+p); este autor encontró que el CA+v era el más adecuado (ya que en él desarrollaron 7 de 8 cepas del microorganismo) y que la concentración de polimimixina incorporada al CA+v+p era inhibitoria ya que en éste obtuvo un menor índice de crecimiento que en el medio no selectivo CA.

Sin embargo, existen muchos más estudios tendientes a determinar los medios de cultivo óptimos para aislar a este --- microorganismo, dado que no se ha logrado hacerlo desarrollar con regularidad en condiciones de laboratorio; a continuación se comentan las principales investigaciones sobre el particular.

Sottnek¹³⁶ analizó los medios más utilizados para efectuar el aislamiento primario, comparando la efectividad de -- los distintos tipos de sueros que se emplean como suplemento y la de las diferentes bases de agar; concretamente, evaluó -- a los siguientes: agar chocolate enriquecido, constituido por

la base GC con 1% de IsoVitalex y 1% de hemoglobina, agar chocolate con 3 μ g/ml de vancomicina, agar sangre de conejo con 3 μ g/ml de vancomicina, agar suero fetal bovino con 3 μ g/ml de vancomicina y agar suero fetal bovino; Haemophilus ducreyi se aisló en agar chocolate-vancomicina en 10 casos de 14 posibles, en agar sangre de conejo-vancomicina en 16 de 17 y en agar suero fetal bovino-vancomicina en 9 de 11; como los medios sin vancomicina presentaron flora mixta fue imposible -- realizar una apreciación adecuada.

Acercas de los sueros utilizados para enriquecer al medio para aislamiento primario agar infusión de corazón (HIA), encontró que mientras el bovino, el de ternera y el humano no favorecieron el crecimiento de cepa alguna, el de caballo y el proveniente de conejo redituaron cultivos positivos; sin embargo, fue el suero fetal bovino el que presentó un desarrollo óptimo de todas las cepas en estudio. Luego entonces, -- Sottnek¹³⁶ publicó que, aunque con suero de conejo (10%) crecían algunas cepas, el crecimiento de todas ellas se conseguía empleando suero fetal bovino. No obstante, anteriormente Ajello² había indicado que con suero bovino y porcino había crecimiento del microorganismo, aunque los mejores resultados se obtenían con el humano y el de conejo en proporciones de 0.2 a 50%. Con respecto a las bases de agar, el medio HIA resultó ser el mejor, seguido del Mueller-Hinton; en agar proteosa No. 3, agar Columbia y agar GC desarrolló un número-

similar de cepas y el menos eficaz fue el agar Trypticase ---soya; cabe señalar que todas las bases anteriores se suplementaron con suero fetal bovino.

Posteriormente, Kinghorn⁷⁹ reportó que un medio que contenía hemina, almidón de maíz, glutamina y cocarboxilasa proporcionaba un porcentaje de aislamiento de Haemophilus ducreyi de 11.4% y que este mejoraba a 23.3% con la adición de 0.4% - de gelatina.

Oberhofer¹⁰⁴ enfocó sus investigaciones a determinar la eficiencia del agar sangre de carnero al 5% y el agar chocolate con 1% de IsoVitaleX, preparados con: agar Trypticase soya y Mueller-Hinton; en cuanto a las bases, este último mostró ser claramente superior que el primero, al grado de que tanto el agar chocolate con 1% de IsoVitaleX como el agar con 5% de sangre de carnero, elaborados con Mueller-Hinton redituaron - altos índices de aislamiento sin manifestar diferencia significativa alguna en calidad y cantidad. Por tanto, concluyó - que sus resultados coincidían con los de Sottnek¹³⁶, en el -- sentido de que el Mueller-Hinton era más efectivo que el TSA- y, además, que la hemina y otros factores de crecimiento contenidos en el suero fetal bovino eran necesarios para - - - - Haemophilus ducreyi, independientemente de la base que se eligiera.

Por su lado, Oberhofer¹⁰⁴ comparó la eficiencia de los -

medios antes mencionados con la de la sangre coagulada; para ello siguió la técnica reportada por Borchardt¹⁴; extrajo entre 8 y 10 ml de sangre del paciente antes de que le fuera administrada la terapia con antibióticos, la distribuyó por partes iguales en 2 tubos de ensayo estériles y, una vez coagulada, eliminó parte de su suero asépticamente; después sometió el contenido de uno de los tubos a 56°C durante 30 minutos y, por último, inoculó ambos adicionándoles unas gotas de las muestras o rotando los hisopos que las contenían en el suero que rodeaba a los correspondientes coágulos; las muestras eran aspiradas de bubones y exudados genitales. El desarrollo de Haemophilus ducreyi en el tubo que contenía coágulo con suero inactivado no manifestó diferencias notables respecto al que contenía coágulo con suero sin inactivar, excepto que en el segundo crecieron menos microorganismos contaminantes, porque éste aún poseía las propiedades bactericidas conferidas por el complemento. No obstante, los mejores resultados se obtuvieron en los medios que contenían agar: mientras en ellos desarrollaron las 15 cepas (100%), en sangre coagulada sólo lo hicieron 12 (80%).

Más adelante, Sng¹³⁴ publicó que el medio agar Bacto-proteosa No. 3 con 0.1% de almidón soluble, 1% de IsoVitaleX, 15% de sangre humana y 3 µg/ml de vancomicina proporcionaba resultados exitosos.

Posteriormente, Hannah y Greenwood⁶⁷ llevaron a cabo un estudio que incluyó a 170 pacientes: 168 con úlceras genitales y 2 con bubones; en esta ocasión se aislaron 62 cepas de Haemophilus ducreyi; los medios evaluados para el aislamiento del mencionado microorganismo fueron agar chocolate, agar suero fetal bovino con 3 µg/ml de vancomicina y agar infusión de corazón (HIA) con 5% de sangre de carnero. Por mucho, el medio más eficiente fue el agar chocolate, ya que crecieron 51 de las 62 cepas, seguido por el agar suero fetal bovino con 3 µg/ml de vancomicina, en él desarrollaron 31 y, por último, el agar sangre de carnero, en el que sólo hicieron 2. Sin embargo, los mismos resultados revelan la gran utilidad de emplear al menos 2 medios diferentes para investigar la presencia de Haemophilus ducreyi: algunas cepas que no desarrollaron en agar chocolate sí lo hicieron en agar suero fetal bovino.

También Plummer¹¹² comparó el índice de aislamiento del bacilo de Ducrey en varios medios, concluyendo que el agar GC suplementado con hemoglobina bovina y suero fetal de ternera o el agar Mueller-Hinton con sangre de caballo achocolatada eran los mejores; el propio investigador comprobó esta afirmación en otros estudios^{111,113}.

Finalmente, en 1984 Sturm¹³⁹ experimentó con los medios siguientes: agar GC suplementado con 1% de IsoVitaleX, y 1% -

de hemoglobina, agar chocolate con 1% de IsoVitaleX, agar san gre de conejo preparado con agar Columbia, 30% de sangre des- fibrinada de conejo y 2.5% de extracto de levadura y, por úl- timo, una modificación del medio de Bieling la cual consiste en una mezcla de 2 partes de agar Columbia, 1 parte de sangre hemolizada de caballo y 2.5% de extracto de levadura. Los me jores índices de crecimiento de las 45 cepas en estudio, se - obtuvieron en agar sangre de conejo y en la modificación del- medio de Bieling.

Todo lo antes mencionado pone de manifiesto que la elec- ción del medio adecuado es aún confusa, debido a que existe - un elevado número de posibilidades. Sin embargo, es posible- resumir que se deben sembrar cuando menos 2 medios diferentes para intentar la recuperación del microorganismo en cuestión; lógicamente, se deben seleccionar de entre los mejores, pero- como se reportan medios óptimos distintos, resultaría útil -- que los autores unificaran criterios, tomando en cuenta: los- índices de aislamiento utilizando un elevado número de cepas, la confiabilidad de sus resultados en función de diferentes - analistas, los tipos de muestra y en distintos estadios del - padecimiento y, desde luego, de su disponibilidad. Si se con- sideran estos parámetros, podría pensarse en el agar sangre - de conejo^{136,139}, el agar suero fetal bovino adicionado de -- 5 µg/ml de vancomicina^{67,136} y la gelosa chocolate suplementa da con 1% de IsoVitaleX y 3 µg/ml de vancomicina^{63,93,110} ---

o enriquecida con sangre fresca y 1% de hemoglobina^{104,136}; - no obstante, es conveniente recordar que la vancomicina podría afectar a algunas cepas de Haemophilus ducreyi. Así también, es posible considerar que las mejores bases para preparar los medios anteriores son el agar Mueller-Hinton y el agar infusión de corazón (HIA).¹⁰⁴

En cuanto a las condiciones adecuadas para cultivar a -- Haemophilus ducreyi, en el laboratorio se han establecido después de varios trabajos de investigación. Por lo que respecta a la temperatura óptima, los experimentos principales corrieron por cuenta de Sturm¹³⁹, quien analizó 10 cepas de referencia y 19 provenientes de muestras clínicas; los resultados obtenidos mostraron que el mejor índice de desarrollo se manifiesta entre los 28 y 33°C, siendo máximo a esta última temperatura. Estos datos fueron posteriormente confirmados por Kinghorn⁸⁰. Por cierto que en los estudios de Sturm¹³⁹, 2 de las cepas de referencia y 12 de las de origen clínico pudieron desarrollar a 22°C.

Por lo que se refiere al tiempo de incubación, cabe señalar que se trata de un microorganismo de desarrollo lento que requiere más de 48 a 96 horas para formar colonias visibles²⁶; de hecho, Hammond⁶³ publica un rango que va de 2 a 9 días, con una media de 4.

Como las demás especies del género, esta bacteria es ---

facultativa; sin embargo, es casi indispensable que se le proporcione entre 5 y 10% de CO_2 ^{43,110}; además, para que el desarrollo sea máximo, debe garantizársele una atmósfera saturada de vapor de agua^{80,137}; esto último está demostrado desde --- 1958, cuando Vigil Lagarde¹⁵⁰ en México, desarrolló investigaciones sobre el particular.

Acerca de la morfología macroscópica, en general las colonias de Haemophilus ducreyi se describen como circulares, - planas, opacas, translúcidas y compactas, amarillentas o de color marrón, que pueden ser empujadas intactas con el asa sobre la superficie de los medios sólidos¹⁰⁴. En agar chocolate, después de 72 horas de incubación, son aproximadamente de 0.5 mm. de diámetro, lisas, grisáceas y translúcidas²⁰; en -- agar sangre, el crecimiento es escaso y no se presenta satelitismo en el caso de que exista desarrollo de S. aureus²⁰. -- Algunas cepas pueden originar una zona de hemólisis débil, la cual también se observa en agar sangre Mueller-Hinton después de 4 ó 5 días de incubación¹⁰⁴.

Una característica especial que muestran las colonias del bacilo de Ducrey es que son imposibles de emulsificar; los -- intentos por obtener suspensiones homogéneas mediante el tratamiento con enzimas tales como tripsina, papaina o celulasa, así como con H_2SO_4 o KOH al 20% han sido infructuosos, lo --- cual sugiere la presencia de una matriz intersticial que une-

a los microorganismos que integran la colonia; de hecho Mc -- Entegart⁹⁷ piensa que ésta es la razón de que se observen --- fragmentos de colonias y microcolonias intactas cuando se exa minan al microscopio preparaciones teñidas al Gram.

Por otro lado, es importante señalar que una adecuada -- conservación de Haemophilus ducreyi se logra a -70°C en leche descremada estéril, aunque los subcultivos continuos son nece sarios para mantener su viabilidad¹⁰⁴. Además, cabe destacar que esta bacteria puede conservar su virulencia aún después - de permanecer liofilizada durante 18 meses¹³⁹.

1.1.4 IDENTIFICACION.

Identificar el bacilo de Ducrey constituye una tarea di- ffcil, especialmente cuando forma parte de cultivos mixtos. - Por esta razón, Hafiz⁶¹ propone utilizar una prueba clasifica da como presuntiva, la cual se basa en el hecho de que, a di- ferencia de otros, este microorganismo es capaz de causar la agregación del almidón; no se puede hablar de que esto se --- deba a algún tipo de hidrólisis, pues aún no se ha demostrado. La prueba consiste en sembrar medios que contengan hemina, al midón de maíz, glutamina y cocarboxilasa, ya que en ellos - - Haemophilus ducreyi produce colonias rodeadas por halos opales centes, después de 48 horas de incubación a temperaturas de- 33 a 35°C; el fenómeno se observa mejor contra fondo oscuro o también puede ponerse de manifiesto con solución de iodo de -

Gram al 30%, la cual originará la presencia de una coloración azul-negra en torno a las colonias, como el iodo causa la muerte del microorganismo, es importante limitar su adición a un pequeño sector de la caja de Petri para no dañar a otras colonias que pudieran ser empleadas posteriormente para obtener subcultivos y/o efectuar otras pruebas. Este método presenta como ventajas su sencillez y rapidez, especialmente cuando los cultivos de las supuestas úlceras chancroidales son mixtos.

Como ya se mencionó, las colonias de microorganismos Gram-negativos, gris amarillentas, translúcidas, no mucoides y que permanezcan prácticamente intactas al ser empujadas sobre la superficie de agar, pueden considerarse sospechosas de ser Haemophilus ducreyi^{20,26,104}. En este sentido la prueba de las oxidasas y los auxonogramas de factores X y V deben utilizarse como recursos en la confirmación²⁶.

La prueba de las oxidasas debe realizarse con clorhidrato de N-N tetrametil p-fenilendiamina, ya que la forma dimetilada del sustrato suele redituar falsos negativos; este hecho singular fue detectado por Nobre^{102,103}, quien analizó 42 cepas de Haemophilus ducreyi con el objeto de esclarecer los datos discordantes de Sottnek¹³⁶ y Oberhofer¹⁰⁴ (el primero reportaba la prueba como positiva y el segundo como negativa).

Para investigar el requerimiento de factor X, una técnica

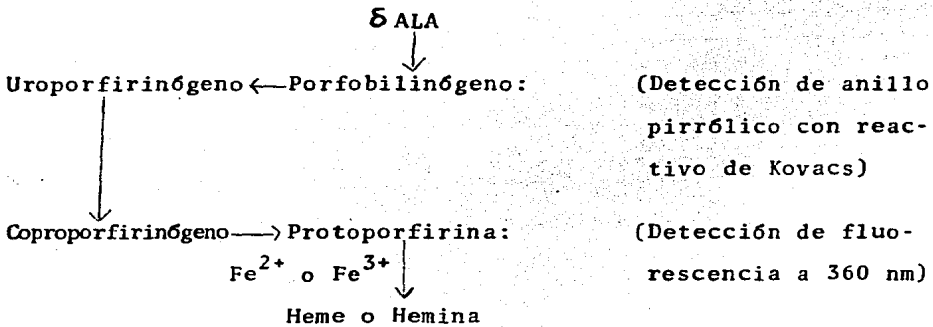
ca confiable incluye la inoculación masiva del medio GC adicionado de 0.1% de glucosa y 0.01% de glutamina, seguida por la colocación de los discos de papel filtro impregnados con hemina^{64,104}.

Por otro lado, se sabe que muchas de las bacterias independientes del factor X excretan porfobilinógeno (PGB) y porfirinas; éstos son compuestos intermediarios en la vía biosintética de la hemina, cuyo sustrato es el ácido δ -amino levulínico. Por el contrario, las cepas que requieren hemina no liberan estas sustancias porque carecen de las enzimas encargadas de llevar a cabo su síntesis²⁰; en los hechos anteriores se basa la prueba de la porfirina, considerada como la más confiable para determinar la dependencia de factor X, consiste en inocular suspensiones de bacterias provenientes de cultivos sólidos en 0.5 ml de un sustrato constituido por ácido δ -amino levulínico 2mM y $MgSO_4$ 0.08 mM en amortiguador de fosfatos 0.1M a pH 6.9; después de una incubación de 4 horas a 37°C, la lectura se realiza utilizando una lámpara de Wood (360nm) y preferentemente en cuarto oscuro: una fluorescencia roja procedente de las protoporfirinas presentes en el fluido y/o las células, indica que la cepa es independiente del factor X^{20,64}. Otra alternativa para revelar el fenómeno es: -- adicionar 0.5 ml de reactivo de Kovacs, agitar vigorosamente y permitir que se separen las 2 fases; un color rojo en la fase acuosa inferior indicará la presencia de porfobilinógeno; --

sin embargo, cuando se aplique este último método de lectura, será indispensable incluir un tubo testigo que no deberá contener δ ALA, para evitar falsos positivos debidos a coloraciones rojas resultantes de la reacción entre el indol y el reactivo de Kovacs²⁰

VIA BIOSINTETICA DE LAS PORFIRINAS

PRUEBA DE --
LAS PORFIRINAS



Otra característica bioquímica de Haemophilus ducreyi es que reduce los nitratos a nitritos siempre y cuando el medio de reacción sea el adecuado; en este aspecto, el de mayor éxito es el que contiene caldo peptonado, 0.2% de KNO₃ y 10% de suero fetal bovino o 20% de suero de conejo¹⁰⁴.

Cabe señalar que las minitécnicas también pueden aplicarse para identificar el bacilo de Ducrey, Hannah y Greenwood⁶⁷ evaluaron un método cuyo nombre es RapID NH system (Innovative Diagnostic Systems, Inc., Decatur, Ga.), el cual requiere de-

una placa pequeña de plástico con cavidades para realizar las pruebas siguientes: actividad de fosfatasa, reducción de nitratos a nitritos, hidrólisis del o-nitrofenil D-galactopiranosido (ONPG), producción de ácido a partir de glucosa y sacarosa, hidrólisis de urea, producción de indol y utilización de ornitina. El inóculo para dicho sistema se prepara a partir de cultivos sólidos de 18 a 24 horas; las colonias se depositan en tubos de 1 ml con solución acuosa de KCl , $CaCl_2$ y $FeCl_3$ y las suspensiones se ajustan a una turbidez adecuada (Mc Farland No. 3); posteriormente, éstas se transfieren por medio de una pipeta Pasteur a diferentes cavidades y, tras una incubación de 4 horas a una temperatura de entre 35 y 37°C, se efectúan las lecturas. Los resultados obtenidos al aplicarse el método en cuestión fueron excelentes, ya que las 64 cepas caracterizadas previamente como H. ducreyi por el Center for Disease Control evidenciaron pruebas bioquímicas congruentes y ningún otro microorganismo de los utilizados como control negativo se manifestó erróneamente como bacilo de Ducrey.

TABLA 1.
 REACCIONES BIOQUIMICAS DE 101 CEPAS DE MICROORGANISMOS
 EVALUADAS POR EL RapID NH^{36,67}.

MICROORGANISMO	NUMERO DE POSITIVOS PARA ^a :								
	No.	PO ₄	NIT	ONPG	GLU	SAC	IND	URE	ORN
<u>H. ducreyi</u>	64 ^b	64	64	0	0	0	0	0	0
<u>H. influenzae</u>									
biotipo 1.	6	6	6	0	5	0	6	5	6
biotipo 4.	1	1	1	0	1	0	0	1	1
<u>H. parainfluenzae</u>	5	5	5	5	5	5	5	5	0
<u>H. aphrophilus</u>	2	2	2	2	2	2	0	0	0
<u>N. mucosa</u>	2 ^c	0	1	0	2	2	0	0	0
<u>N. lactamica</u>	6 ^d	0	0	5	4	1	0	0	0
<u>N. gonorrhoeae</u>	5	0	0	0	3	0	0	0	0
<u>N. meningitidis</u>	8	0	0	0	8	0	0	0	0
<u>N. vaginalis</u>	2 ^e	1	1	2	2	0	0	0	0

- a. PO₄ = actividad de fosfatasa; NIT = reducción de nitratos; ONPG = hidrólisis del o-nitrofenil D-galactopiranosido; GLU = utilización de glucosa; SAC = utilización de sacarosa; IND = producción de indol; URE = actividad de ureasa; ORN = actividad de ornitina descarboxilasa.
- b. Incluye 2 cepas de referencia.
- c. Una cepa fue determinada incorrectamente como miembro del grupo N. subflava-N. sicca.
- d. 2 cepas se identificaron incorrectamente; una como G.vaginalis y la otra como N. mucosa.
- e. No pudieron ser identificadas.

TABLA 2

CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DEL GENERO HAEMOPHILUS

CARACTERISTICAS	<u>H. ducreyi</u>	<u>H. influenzae</u>	Biovar I	Biovar II	Biovar III	Biovar IV	Biovar V	Biovar VI	<u>H. aegyptius</u>	<u>H. haemolyticus</u>	<u>H. parainfluenzae</u>	Biovar I	Biovar II	Biovar III	<u>H. aphrophilus</u>
Requerimiento de factor V.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
ALA porfirinas.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	W
Indol.	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	d	-	-	-	-
Ureasa.	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
Ornitina descarboxilasa.	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
Hemólisis	[d]	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Reacción de CAMP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acido de D-glucosa.	[d]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas de D-glucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	[d]	[d]	[d]	[d]	[d]	-	+
Acido de:															
D-fructosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	-	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
β -galactosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	d	d	+
Catalasa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	+	-
Crecimiento en presencia de CO ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Fosfatasa alcalina.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa.	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
H ₂ S	-	-	-	-	d	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Reducc. de nitratos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reducc. de nitritos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	+	+	+	+

SIMBOLOS: + = 90% o más de las cepas son positivas; d = 11-89% de las cepas son positivas; - = 10% o menos de las cepas son positivas; [d] = 11-89% de las cepas dan reacción positiva retardada; [+]= 90% o más de las cepas dan reacción retardada; W= reacción débilmente positiva.

1.1.5 FACTORES DE VIRULENCIA.

Los mecanismos de patogenicidad de Haemophilus ducreyi son pobremente comprendidos; de hecho, se han reportado relativamente pocos estudios sobre este particular.

La única prueba^{62,107} aceptada para evaluar la virulencia del bacilo de Ducrey es la que consiste en inocular intradérmicamente 0.2 ml de una suspensión de 10^9 UFC (unidades formadoras de colonias) de Haemophilus ducreyi por ml de caldo infusión cerebro-corazón a conejas australianas blancas de un año de edad, con un peso comprendido entre los 2 y 3 kg; las lecturas correspondientes se efectúan diariamente y dependen de la detección de induración y necrosis dentro de los 11 días que siguen a la inoculación. Concretamente, el criterio para determinar si una cepa es virulenta se basa en la aparición de una induración de 0.5 cm. de diámetro con una reacción inflamatoria central a los 4 días y que progresa a escarificación en el onceavo día.

Para confirmar la patogenicidad de Haemophilus ducreyi en humanos, Dienst³³ realizó inoculaciones del microorganismo en el muslo de voluntarios después de someterlos al siguiente tratamiento: lavó la región mencionada con agua y jabón, después practicó unas escarificaciones lo suficientemente profundas cuidando de no provocar sangrado y colocó en las heridas, frotando con algodón estéril, $1/10$ de cm^3 de un cultivo de Haemophilus ducreyi obtenido en sangre de conejo; posterior-

mente, cubrió el área con una gasa limpia. A las 72 horas, las cepas virulentas produjeron pústulas cuyos exudados contienen bacterias con la morfología característica del bacilo de Ducrey, según lo demostraron las tinciones de Gram y Pappenheim. Cabe el comentario de que las que originaron estos resultados positivos fueron incapaces de producir lesiones cuando se depositaron sobre la piel íntegra.

Más tarde, Odumeru¹⁰⁷ demostró que las cepas virulentas eran resistentes a la acción bactericida tanto del suero normal de humanos como al de conejos y a la fagocitosis llevada a cabo por los leucocitos polimorfonucleares humanos; esto, desde luego, no sucedía con las avirulentas.

Por cierto, se observó que la mencionada actividad bactericida del suero normal resultó dependiente del complemento, ya que las cepas originalmente sensibles sobrevivieron cuando se incubaron a 35°C durante 2 horas con suero inactivado. -- Además, sus resultados también indican que se requiere del -- complemento para la eficiente actividad de los polimorfonucleares humanos sobre Haemophilus ducreyi.

Como es sabido, la virulencia de diversas bacterias Gram negativas está directamente relacionada con su resistencia a la acción bactericida del suero¹⁴¹, ya que esto les permite que desarrollen en los tejidos. De lo mencionado anteriormente, se propone que la sobrevivencia de Haemophilus ---

ducreyi a la acción letal del suero (mediada por el complemento) y a la actividad bactericida de los polimorfonucleares humanos, son características que le confieren capacidad para establecerse y reproducirse en los tejidos y, por ende, que contribuyen a la virulencia del microorganismo.

La invasividad de Haemophilus ducreyi también se ha asociado con su resistencia a los antibióticos (especialmente a la polimixina B), ya que cepas cuya virulencia se evaluó por la antes mencionada prueba de inoculación intradérmica en conejos, resultaron resistentes a la acción bactericida de la polimixina B, siendo la CMI mayor de 32 $\mu\text{g/ml}$: lógicamente, las cepas avirulentas resultaron especialmente sensibles a este antimicrobiano²⁶.

Odumeru¹⁰⁷ fracasó en sus intentos por obtener cepas avirulentas a partir de unas virulentas, resistentes a la polimixina y sólo logró la pérdida de la resistencia a este antibiótico, ya que los microorganismos utilizados permanecieron siendo patógenos para los conejos y resistentes a la actividad bactericida del suero normal y a la de los polimorfonucleares humanos. Además, la adquisición de resistencia a la polimixina por parte de algunas cepas avirulentas no se tradujo en su conversión a virulentas o en que se tornaran resistentes a la acción bactericida del suero y de los granulocitos humanos. El único cambio fenotípico observable consistió

en la pérdida de una proteína cuyo peso molecular es de 47,000 daltons.

Thayer¹⁴⁴ tuvo éxito en lo que se refiere a convertir -- una cepa virulenta de Haemophilus ducreyi en avirulenta, realizando pases sucesivos durante varios meses; no obstante el microorganismo no manifestó cambio alguno en cuanto a su sensibilidad a la polimixina. Estos resultados sugieren que la resistencia a la polimixina no está relacionada directamente con la virulencia de las cepas.

En resumen, los estudios anteriores muestran que las cepas virulentas del bacilo de Ducrey son resistentes a la acción bactericida del suero normal, a la fagocitosis y a la polimixina, aunque en este último caso puede asegurarse que sólo se trata de un marcador circunstancial.

Posteriormente, Odumeru¹⁰⁶ trató de determinar la vía -- mediante la cual se activa el complemento para reeditar la -- destrucción de Haemophilus ducreyi y la importancia de su lipopolisacárido (LPS) en la susceptibilidad a la actividad bactericida del suero. Los experimentos indicaron que la vía -- clásica estaba involucrada en la muerte de las cepas: la inhibición selectiva de esta vía tratando el suero con EGTA [ácido etilén glicol-bis (β -aminoetileter) N,N,N',N'tetraacético] -- 20 mM y MgCl₂ 2 mM, eliminaba la actividad bactericida. En contraste, el suero tratado con inulina o sometido a calenta-

miento a 50°C durante 20 minutos (para neutralizar el factor-B requerido en la activación del complemento por la vía alterna), siguió siendo bactericida; de ésto se desprende que es muy probable que la vía alterna no esté relacionada con la muerte del microorganismo, aunque ello resulte extraño. Otras bacterias Gram-negativas como Haemophilus influenzae, Salmonella sp. y Escherichia coli se distinguen por activar ambas vías del complemento y, en cambio, Neisseria gonorrhoeae y Pseudomonas aeruginosa lo activan principalmente por la vía clásica¹³¹.

El citado investigador¹⁰⁶ hizo una diferenciación de las cepas de Haemophilus ducreyi de acuerdo a su susceptibilidad a una mezcla de sueros provenientes de 5 individuos sanos y sin antecedentes de haber padecido chancro blando, denominando suero-resistentes a las que resistían la acción de la mezcla en cuestión y suero-susceptibles a las que no lo hacían. La adsorción posterior del suero con microorganismos suero-susceptibles sometidos a calentamiento eliminó su efecto bactericida sobre las suero-susceptibles, mientras que la correspondiente adsorción con suero-resistentes, también tratadas con calor, sólo provocó una eliminación parcial del efecto bactericida. Los anteriores resultados hicieron suponer que ciertos componentes termoestables de la superficie bacteriana --- estaban involucrados en el efecto bactericida del suero y, --- asimismo, que las cepas suero-resistentes y suero-susceptibles --- diferían precisamente en sus componentes celulares termo

estables.

Además, Odumeru¹⁰⁶ encontró que el LPS de las cepas suero-susceptibles inhibía la acción bacteriolítica del suero -- mientras que el de las suero-resistentes, aún en altas concentraciones, no lo hacía; por ello, concluyó que la composición del LPS de Haemophilus ducreyi puede ser un factor importante en lo que se refiere a la susceptibilidad del microorganismo al suero.

En otros estudios¹³¹, se ha comprobado que el LPS de cepas suero-susceptibles de Escherichia coli y Neisseria gonorrhoeae también inhibe la actividad bactericida del suero, como resultado de una acción anticplementaria, o bien porque favorece la unión de las células dificultando la bacteriolisis mediada por el complemento. En los resultados¹⁰⁶ hubo -- una correlación entre la actividad anticplementaria del LPS del bacilo de Ducrey y el efecto bactericida del suero; así, se dedujo que la acción inhibitoria del LPS de las cepas suero-susceptibles sobre la actividad bactericida del suero, probablemente se deba a su capacidad para activar y agotar el -- complemento. Asimismo, las diferencias en la actividad anticplementaria del LPS de Haemophilus ducreyi quizá se deban a variaciones en la estructura química de las diferentes -- cepas.

Concluyendo, se piensa que la activación de la vía clásica

ca del complemento está involucrada con la muerte de Haemophilus ducreyi y que la composición del LPS bacteriano cumple un papel muy importante en la acción bactericida del suero.

1.1.6 RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS.

Para abordar el tema sobre la resistencia de Haemophilus ducreyi a los antimicrobianos, es necesario repasar los mecanismos mediante los cuales las bacterias intercambian material genético, ya que estos procesos se encuentran íntimamente relacionados con el fenómeno en cuestión.

Los principales mecanismos de recombinación genética son la transducción y la conjugación, toda vez que la transformación es un evento que, a la fecha, sigue considerándose limitado a condiciones in vitro⁷².

La transducción es mediada por ciertos bacteriófagos, -- los cuales se caracterizan por su capacidad para incorporar una pequeña porción del DNA de la célula huésped a su ácido nucleico, misma que transferirá ulteriormente a otra bacteria susceptible. Existen 2 tipos de transducción: la especializada y la generalizada; en la primera, sólo se transfieren marcadores genéticos adyacentes al sitio en el que se inserta al ácido nucleico del profago; esta clase de fenómeno está restringido a fagos temperados cuyo DNA es homólogo en tan sólo uno o algunos sitios al bacteriano. En la transducción gene-

realizada cualquier región del cromosoma bacteriano tiene las mismas probabilidades de ser transducida y ocurre cuando se forma accidentalmente una partícula viral que contiene a la porción del genoma bacteriano. Consecuentemente, al ocurrir la lisis de la bacteria, una parte de su DNA será llevada por el virus y posteriormente, cuando éste infecte a otra célula bacteriana, parte del material genético de la primera quedará integrado al genoma de la segunda⁴⁵.

La conjugación consiste en la transferencia de material genético de una bacteria donadora hacia otra receptora, una vez que éstas han entrado en contacto; se presenta en algunas especies bacterianas que poseen varios tipos de plásmidos (material genético extracromosomal) uno de los cuales funciona como iniciador y regulador del fenómeno; por tal razón, a este último se le denomina F: factor de fertilidad⁴⁵.

Por lo general, los plásmidos no son esenciales para la supervivencia de la bacteria pero pueden contener genes que confieren alguna ventaja selectiva, tal como la capacidad para sintetizar toxinas, adquirir resistencia a los antimicrobianos, etc. En cuanto a los plásmidos de Haemophilus ducreyi, su presencia se detectó por primera vez durante un brote de Chancroide en Canadá⁶²; en esa ocasión se aislaron 19 cepas, 5 de las cuales poseían uno no conjugativo de 6 megadaltons, el cual se denominó PJB1, que inducía la producción de cier-

tas β -lactamasas caracterizadas más tarde como TEM-1⁹².

Tanto este como otros plásmidos presentes en el bacilo de Ducrey no se conjugan por sí mismos; tal es el caso también de uno de 4.9 megadaltons que le confiere resistencia a las sulfonamidas^{4,30,122} y de los de 7.4, 7, 5.7 y 3.6 megadaltons que degradan a la ampicilina; por cierto que, estos 4, fueron identificados en un estudio¹⁴⁸ en el que se analizaron 7 cepas aisladas en diferentes áreas geográficas (incluyendo México).

Sin embargo, se ha podido comprobar que todos los plásmidos anteriores se transfieren por conjugación cuando la célula donadora posee otro de 23.5 megadaltons, fenotípicamente oculto, que los moviliza³⁰.

Otro estudio¹⁴⁶ relacionado con la transferencia del material genético en Haemophilus ducreyi, incluyó el análisis de 7 cepas aisladas en Sudáfrica; en la primera parte del experimento se detectó la presencia de plásmidos de 3.95, 5.2, 5.8 y 6.4 megadaltons y todos, excepto el de 5.8 megadaltons, contenían información para la producción de β -lactamasas. Posteriormente, los plásmidos de 5.2 y 6.4 megadaltons se lograron transferir por conjugación a otras cepas de Haemophilus ducreyi resistentes a la estreptomomicina¹²; esto último condujo a pensar que las células receptoras poseían algún plásmido de gran peso --

molecular capaz de movilizar a los que les fueron donados.

Cabe señalar que el bacilo de Ducrey también presenta plásmidos conjugativos; entre ellos destacan uno de 30 megadaltons que degrada ampicilina y puede intercambiarse con Haemophilus-influenzae¹⁸ y otro de igual peso que proporciona resistencia a la tetraciclina^{5,17}; este puede transferirse por conjugación entre diferentes cepas de Haemophilus ducreyi, e inclusive, de ésta a otras especies del género.

Es importante mencionar que el material genético extracromosomal cuya transferencia no se ha logrado mediante conjugación, se ha podido donar in vitro a través de transformación; ésta difiere de los 2 mecanismos anteriores en que las células receptoras son capaces de captar moléculas de DNA (liberadas previamente por lisis celular) directamente del medio. Debe subrayarse que las células transformables presentan un sistema de transporte de moléculas de DNA en su superficie y su eficiencia depende de que se encuentren en medios favorables, aún durante períodos cortos; en este sentido, se dice entonces que dichas células son competentes. No se ha dilucidado del todo el carácter de competencia, pero se piensa que radica en la capacidad de su pared celular para formar orificios o zonas desnudas y en que poseen receptores específicos que facilitan la captación de DNA⁷².

Entre las transformaciones que se han obtenido con DNA de

plásmidos no conjugativos de Haemophilus ducreyi, se cuentan: - la originada en una cepa de Escherichia coli (con DNA purificado del plásmido PJB1) a la que se convirtió en productora de β -lactamasas¹⁸, la inducida en Haemophilus parainfluenzae y Escherichia coli con plásmidos de 5.7 y 7 megadaltons para que se transformaran en resistentes a la ampicilina¹⁷ y la provocada con plásmidos de 7.4 y 3.6 megadaltons a Escherichia coli para que dejara de ser sensible a la ampicilina¹⁴⁸.

En otro estudio¹⁷ interesante se analizó la relación - - - entre los plásmidos PMR0360, RSF0885 y PJB1, responsables de la producción de β -lactamasas en Neisseria gonorrhoeae, Haemophilus parainfluenzae y Haemophilus ducreyi respectivamente, - observándose que existe una estrecha similitud entre ellos, ya que sólo difieren en segmentos discretos de DNA. Por cierto, - los plásmidos PMR0360 y PJB1 mostraron secuencias homólogas de 3.3 megadaltons. También se han comparado los plásmidos que - confieren resistencia a la ampicilina en Haemophilus ducreyi y Neisseria gonorrhoeae, comprobándose que existen similitudes - estructurales^{7,98,99}. Además, la investigación efectuada con un plásmido de 30 megadaltons cuya presencia se ha detectado - en cepas resistentes a tetraciclina, reveló que éste presenta - ciertas homologías con otros encontrados en diversas especies - del mismo género; por esta razón, se ha sugerido que tienen un origen común^{5,95}.

1.2 PATOLOGIA Y EPIDEMIOLOGIA

La enfermedad con la que se relaciona a Haemophilus - - - ducreyi se denomina chancroide o chancro blando; se adquiere por contacto directo⁷⁰ y se presenta cuando el microorganismo penetra a través de pequeñas escoriaciones de la piel o mucosa, las cuales probablemente tienen origen durante el acto -- sexual¹²⁷.

El periodo de incubación del padecimiento es aproximadamente de 2 a 5 días, aunque se han reportado casos en los que dicho tiempo ha sido de 24 horas, o bien hasta de 5 días o -- más, dependiendo de la virulencia de la cepa involucrada^{122,127}

La lesión primaria generalmente es muy dolorosa, empieza como una pequeña pápula rodeada de una zona eritematosa, que posteriormente se convierte en pústula y en 1 o 2 días se --- ulcera; sus bordes son socavados y su base está frecuentemente cubierta por un exudado de apariencia sucia y color grisáceo que, cuando se remueve, permite la visualización de una - capa desigual de tejido granular vascularizado. Desde el punto de vista histológico, la lesión manifiesta 3 zonas: una su perfiacial de leucocitos polimorfonucleares, eritrocitos, bacterias y restos necróticos, la central de edema y neovascularización y otra, la más profunda, constituida por macrófagos, linfocitos y plasmocitos^{15,43}.

Las úlceras individualmente presentan un tamaño de 3 a 20 mm. y al ser palpadas revelan ausencia de induración, pudiendo sangrar debido a su extrema sensibilidad. Cabe señalar que, en la mujer, el contacto con la orina es especialmente doloroso¹²².

Generalmente se presentan úlceras múltiples debido a la autoinoculación realizada por aposición de la piel normal con la región afectada⁴⁰, aunque no todas las lesiones se encuentren necesariamente en el mismo estado de desarrollo, ya que puede manifestarse una combinación de pápulas, pústulas, úlceras tempranas muy dolorosas o tardías e indoloras o simplemente tratarse de una única úlcera. Aunque Gaisin⁴³ publicó que este caso no es común, Asin⁹ reportó que el 70% de 1,402 pacientes con chancroide sólo presentaba una úlcera.

En ambos sexos, las áreas genitales y perianales son las más comúnmente involucradas; no obstante existen algunos reportes de que manos y boca también pueden ser afectados. --- Kinghorn⁷⁸ informó de los primeros casos de infección orofaríngea confirmados con cultivo, al encontrar que Haemophilus ducreyi podía aparecer en esta zona sin inducir sintomatología alguna, pero que afecciones previas por microorganismos tales como Candida albicans estimulaban la manifestación de procesos patológicos por el bacilo de Ducrey; esta deducción se originó al observarse que un paciente que presentaba pla-

cas candidiales padecía también úlceras chancroidales, mientras que otras 3 personas que declaraban practicar contacto orogenital sólo presentaban lesiones en los genitales aunque el cocobacilo podía aislarse también a partir de su orofaringe.

En el hombre, los sitios que más comúnmente se ven involucrados son el orificio del prepucio y/o la superficie mucosa de éste y menos frecuentemente el glande y/o el ano; la diseminación local de la bacteria puede conducir a su inclusión en perineo, escroto, muslos y la región baja del abdomen. En la mujer, las zonas mayormente afectadas son: labios, clitoris y ano y, raramente, cérvix, muslos u otras áreas relativamente lejanas⁴³.

Sin embargo, existen diversas variantes clínicas del --- chancroide; entre ellas pueden citarse^{43,122}:

- El chancro blando transitorio, en el cual la ulceración desaparece rápidamente en 4 o 6 días, pero es seguida de una linfadenitis regional aguda con supuración en los siguientes 10 a 20 días; cuando este ocurre, su diferenciación del linfogranuloma venéreo llega a dificultarse notablemente.
- El chancroide fagedénico, que proviene de una pequeña úlcera la cual evoluciona hasta que adquiere un gran-

tamaño, causando destrucción aguda y amplia de los genitales externos; se encuentra relacionado con la presencia de flora mixta aerobia y anaerobia, y muy especialmente con la infección por espiroquetas; afortunadamente este tipo de chancro blando no es frecuente.

- El chancroide gigante, el cual también inicia como una pequeña úlcera que se disemina rápida y superficialmente -- por extensión periférica o autoinoculación en la región -- suprapúbica y muslos, seguida de la ruptura de los abscesos inguinales; a pesar de que esta variante afecta grandes áreas, no es profundamente destructiva.
- El chancro blando ulcerado o tipo serpiginoso; muy parecido al chancroide gigante, excepto que las lesiones son -- largas y relativamente estrechas y su curación es lenta, -- requiriendo meses e inclusive años.
- El chancroide folicular; simula una simple foliculitis -- piógena y se presenta generalmente en regiones tales como la vulva externa.
- El chancroide enano, que consiste de muchas úlceras pequeñas semejando herpes genital; en ocasiones ello da lugar a que este último se confunda con un supuesto chancroide recurrente⁷¹.
- El chancro blando papular; inicia por una pápula que más tarde se convierte en una ulceración con bordes elevados; por cierto la lesión semeja a la del condilomata lata de la sífilis.

- El chancroide con apariencia de granuloma inguinal; en éste las úlceras se encuentran rodeadas de un borde -- elevado y la base de la misma es friable, roja y en su periferia existe un exudado mucopurulento^{84,123,149}. Las causas de que adquiriera la misma apariencia que el granuloma inguinal se desconocen, aunque se ha relacionado con ello: la resistencia de las cepas a ciertos antimicrobianos, la concentración local inadecuada de los mismos durante el tratamiento, la humedad persistente o los traumas repetidos que retardan el proceso de curación y una respuesta inmune alterada; lo anterior no ha sido confirmado, por lo que se sugiere que únicamente se trata de una variante clínica de la enfermedad¹⁵³.

En cuanto a las principales complicaciones, la linfadenopatía regional de la ingle es la más común y ocurre en 30 a 50% de pacientes con chancro blando; en dos tercios de los casos afecta sólo a un ganglio inguinal, cursa unilateralmente y si no se trata, puede ocurrir la necrosis de la zona central y su rompimiento, formándose una fístula que puede dar lugar al -- chancroide gigante^{15,43,143}.

Otro hecho interesante es que alrededor del 12 al 15% de personas con chancro blando padecen también sífilis primaria⁸⁹. Asin⁹ encontró que de 1,402 enfermos de chancroide, 94 presen-

taban este otro padecimiento y en todos ellos la apariencia de la lesión era la típica del chancro blando; además, observó -- que cuando el chancro mixto no se trataba, o bien lo era con sulfonamidas, se desarrollaba una induración después de 2 a 4-semanas. Por otro lado, es conveniente recordar que otras enfermedades de transmisión sexual como el linfogranuloma venéreo o el granuloma inguinal pueden acompañar la infección chancroidal. Otra complicación del chancroide consiste en la formación de úlceras profundamente destructivas del glande, que causan lesiones uretrales muy dolorosas al orinar; también se observan ocasionalmente verrugas acuminadas en el sitio donde antes estuvieron úlceras chancroidales que sanaron⁴³.

Por lo que se refiere a los síntomas que acompañan al -- chancro blando, estos son muy variables, excepto en el caso de la fiebre, bubones que supuran y la leucocitosis; los signos de enfermedad sistémica son raros y sugieren otros padecimientos. Cabe señalar que a la fecha no se han descrito bacterias ni patologías distantes de los ganglios linfáticos regionales¹²⁷.

Por último puede establecerse que el chancroide sin complicaciones cura en general en semanas o meses sin cicatrificaciones mayores u obstrucciones linfáticas⁴³.

Por lo que se refiere a epidemiología, cabe recordar que el chancroide se adquiere generalmente a través del contacto

sexual y su transmisión por otras vías se considera poco factible¹²⁷. Aunque anteriormente se pensaba que sólo afectaba las zonas tropicales y subtropicales, en la actualidad se sabe que esta enfermedad es endémica en todo el mundo y se encuentra relacionada directamente con la promiscuidad y la carencia de higiene personal¹²². De hecho, los mayores índices de incidencia se han manifestado durante las épocas de guerra; así lo demuestra un estudio⁹ realizado a las tropas americanas combatientes en Corea, en el cual se encontró que el padecimiento en cuestión era más común que la sífilis y la gonorrea. Asimismo, en otra investigación⁷⁴ que involucró a los miembros del ejército norteamericano que participó en el conflicto de Vietnam, el chancroide ocupó el primer lugar en frecuencia entre las enfermedades de transmisión sexual; el mismo trabajo dejó constancia de que los soldados negros lo padecían más frecuentemente que los caucásicos, debido probablemente a la desigual prevalencia de la afección entre las parejas sexuales de ambos grupos y a que había un mayor número de caucásicos circuncidados; sin embargo, no debe descartarse la posibilidad de que exista cierta susceptibilidad de raza a esta enfermedad.

Pero los estudios sobre brotes de chancroide incluyen también a población civil: en 1977, se reportaron 975 enfermos de chancroide de un total de 32,500 adultos analizados en Groenlandia⁹⁰; el autor sugiere que la afección fue llevada por algún marino y, debido al gran índice de promiscuidad en esa -

población, se diseminó rápidamente a lo largo de la costa oeste. En cuanto a la relación masculino/femenina de incidencia, ésta fue de 1.4:1, lo cual significa una promiscuidad similar entre hombres y mujeres.

Por otro lado, Nayyar¹⁰¹ investigó la incidencia del chancroide de Rotterdam y detectó 58 casos entre 1977 y 1978, un número muy superior al registrado en años anteriores. En este caso, el 89% de los enfermos adquirieron el padecimiento al tener contacto sexual con prostitutas que frecuentemente eran visitadas por inmigrantes turcos, portugueses y marroquíes, en cuyos países de origen existía una elevada prevalencia de la enfermedad, según datos obtenidos en el mismo estudio.

En 1983, Plummer¹¹² realizó una investigación acerca de la epidemiología del chancro blando de Nairobi, Kenya; ésta evidenció el hecho de que el 57% de los hombres enfermos adquirían la infección a través de prostitutas, 36% de parejas casuales, 4% de parejas constantes y 3% de sus esposas. De las prostitutas implicadas en la transmisión, sólo 4% fueron portadoras asintomáticas pero no se pudo establecer si se trataba de portadoras transitorias o persistentes, o bien si dichas mujeres se encontraban dentro del período de incubación de la enfermedad cuando se recolectaron las muestras correspondientes.

Otro país en el que se han publicado la presencia de constantes epidemias de chancro blando es Estados Unidos de Norte-

américa; así, un estudio¹³ efectuado en Orange County, California (1982) mostró que el 95% de los casos correspondía a -- hombres de origen latinoamericano y de ellos, el 53% había --- sostenido relaciones sexuales con prostitutas. Cabe mencio--- nar que en dicha investigación se detectó la aparición de se-- gundos periodos de chancroide, ésto demostró la ausencia de -- inmunidad después de la infección chancroidal, o bien que ---- existe una gran diversidad de cepas de Haemophilus ducreyi; -- probablemente la primera hipótesis se apege más a la reali--- dad, ya que es posible utilizar la sangre del paciente para -- cultivar a la(s) cepa(s) proveniente(s) de sus propias lesio-- nes.

En 1985 se presentó un brote en Boston, Massachusetts, -- durante el cual se comprobaron 53 casos; es importante desta-- car que en los 2 años anteriores, únicamente se detectaron --- 2 casos en la misma región.⁸⁷

Tanto en Orange County como en Boston se tomaron medidas similares para controlar la diseminación de la enfermedad; --- entre ellas destacan: el tratamiento de los sujetos que habían tenido contacto sexual con prostitutas y/o padecían úlceras ge-- nitales (denominados casos presuntivos) y la institución de la terapia adecuada a prostitutas, parejas y contactos rastreados de los presuntos enfermos de chancroide¹²¹.

Por otro lado, Hammond⁶⁵ realizó estudios epidemiológicos

durante un brote de chancro blando en Winnipeg, Canadá; en --- éste detectó una frecuencia masculino/femenina de 2.97:1 y dedujo que quizá, entre las mujeres, la enfermedad curse en forma menos severa o el período de incubación del padecimiento -- sea más largo y, por ende, un significativo número de casos -- pase desapercibido. Otra conclusión a la que condujo su investigación es la siguiente:

"El establecimiento, la localización y la evolución de las epidemias de chancroide, están relacionados íntimamente - con factores tales como la distribución de las cepas de - Haemophilus ducreyi resistentes a diferentes antibióticos, la existencia de portadores asintomáticos (punto que requiere de análisis más profundos) y los bajos niveles sociales, económicos y culturales que, a su vez, son los -- que provocan con mayor frecuencia que los individuos sean promiscuos, que tengan relaciones sexuales aunque padezcan traumatismos en los genitales, que retrasen la búsqueda de atención médica cuando la requieren, que no estén - circuncidados y que se vean afectados por el alcoholismo, el desempleo, etc."

Por su parte, Odumeru¹⁰⁵ recurrió a la caracterización de las proteínas de la membrana externa de diferentes cepas del - bacilo de Ducrey para efectuar estudios epidemiológicos sobre el chancroide; para ello aplicó la técnica de electroforesis y

así comprobó que las proteínas de la membrana externa de cada cepa de Haemophilus ducreyi presentan perfiles electroforéticos específicos que no se ven afectados por subcultivos repetidos o el envejecimiento del cultivo y, además, que aunque el bacilo de Ducrey comparte ciertas proteínas de la membrana externa con otras especies del género, los patrones electroforéticos parecen ser específicos de especie.

Basándose en tales premisas, Odumeru¹⁰⁵ encontró que 13 cepas aisladas durante la mencionada epidemia en Winnipeg, Canadá, manifestaban patrones electroforéticos idénticos y consecuentemente, tenían un origen común; por tanto, concluyó que la heterogeneidad en la composición proteica de Haemophilus ducreyi puede sentar las bases para la subtipificación que sea definitiva en la epidemiología del chancroide.

Más tarde, Handsfield⁶⁶ logró rastrear la diseminación secundaria y terciaria del chancro blando, analizando los plásmidos de las cepas por electroforesis en gel de agarosa. Cabe mencionar que aisló diferentes cepas del bacilo de Ducrey, a partir de las úlceras de enfermos que adquirieron el padecimiento en diversas áreas geográficas y encontró que las provenientes de individuos infectados en México y Brasil presentaban los mismos plásmidos.

1.3 DIAGNOSTICO EN EL LABORATORIO

El diagnóstico del chancroide en el laboratorio es difícil, tal como lo refleja el hecho de que se han desarrollado numerosos procedimientos para confirmar la sospecha clínica y éstos tienden más a establecer el diagnóstico diferencial que a identificar con exactitud al microorganismo^{23,127}.

En ese sentido, las técnicas más empleadas por los análisis contemplan la tinción y el cultivo de las secreciones provenientes de la úlcera o el aspirado del bubón, la intradermoreacción de Ito-Reenstierna, los métodos serológicos y las biopsias^{43,125}.

No obstante, las metodologías señaladas involucran limitaciones considerables: la morfología microscópica de Haemophilus ducreyi es muy similar a la de otras bacterias⁶⁵ (por ejemplo: Bacteroides melaninogenicus), el índice de aislamiento del bacilo de Ducrey es aún bajo, las pruebas de reactividad serológica y bioquímica que permitirían la plena identificación de esta especie no están perfectamente estandarizadas⁷⁶, la autoinoculación depende en gran medida de la ética de quien la aplica, los reactivos para la intradermoreacción de Ito-Reenstierna se encuentran descontinuados en el comercio, las biopsias suelen ser dolorosas, etc.⁶⁵.

Según Lennette⁸⁸, el diagnóstico del chancroide puede basarse en cualquiera de los criterios siguientes:

1. El aislamiento de Haemophilus ducreyi a partir de muestras patológicas.
2. El hallazgo de Haemophilus ducreyi como único microorganismo en el aspirado del bubón.
3. La observación de bacterias semejantes a Haemophilus ducreyi en cadenas o grupos (siempre que éstas no estén dispersas entre otros microorganismos) en los frotis teñidos.
4. La manifestación del cuadro clínico típico de una úlcera chancroidal.

La tinción de las secreciones de la úlcera o del aspirado del bubón se considera como la herramienta clásica⁴³; la muestra corresponde al exudado de la base de la lesión y se recolecta con un hisopo de alginato de calcio⁹⁶, éste debe rotarse 180° sobre el portaobjetos en una sola dirección y nunca de atrás para adelante, con el fin de preservar la agrupación característica del microorganismo¹⁴; alternativamente, puede deslizarse un portaobjetos por el borde de la úlcera para recoger el material contenido en ella¹²². Después de la fijación con calor se llevan a cabo tinciones de Gram, Giemsa, Wright, Unna-Pappenheim o Sella y una lectura positiva por cualquiera de las 3 primeras debe ser confirmada por alguna de las 2 últimas, ya que aún el personal experimentado puede confundirse ante la morfología de Haemophilus ducreyi^{43,150}. Generalmente, una -

tinción se considera positiva cuando aparecen bacilos Gram-negativos con coloración bipolar, en arreglo de huellas dactilares y localizados extracelularmente (aunque en ciertas ocasiones pueden encontrarse intracelularmente). La tinción se considera confiable pero sólo debe reconocérsele como método presuntivo de diagnóstico^{43,69}.

Las técnicas de Giemsa y Wright son especialmente útiles para identificar las células gigantes multinucleadas con inclusiones eosinofílicas y rodeadas por un halo claro que se encuentran en infecciones debidas a Herpesvirus; con ello se puede diferenciar al herpes genital del chancro blando⁴³.

Por otra parte, la tinción de Gram tiene como ventaja el hecho de que proporciona una amplia visión de la flora bacteriana presente en la lesión⁶⁹. Algunos investigadores han establecido que la identificación del bacilo de Ducrey en frotis teñidos por el método de Unna-Pappenheim es el criterio diagnóstico más importante; de hecho, se le reconoce una eficiencia del 88.5%⁸² a diferencia del 65% que se le concede a la tinción de Gram⁵⁸.

Las tinciones positivas evidencian pocos microorganismos, particularmente cuando el exudado proviene de lesiones tempranas. En casos avanzados (especialmente en mujeres), hay abundancia de diversas bacterias, circunstancia por la cual es casi imposible efectuar el diagnóstico⁶⁹.

Las tinciones realizadas a partir de aspirados de bubones son muy confiables, pero se reportan lecturas positivas menos-frecuentes en éstas que en las efectuadas del material prove-niente de las úlceras, ya que raramente se observa la presen-cia de Haemophilus ducreyi, aún cuando se le aisle en cultivo⁶⁹.

Cabe señalar que el aspirado del bubón debe realizarse a-través de la piel sana que lo rodea, pues de lo contrario se -corre el riesgo de provocar la formación de fistulas^{43,122}.

Por lo que se refiere a las biopsias, durante mucho tiem-po se consideraron inespecíficas, sin embargo, diversos estu-dios demostraron que eran precisas en un 90% de los casos^{43,69} y actualmente se les clasifica como métodos diagnósticos efi-cientes⁶⁹.

La biopsia se realiza recogiendo con forceps Gaylors una-porción del tejido de la úlcera, incluyéndose el centro y el -borde de la misma o un fragmento de algún bubón roto; la anes-tesia no es necesaria según Sheldon y Heyman⁶⁹ pues el procedi-miento se reserva para lesiones tardías, las cuales son menos-dolorosas y no sangran abundantemente; las muestras adecuadas-tienen una dimensión de 3 mm. de diámetro en promedio⁴³.

Para obtener resultados óptimos, es esencial llevar a ca-bo con sumo cuidado la fijación y tinción del tejido⁶⁹. Así, cuando se examina un corte de la lesión, se puede diferenciar-el chancroide de cualquiera otra enfermedad de transmisión ---

sexual por su histología característica; la observación correspondiente muestra una primera región que funciona como cubierta bajo la cual se encuentran otras 2; de acuerdo con esto, -- cada una presenta características propias y se denominan superficial, media y profunda⁴³.

La biopsia de una lesión con 2 a 3 semanas de evolución muestra una ulceración superficial poco profunda con una zona de tejido necrótico que corresponde a la base de la úlcera⁶⁹. Observaciones más minuciosas de esta región revelan no solamente la presencia de tejido necrótico, fibrina, eritrocitos y -- leucocitos polimorfonucleares, sino también bacilos Gram-negativos (supuestamente Haemophilus ducreyi)¹⁵. Abajo de esta zona se encuentra la región media que es una angosta capa de tejido edematoso en la cual las células endoteliales en varios estados de proliferación, son más numerosas que cualquier otro componente; además, existen abundantes vasos sanguíneos recién formados, orientados perpendicularmente con respecto a la superficie de la úlcera, muchos de ellos dilatados y presentando paredes delgadas. La marcada proliferación tisular observada en arteriolas, capilares y vénulas con frecuente degeneración fibrinoide, así como una peri y endovasculitis con presencia de leucocitos polimorfonucleares, son característicos. Por -- cierto, se cree que la trombosis exhibida por los vasos sanguíneos es responsable de la ulceración. La proliferación vascular puede ser muy variada bajo la mencionada zona central⁴³.

Finalmente, en lo referente a la región profunda, ésta manifiesta un infiltrado ligero de leucocitos polimorfonucleares, células plasmáticas, linfocitos y una proliferación linfoblástica^{15,43}.

En la zona que rodea a la úlcera también se observan linfocitos, células plasmáticas y abundantes células endoteliales pero sin proliferación endotelial; además, suelen evidenciarse acantosis y edema⁶⁹.

Es importante señalar que las lesiones chancroidales naturales muestran menos cambios histológicos en las regiones media y profunda y, que tanto las inducidas experimentalmente -- por autoinoculación, como los bubones presentes, manifiestan -- cambios patológicos idénticos⁴³.

Por lo que toca a la intradermorreacción, en 1913 Ito la aplicó para el diagnóstico del chancro blando y su técnica fue mejorada por Reenstierna en 1923¹⁵⁰. Posteriormente, Nicole y Durand introdujeron en Francia el producto comercial necesario para su realización; en dicho país se le conoció como vacuna - Dmelcos, mientras que en Estados Unidos de Norteamérica se le denominó vacuna de Ducrey⁸². En antígeno consta de una suspensión de Haemophilus ducreyi inactivado, elaborada según Dienst³³, de la siguiente forma: el bacilo de Ducrey se inocular en un medio inclinado de agar infusión carne de res enriquecido con -- sangre desfibrinada de conejo y después de obtenerse un adecua

do desarrollo, el crecimiento superficial y la sangre se recogen con una pipeta esterilizada y se adicionan en agua destilada estéril para centrifugarse a alta velocidad; el sobrenadante se separa asépticamente y el sedimento se resuspende en agua - destilada estéril y nuevamente se somete a centrifugación, repitiéndose el procedimiento descrito una vez más, con el objeto de eliminar toda la hemoglobina. El sedimento (que contiene bacilos de Ducrey y restos de eritrocitos) se suspende en solución salina estéril y se somete a calentamiento (60°C) durante 30 minutos. Posteriormente, se realiza el control de esterilidad y si éste es satisfactorio el antígeno puede inocularse a las personas.

Cabe mencionar que algunos autores⁵⁸ sugieren que la cepa procesada debe ser virulenta para que la prueba no proporcione falsos negativos; no obstante, Dienst³³ demostró que ello no es indispensable, elaborando 5 diferentes suspensiones: 3 cepas avirulentas y 2 con virulentas; los 5 antígenos se inocularon a 60 personas, cada uno en una región diferente y los resultados coincidieron casi completamente.

Para la realización de la prueba⁴³ se inyecta intradérmicamente 0.1 cm³ del antígeno y a las 48 horas se hace la lectura: si aparece una zona de induración mayor de 0.6 cm., la reacción se considera positiva; es importante señalar que debe inocularse paralelamente un control, constituido sólo por el

medio elegido para cultivar al microorganismo. Para que la -- prueba se pueda manifestar como positiva es necesario que haya transcurrido un cierto tiempo después de que el paciente adquiere la infección⁵⁸; aunque se menciona un período de 5 semanas, 6 a 10 días después de la aparición de la úlcera suelen ser suficientes¹²⁴.

Sin embargo, cuando la intradermorreacción se efectúa con el antígeno tradicional presenta ciertos inconvenientes; entre ellos destacan la inconsistencia de sus resultados: por ejemplo, Greenwald⁵⁸ reporta una precisión de 75%, Heyman⁶⁹ de 77% y Kornblith⁸² establece que la reacción es positiva y específica en un 95%. Otra de las limitaciones del valor de la intradermorreacción para el diagnóstico del chancroide, radica en que ésta persiste positiva durante años⁶⁹; por tanto, no se sabe si es indicativa de una infección actual o pasada. Pero el mayor problema de la prueba consiste en los falsos positivos⁴³; Heyman⁶⁹ encontró que la tercera parte de la población de 473 negros mayores de 25 años y cuyas historias clínicas no revelaban datos relacionados con el chancroide, presentaba reacciones positivas. Reymann¹¹⁷ encontró evidencia que la intradermorreacción podía ser de gran ayuda para evaluar la prevalencia del chancroide en una comunidad; por cierto que este mismo investigador considera que el estudio de Heyman⁶⁹ refleja la alta incidencia del chancro blando en los negros del sur de Estados Unidos de Norteamérica.

No obstante, es conveniente señalar que la presencia de una úlcera con apariencia chancroidal o una intradermorreacción positiva, no deben considerarse definitivas para efectuar el diagnóstico y, del mismo modo, que una intradermorreacción negativa no descarta la posibilidad de que la enfermedad en cuestión exista¹²⁴. De hecho, Schwarz¹²⁹ afirma que la intradermorreacción es obsoleta por su inexactitud y su afirmación coincide con lo expuesto anteriormente. Cabe mencionar que también se ha descrito una prueba intracutánea¹²⁴ en la que el antígeno empleado es el pus proveniente de un bubón; desafortunadamente, ésta parece no aportar resultados confiables.

En cuanto a la autoinoculación, destaca una investigación⁶⁹ en la que se evaluó como método para realizar el diagnóstico del chancroide; en ésta, se estudiaron 36 personas a las que se les inoculó una pequeña cantidad del exudado proveniente de sus lesiones genitales en una zona escarificada del antebrazo; el área se cubrió y a las 48 horas se efectuó la lectura, tomándose como positiva cuando aparecían pequeñas pústulas o ulceraciones a partir de las cuales el bacilo de Ducrey podía ser aislado. Los resultados fueron los siguientes: sólo 20 pacientes desarrollaron lesiones y únicamente en 2 casos se logró cultivar a Haemophilus ducreyi a partir de las secreciones de las lesiones del antebrazo.

Como es posible constatar, la autoinoculación tiene diver

sas desventajas, entre ellas destacan: que no siempre hay desarrollo de la lesión en el sitio de autoinoculación⁶⁹ y que la aparición de una afección pustular no es indicativa del diagnóstico de chancroide, porque otras bacterias piógenas transferidas de la lesión genital pueden ser las causantes⁴³. Por lo tanto, los resultados de la autoinoculación deben ser confirmados mediante la búsqueda de Haemophilus ducreyi con tinción y cultivo; además, el establecimiento de una nueva área de infección implica siempre un riesgo, a pesar de que la lesión, a las 48 horas, suele ser de poca importancia y sana rápidamente con un tratamiento adecuado. No obstante, si por algún motivo éste no se aplica, puede provocarse una seria afección en el brazo⁶⁹. A las limitaciones anteriores debe adicionarse otra: cuando se realiza la autoinoculación, es necesario retrasar el tratamiento hasta que se obtengan los resultados de la prueba⁴³; por todo ello, el método no es ampliamente recomendable.

Según Borchardt y Hoke¹⁴, los criterios para efectuar el diagnóstico del chancro blando son:

1. Detección del bacilo de Ducrey en el material proveniente de las lesiones mediante preparaciones teñidas.
2. Aislamiento del microorganismo.
3. Intradermorreacción.
4. Autoinoculación.

5. Biopsia.

6. Exclusión de otras enfermedades.

Desafortunadamente, en la mayoría de los casos el diagnóstico se basa en la exclusión de otros padecimientos; ésto se justificaba anteriormente por el hecho de que el cultivo del microorganismo presentaba considerables dificultades, sin embargo, actualmente es inaceptable toda vez que Hammond⁶⁴ ha logrado optimizarlo. Este mismo investigador ha aportado también datos interesantes en cuanto a la recolección de las muestras, al comparar la eficiencia de las 2 técnicas más empleadas: la primera consistió en la irrigación de la base de la úlcera con 0.5 ml de una solución salina isotónica no bacterios-tática, la cual posteriormente se aspiró con una pipeta Pasteur de punta lisa; esta muestra se mezcló durante 30 segundos y -- después se utilizó para inocular el medio. En la segunda técnica únicamente se frotó la base de la úlcera con un hisopo de algodón humedecido en solución salina antes de que se realizara la siembra correspondiente. Considerando los resultados obtenidos, puede establecerse que el segundo procedimiento es el óptimo. Por cierto que otro estudio realizado por Mauff⁹⁶ mostró que el hisopo de alginato de calcio proporciona excelentes resultados.

Por lo que toca a la aplicación de la serología, se sabe que los métodos más rápidos para efectuar el diagnóstico de mu

chas enfermedades infecciosas incluyen usualmente técnicas inmunológicas en las que se utilizan anticuerpos conocidos para detectar a los microorganismos patógenos, o bien a sus antígenos en las muestras clínicas. Sin embargo, existen muy pocas publicaciones acerca de pruebas serológicas para diagnóstico de chancroide y aunque el desarrollo de técnicas que incluyen anticuerpos monoclonales ha estimulado la creación de métodos inmunológicos, las existentes para investigar la enfermedad en cuestión aún no se encuentran lo suficientemente probadas para utilizarse con regularidad.

Hansen y Loftus⁶⁸ prepararon anticuerpos monoclonales --- anti-Haemophilus ducreyi inoculando por vía intraperitoneal ratones BALB/c de 8 semanas de edad con 10^9 UFC de Haemophilus ducreyi (cepa 35,000) suspendidas en amortiguador salino de -- fosfatos con pH de 7.2 o en adyuvante completo de Freund; un - mes después se les aplicó una segunda dosis igual a la primera y pasados 3 días se extrajo el bazo y sus células se fusionaron con las provenientes de mieloma de ratón para formar los -- hibridomas. La producción de anticuerpos anti-Haemophilus --- ducreyi se analizó por el método de ELISA empleando como antígeno células de Haemophilus ducreyi destruidas por medio de -- ondas sonoras. De este modo, se seleccionaron un total de 56- hibridomas productoras de anticuerpos monoclonales dirigidos - contra el bacilo de Ducrey.

Lógicamente, para que los anticuerpos monoclonales sean útiles en el diagnóstico del chancroide, deben ser capaces de reaccionar con la mayoría de las cepas de Haemophilus ducreyi. En este sentido, algunos de los que se han obtenido, tales como los denominados 8H4 y 9D12, detectaron al bacilo de Ducrey en muestras de material proveniente de lesiones experimentales en conejos y no reaccionaron con Treponema pallidum o tejidos testiculares de conejo en los que se indujo orquitis; además, el 8H4 no mostró reactividad cruzada con virus del herpes - - - simplex, Neisseria gonorrhoeae, Haemophilus influenzae y Haemophilus parainfluenzae.

Aunque estos anticuerpos monoclonales pueden utilizarse en pruebas de inmunofluorescencia indirecta o directa, se prefiere emplearlos en métodos más simples aunque igualmente confiables como el de coagulación; no obstante, la aplicación de esta última técnica quizá presente algún problema si se usan anticuerpos monoclonales únicos para cierta determinante antigénica debido a que podría ser insuficiente la formación de complejos inmunitarios para generar una aglutinación visible; por ello, sería necesario utilizar una mezcla de 2 o más anticuerpos monoclonales con especificidades antigénicas diferentes⁶⁸.

Schalla¹²⁵ empleó anticuerpos monoclonales para el diagnóstico del chancroide por medio de la técnica de inmunofluorescencia en su estudio, eligió pacientes que presentaban una-

o más úlceras dolorosas acompañadas por adenopatía inguinal y no padecían sífilis primaria, herpes genital o linfogranuloma venéreo, de acuerdo con un examen previo. Dichos anticuerpos se prepararon inmunizando ratones BALB/c con membranas externas de Haemophilus ducreyi y su especificidad se comprobó mediante la técnica de ELISA. Como antígenos control se utilizaron preparaciones de membranas externas de diferentes especies de Haemophilus incluyendo Haemophilus ducreyi, con el fin de evaluar la eficiencia de los anticuerpos monoclonales en los ensayos; de esta manera, el análisis inmunofluorescente se realizó para investigar tanto el material proveniente de las úlceras genitales como para determinar la reactividad de los anticuerpos monoclonales con diferentes bacterias del género Haemophilus.

La metodología fue la siguiente: se realizaron frotis a partir de cultivos de Haemophilus influenzae, Haemophilus parainfluenzae, Haemophilus haemolyticus, Haemophilus aphrophilus, Haemophilus segnis, Haemophilus haemoglobinophilus, Haemophilus parahaemolyticus y Haemophilus ducreyi cepa CIP 542, se secaron al aire y se fijaron con metanol o acetona; después, se agregaron los anticuerpos monoclonales y se incubaron durante 30 a 60 minutos a 37°C, posteriormente se realizó un lavado con PBS y se agregó el conjugado consistente de anticuerpos anti-inmunoglobulina de ratón marcados con fluoresceína, incubándose 30 minutos a 37°C y lavándose 2 veces con PBS; por

último la observación se hizo bajo microscopio de fluorescencia.

En cuanto a los resultados de los controles, se observó que el anticuerpo monoclonal B3 no reaccionó con Haemophilus haemolyticus, Haemophilus segnis, Haemophilus haemoglobinophilus y Haemophilus parahaemolyticus; lo hizo débilmente con Haemophilus influenzae y Haemophilus parainfluenzae y fuertemente con Haemophilus ducreyi cepa CIP 542.

Con respecto al examen de los especímenes provenientes de las úlceras genitales, el anticuerpo monoclonal B3, reditú lecturas positivas en 3 de 6 frotis de otros tantos pacientes, manifestando bacilos muy bien teñidos; la intensidad de esta tinción fue comparable con la obtenida de Haemophilus ducreyi cepa CIP 542, utilizado como control positivo.

Por otro lado, este mismo anticuerpo no reaccionó con las muestras procedentes de 3 pacientes con sífilis primaria ni con las 2 que se obtuvieron de individuos con herpes genital. En base a lo anterior, se pudo concluir que los anticuerpos monoclonales anti-Haemophilus ducreyi mostraron sensibilidad para detectar al microorganismo en cuestión en el material proveniente de las lesiones genitales.

Anteriormente, Denys³¹ ya había probado que el método de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico inverso del-

chancroide, en el cual el suero del paciente tuvo que ser extensamente adsorbido con otras especies de Haemophilus para -- eliminar al máximo las reacciones cruzadas; aún así, aunque la reacción presentó un máximo de fluorescencia de 2+ con Haemophilus ducreyi, también manifestó 1+ con otras especies de Haemophilus, originando interpretaciones confusas.

En otro sentido, el mismo estudio de Schalla¹²⁵ incluyó -- una prueba de ELISA para detectar anticuerpos anti-Haemophilus ducreyi en el suero de los pacientes; para ello, se utilizaron las preparaciones de membrana externa de las diferentes especies de Haemophilus, a las que se adicionó el suero; posteriormente se agregaron anticuerpos anti-Ig G o anti-Ig M humana -- marcados con peroxidasa de rábano; el color se desarrolló después de incubar con 4-cloro 1-naftol. Los controles negativos empleados consistieron en una mezcla de sueros normales humanos y otra de sueros normales de ratones, mientras que como -- controles positivos se utilizaron sueros humanos y de ratón -- que previamente habían evidenciado contener anticuerpos anti-Haemophilus ducreyi.

Los resultados mostraron que el 47.6% y un 34.9% de los sueros estudiados presentaron niveles elevados de Ig M e Ig G respectivamente, reaccionando con las preparaciones de membrana externa de Haemophilus ducreyi cepa CIP 542 y no con las de Haemophilus influenzae y Haemophilus parainfluenzae. Asimismo, se experimentó con 3 sueros reactivos para sífilis y 2 para --

herpes simplex, sin obtenerse resultados positivos.

En otras investigaciones¹¹⁷ efectuadas sobre diferentes técnicas de diagnóstico inmunológico del chancroide, se ha podido comprobar que la técnica de fijación de complemento no ha resultado exitosa, debido a falsos positivos causados por la existencia de reacciones cruzadas entre Haemophilus ducreyi y otras bacterias.

Hasta el momento, la opción más confiable para realizar el diagnóstico del chancro blando es alguna técnica que incluya anticuerpos monoclonales, siendo la más experimentada la de inmunofluorescencia indirecta.

Diagnóstico diferencial.

Como frecuentemente el chancro blando se presenta asociado con otra enfermedad de transmisión sexual o bien se confunde con alguna de ellas, los diferentes casos deben investigarse buscando percatarse de la realidad. Como se recordará, --- existen variantes del chancroide, conocidas como chancroide -- atípico, que pueden presentar apariencia de granuloma inguinal, herpes genital, linfogranuloma venéreo o sífilis primaria^{71,84,149,153}.

Las enfermedades mixtas por T. pallidum y H. ducreyi ocurren en un 12 a 15% de los pacientes con chancroide⁸⁹; es por ello que deben realizarse al menos 3 observaciones en campo oscuro del material proveniente de la úlcera con una diferencia-

de un día, excepto cuando el paciente está sometido a tratamiento con antibióticos efectivos contra la sífilis primaria; en este caso, el análisis debe realizarse antes de la terapia⁴³.

Para descartar la presencia de granuloma inguinal se debe llevar a cabo una biopsia que incluye el borde y la base de la úlcera; posteriormente, el tejido se coloca entre 2 portaobjetos, se presiona y después se realiza una tinción de Giemsa: la presencia de inclusiones citoplasmáticas (cuerpos de Donovan) es indicativa de granuloma inguinal^{149,153}.

Otra entidad que frecuentemente se confunde con el chancroide es el herpes genital, para realizar su diagnóstico suele limpiarse la base de la úlcera con un hisopo estéril, el cual se coloca en 1 ml. de medio mínimo esencial de Eagle que contenga 2% de suero fetal de ternera, 100 mg/1 de vancomicina, 10 mg/1 de gentamicina y 25 U/ml de nistatina; previa incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, 0.2 ml. de este medio se inoculan en 2 tubos que contienen una monocapa de fibroblastos de pulmón de embrión humano. Estos cultivos se incuban a 36°C y se examinan diariamente; la observación de efectos citopáticos sugiere la presencia de Herpesvirus y esto se puede comprobar mediante la prueba serológica de fijación de complemento^{71,149}.

El granuloma inguinal y el herpes genital son las 2 enfermedades de transmisión sexual que en mayor número de ocasiones se confunden con el chancroide; de aquí que sea muy importante su diferenciación¹²³.

TABLA 3.
 COMPARACION DE ALGUNOS RASGOS
 DE CHANCROIDE Y DE GRANULOMA INGUINAL

CHANCROIDE

GRANULOMA INGUINAL

Microbiología

Haemophilus ducreyi se aísla en medios adecuados in vitro.

C. granulomatis genera la formación de cuerpos de --- Donovan dentro de los histiocitos.

Biopsia de úlceras

Evidencia acantosis del borde epitelial y un infiltrado dérmico de células plasmáticas y linfocitos.

Revela microabscesos intraepidérmicos, vasculitis prominente y, si se tiñe con plata, muestra bacilos únicos o en cadenas, tanto dentro de los histiocitos como extracelulares.

Evidencia acantosis del borde epitelial y un infiltrado dérmico de células plasmáticas y linfocitos.

Revela microabscesos dérmicos, no se detecta vasculitis y, si se tiñe con plata muestra cuerpos de Donovan, abundantes microorganismos dentro de los histiocitos.

1.4 TRATAMIENTO.

Como ya se mencionó, las primeras sustancias empleadas para tratar el chancro blando fueron las sulfonamidas y las tetraciclinas^{43,94}; empero, el surgimiento de cepas resistentes de Haemophilus ducreyi ha dado lugar a que se analicen -- otros antimicrobianos y aunque varios de ellos han redituado resultados exitosos, todavía deben someterse a estudios más minuciosos que permitan determinar la elección correcta, ya que el microorganismo varía en cuanto a su susceptibilidad, dependiendo de la zona geográfica en la que habita¹⁵⁵.

A continuación se comentan resumidamente los trabajos -- que han evaluado la eficiencia de diferentes antibacterianos -- como agentes terapéuticos contra el chancroide.

Eritromicina

La constante recomendación de este antibiótico se basa -- en resultados obtenidos tanto in vivo como in vitro. Desde -- 1982, salieron a la luz pública varios trabajos que sugieren -- el empleo de la eritromicina por vía oral, a razón de 2 g diarios y durante 10 días o hasta que las lesiones desaparezcan. Esto se debe a que de esta manera sanaron 7 (100%) enfermos -- en Corea¹²⁶, 32 (100%) en Atlanta⁸³, 45 (100%) en Nairobi¹¹¹ -- y 35 (97.2%) en otra población de Kenya¹²⁶.

Otra investigación en la que se utilizó la misma dosis --

diaria y en la cual se intentó establecer la duración óptima, dejó constancia de que 7 días pueden ser suficientes para considerable número de pacientes pero que, en otros, se requiere prolongar hasta 14 e inclusive 21 días el tratamiento. Cabe mencionar que para llegar a esta conclusión los autores administraron placebos a algunas personas analizadas, después de que se les había suministrado eritromicina durante 7 días¹²⁶.

En otro estudio¹¹¹ en el que los investigadores evaluaron la eficiencia de la rosamicina (un análogo de la eritromicina, del que no se dispone en Estados Unidos de Norteamérica), se logró que sanaran 39 pacientes empleándose 4 dosis diarias de 250 mg. por vía oral durante 10 días.

Por lo que se refiere a los trabajos efectuados in vitro: 103 cepas de Haemophilus ducreyi aisladas en Johannesburgo, - Sudáfrica¹² en 1980, resultaron sensibles a la eritromicina - en concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 0.0005 mg/1. Por otro lado, para 19 cepas procedentes de Amsterdam¹⁴⁰ la CMI resultó menor o igual a 0.125 mg/1 y los estudios en torno a 13 cepas aisladas en Singapur demostraron que la eritromicina era, entre los antibióticos evaluados, el más activo; sin embargo la CMI obtenida se encontraba entre 0.5 y 4 mg/1. Por último, en París, la CMI más elevada de eritromicina para 29 cepas fue de 0.032 mg/1¹²⁶.

Trimetoprim y sulfonamidas

En años recientes, se viene recomendando la combinación de sulfametoxazol con trimetoprim para tratar el chancroide; esto se debe a resultados obtenidos in vitro e in vivo.

Aunque la resistencia de Haemophilus ducreyi a las sulfonamidas se ha comprobado en todo el mundo y, principalmente en Kenya⁴, en donde se demostró que se debe a la presencia de un plásmido no conjugativo de 4.9 megadaltons, el bacilo de Ducrey es susceptible en diferentes grados al trimetoprim.

Una investigación efectuada en Nairobi, Kenya, demostró que el trimetoprim-sulfametoxazol era eficaz en un 100%; en este caso, se analizaron 17 enfermos tratados con 160 mg del primero y 800 mg del segundo, 2 veces al día durante 7 días. Asimismo, cuando los mismos autores utilizaron la combinación a razón de 3,200 mg de sulfametoxazol y 640 mg de trimetoprim-semanarios durante 2 semanas, obtuvieron 92.7% de efectividad¹²⁶.

En general, todos los estudios relacionados con el tratamiento del chancroide mediante la combinación trimetoprim-sulfonamidas muestran una alta eficiencia de ésta, pues los índices de curación^{39,83,114,140,152} reportados van de 80 al 100%. Cabe señalar que en algunas de las investigaciones se han empleado diferentes preparaciones de sulfonamidas, destacando el sulfametoxazol, sulfametrol, sulfisoxazol y la sulfadimina; en-

este sentido, todas han resultado de igual eficacia pero, a diferencia de otras, el sulfametrol no causa hemólisis cuando se administra a individuos deficientes en la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa¹¹⁴.

Por otro lado, el trimetoprim en dosis de 400 mg diarios durante 5 días fue exitoso en un 92%¹¹⁴; en valor, indudablemente, es comparable a los obtenidos cuando se adiciona a las sulfonamidas. Sin embargo, estudios realizados in vitro pusieron de manifiesto que para 2 cepas de Kenya y 1 de Canadá su CMI era elevada: 32 mg/l¹¹³; asimismo, para 7 provenientes de Estados Unidos de Norteamérica este valor varió entre 4 y 8 mg/l¹²⁶ y en 94 procedentes de Tailandia la CMI₉₀ (CMI del 90% de las cepas) resultó mayor de 32 mg/l¹²². De lo anterior se deduce que han surgido varias cepas de Haemophilus ducreyi resistentes al fármaco mencionado.

Ceftriaxone

El ceftriaxone es una cefalosporina de tercera generación que parece ser altamente efectiva para tratar el chancroide, cuando se administra una sola dosis de 250 mg por vía intramuscular; ésta es la conclusión a la que se llegó después de suministrar 1 mg de ceftriaxone a 18 sujetos, 250 mg a 39 y 500 mg a 44, en dosis únicas e intramuscularmente; los índices de curación fueron de 94%, 97% y 98% respectivamente. Asimismo, en

Tailandia, sanaron 25 pacientes de los que se obtuvieron cultivos positivos de Haemophilus ducreyi y 29 con lesiones de aspecto chancroidal pero con cultivos negativos, al aplicárseles solamente 250 mg del citado antimicrobiano por vía intramuscular¹⁴².

Por lo que se refiere a los estudios in vitro, 94 cepas de Haemophilus ducreyi aisladas en Tailandia¹⁴² fueron sensibles al ceftriaxone en CMI₉₀ de 0.03 mg/1; estos resultados coinciden con otros en los que se encontró la CMI de cefotaxima (la cual se utiliza generalmente para evaluar la prueba de resistencia al ceftriaxone) para 17 cepas de Canadá, 3 de Europa, 9 de Estados Unidos de Norteamérica y 22 de Kenya; dicho valor fue de 0.004 mg/1¹²⁶. Similarmente, en 29 cepas aisladas en París se detectó una CMI de cefotaxima comprendida entre 0.004 mg/1 y 0.016 mg/1, mientras que para 25 de Zimbabwe dicho valor resultó menor o igual a 0.125 mg/1¹²⁶.

Amoxicilina y ácido clavulánico

Para Haemophilus ducreyi se ha reportado repetidamente en todo el mundo, la producción de β -lactamasas mediada por plásmidos^{13,18,66}. En Sudáfrica¹², para las cepas productoras de este tipo de enzimas, se obtuvieron CMI₉₀ de ampicilina y penicilina mayores de 128 mg/1; en cuanto a las aisladas en Singapur, la CMI de ampicilina resultó igual o mayor a 8 mg/1¹³⁴ y -

para las provenientes de París, la CMI de ampicilina fue igual o mayor a 16 mg/1¹²⁶.

Sin embargo, cuando se experimentó con cepas productoras de β -lactamasas, a las que se evaluó su susceptibilidad a la combinación amoxicilina/ácido clavulánico en proporción 2 a 1, la CMI disminuyó hasta 2 mg/1⁴⁶. De este trabajo nació la idea de utilizar al ácido clavulánico (inhibidor de las β -lactamasas) combinándolo con amoxicilina o penicilina para el tratamiento del chancroide. Estudios in vivo confirmaron posteriormente dicha propuesta, ya que se administraron a 3 grupos de pacientes 3 diferentes tratamientos, consistentes en 500 mg de amoxicilina sola, 500 mg de amoxicilina con 125 mg de ácido clavulánico y 500 mg de amoxicilina con 250 mg de ácido clavulánico, todos a razón de 3 veces al día y oralmente, durante 7 días; los resultados no dejan lugar a controversias: mientras los 9 sujetos que se trataron sólo con amoxicilina no sanaron, de los 55 que se sometieron a terapias con ácido clavulánico (en las 2 distintas dosis) y amoxicilina, 53 respondieron; por cierto que uno de los 2 "enfermos" curó clínicamente aunque los cultivos de sus secreciones permanecieron positivos³⁸.

Otros antimicrobianos

La rifampicina ha mostrado en diversos estudios^{12,62,113} que es efectiva contra Haemophilus ducreyi en CMI menor o ---

igual a 1 mg/l. Asimismo, su eficiencia se ha evaluado también in vivo: se administraron a 22 pacientes 600 mg diarios durante 3 días y se obtuvo un 66.6% de éxito. Sin embargo, su empleo no se ha generalizado debido a que se considera que con ello puede elevarse el riesgo de seleccionar un mayor número de cepas resistentes en otras especies importantes, por ejemplo, de Mycobacterium tuberculosis; no obstante, en este caso particular se sabe que la resistencia de este microorganismo al antimicrobiano en cuestión, sólo se presenta cuando las terapias son prolongadas y no se combinan¹¹³.

Por otro lado, el tratamiento con cloramfenicol no ha resultado eficaz, debido a que Haemophilus ducreyi posee un plásmido de 34 megadaltons que le confiere resistencia a este antibiótico²⁶, sin embargo, un análogo de él denominado tiamfenicol ha proporcionado excelentes resultados; en un estudio, a 341 enfermos se les administró una dosis de 2.5 g vía oral y otra más de 1.25 g cuando las úlceras continuaban siendo dolorosas; de esta manera, 206 sujetos sanaron o mejoraron después de la primera dosis y el número se incrementó hasta 328 (96.2%) con la segunda⁸⁶. Respecto a las investigaciones in vitro, la CMI más elevada de tiamfenicol para Haemophilus ducreyi, es de 1 mg/l¹³³.

La cefotaxima, una cefalosporina de tercera generación, también evidenció ser efectiva contra Haemophilus ducreyi tanto in vivo como in vitro⁶⁶; cuando se proporcionó 1 g de cefo-

taxima intramuscularmente y 1 g de probenecid por vía oral en forma simultánea, se logró que sanaran 12 de un total de 20 - individuos (60%) y la misma dosis, pero suministrada durante 3 días consecutivos, curó a 19 de 21 enfermos (90.5%); si se compara con la eficiencia del ceftriaxone, el porcentaje de éxito que se obtuvo con la dosis única de cefotaxima es bajo - y ello quizá se deba a que la vida media del primero es mayor.

En cuanto a otros antimicrobianos, puede afirmarse que la susceptibilidad del bacilo de Ducrey a la estreptomina es variable^{66,113,116} y que la gentamicina¹³³, la espectinomina^{133,134} y la kanamicina^{62,113} son más activas. Las experiencias recientes relacionadas con estos antibacterianos y el tratamiento del chancroide son limitados, pero su vida media sugiere que dosis múltiples por vía parenteral podrían ser efectivas para curar la enfermedad.

Por último, los estudios con enoxacin¹⁰⁰, un inhibidor de la DNA girasa bacteriana, han demostrado que el tratamiento -- con 3 dosis de 400 mg cada 12 horas por vía oral, tiene una -- eficacia del 61.5% y la cura total sobreviene después de 7 a - 12 días de instituida la terapia.

Respuesta al tratamiento

En 1982, se recomendaba que el tratamiento del chancroide se prolongara a 10 días o hasta la resolución de las úlceras -

y/o la adenopatía. Empero, estudios^{113,142} posteriores demostraron que terapias de 1 a 7 días pueden ser suficientes aún cuando las úlceras no sanen completamente y la adenopatía persista, ya que la curación total requiere generalmente de 10 a 11 días después de iniciado el tratamiento. Por otro lado, -- aunque las lesiones curen rápidamente, la adenopatía puede persistir e incluso progresar sin que esto represente un signo de fracaso, ya que con frecuencia cede hasta los 28 días¹¹¹. Asimismo, puede ser necesario efectuar la aspiración de algunos nódulos a través de la piel normal, para evitar el drenaje espontáneo y, con ello, la formación de fistulas^{43,111,126}.

Además, cuando los signos clínicos desaparezcan 7 días -- después de instituido el tratamiento no es necesario que éste continúe, pero si no es así, se debe reconsiderar el diagnóstico y si éste se confirma mediante cultivos, cabe considerar la posibilidad de una infección mixta o bien de que la cepa de -- Haemophilus ducreyi sea resistente al antimicrobiano empleado¹²⁶.

Finalmente, se recomiendan diversas medidas higiénicas -- para prevenir la autoinoculación, pero la más sencilla y efectiva consiste en efectuar la limpieza del área afectada con jabón y/o soluciones antisépticas; entre éstas, las mejores son las que contienen iodo, pero para utilizarse, es necesario percatarse de que el paciente no sea hipersensible a este compuesto^{43,127}.

CAPITULO II

GRANULOMA INGUINAL

II. GRANULOMA INGUINAL

2.1 GENERALIDADES SOBRE EL AGENTE ETIOLOGICO.

2.1.1 ANTECEDENTES HISTORICOS.

El granuloma inguinal es, sin duda, una de las enfermedades de transmisión sexual menos común; se define como un padecimiento de vías genitales bajas, medianamente contagioso, -- crónico, lentamente progresivo y con cierta tendencia a la cura espontánea, que se caracteriza por la presencia de ulceraciones granulomatosas en los genitales externos y regiones -- circunvecinas¹¹⁸. Durante mucho tiempo se le consideró como una manifestación atípica de la sífilis y/o la tuberculosis -- pero, en 1882, MacLeod demostró que constituía una entidad -- clínica independiente⁵².

Sin embargo, tuvieron que pasar otros 60 años para que se identificara al agente etiológico. Entre tanto, en 1905, -- Donovan⁶⁰ postuló erróneamente que su agente causal era un -- protozoario del cual se expresaba en sus descripciones como -- un "parásito de las células epiteliales"; no obstante, ya se refería a los cuerpos intracelulares presentes en los tejidos lesionados que subsecuentemente se reconocieron como signos -- patognomónicos de la afección.

Finalmente, en 1943, Anderson⁶ demostró que los cuerpos -- intracelulares observados por Donovan estaban constituidos --

por bacterias capaces de crecer en saco vitelino de embrión de pollo; así, denominó Donovania granulomatis a los microorganismos que actualmente se conocen como Calymmatobacterium granulomatis²⁰.

A pesar de que la naturaleza bacteriana de la enfermedad se estableció desde la década de los 40's, hasta el momento no se ha logrado que el agente etiológico cumpla satisfactoriamente los postulados de Koch, ni que sea investigado con profundidad; ello se debe principalmente a que no se han detectado animales susceptibles³⁴ y a que se ha fracasado rotundamente en la obtención de cultivos in vitro cuyas bacterias contengan -- cápsulas integras²⁸. Asimismo, las lesiones típicas no se han podido reproducir en voluntarios humanos mediante la inoculación de microorganismos desarrollados en condiciones de laboratorio o de extractos de tejidos humanos afectados y sólo se ha conseguido a través de trasplantes de piel enferma o por autoinoculación del material contenido en los pseudobubones^{34,60}.

Por otro lado, el padecimiento en cuestión se ha denominado aproximadamente con 15 nombres diferentes: como ya se mencionó, el término donovanosis le fue aplicado en honor de -- -- -- Donovan; mientras tanto, el de granuloma inguinal fue empleado por Crocker⁶⁰ en su tratado relacionado con las enfermedades tropicales de la piel, publicado en 1908 y aunque este último nombre es el más común, según Richens¹¹⁸ es tan inadecuado --

como el de granuloma venéreo. En este aspecto, el autor arguye que el término genera confusión, ya que el linfogranuloma venéreo también se llama linfogranuloma inguinal; lógicamente, la situación se agrava cuando se considera que ambas enfermedades presentan analogía tanto en el aspecto clínico como en su distribución geográfica.

2.1.2 TAXONOMIA, MORFOLOGIA Y ULTRAESTRUCTURA.

Calymmatobacterium: del griego calymma-manto o cubierta y bakterion-bastoncillo pequeño. Granulomatis: del latín --- granulum-grano y oma-tumor. Según la 8a. edición del Manual de Bergey (1974), se encuentra en la parte 8 correspondiente a bacilos Gram-negativos anaerobios facultativos y que comprende a las siguientes familias: I. Enterobacteriaceae y II. Vibrionaceae y a estos géneros considerados de afiliación incierta: Zymomonas, Chromobacterium, Flavobacterium, Haemophilus, Pasteurella, Actinobacillus, Cardiobacterium, Streptobacillus y Calymmatobacterium.

Sin embargo, el "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" 9a. Edición (1984), ubica al microorganismo en cuestión en la Sección 5 constituida por los bacilos Gram-negativos -- anaerobios facultativos: I. Enterobacteriaceae, II. Vibrionaceae, III. Pasteurellaceae y por los géneros: Zymomonas, Chromobacterium, Cardiobacterium, Calymmatobacterium, Gardnerella, Eikenella -

y Streptobacillus.

Por lo tanto, la clasificación taxonómica más reciente de Calymmatobacterium granulomatis es:

Sección: 5

Género: Calymmatobacterium

Especie: C. granulomatis

Cabe mencionar que C. granulomatis es la única especie -- del género Calymmatobacterium.

Respecto a su morfología, Calymmatobacterium granulomatis es un bacilo pleomórfico Gram-negativo que exhibe condensación cromatínica única o bipolar; mide 0.5μ de ancho por 1 a 2μ de largo, sus extremos son redondeados y se presenta sólo o agrupado en pequeñas cadenas de 2 a 3 elementos, además es inmóvil, capsulado y no esporulado.

Este microorganismo se ha caracterizado pobremente debido quizá a la dificultad para cultivarlo en el laboratorio; esto se refleja ampliamente en el hecho de que todas las publicaciones relacionadas con su ultraestructura^{27,28,35,85}, lo describen incluido en tejidos provenientes de individuos afectados.

La bacteria en cuestión se observa frecuentemente dentro de los fagosomas de macrófagos y rara vez en leucocitos poli-morfonucleares y espacios intracelulares. En este sentido, --

los microorganismos que se manifiestan dentro de las vacuolas fagocíticas presentan una longitud de 1 a 5μ y son redondos, ovales o elípticos, densos y delimitados perfectamente por una capa clara que corresponde a su cápsula; el ancho de esta última es variable pero, en general, las dimensiones de las que rodean a las bacterias contenidas en un mismo fagocito son similares; en las pocas ocasiones en las que esta especie llega a observarse libre en los espacios intracelulares, la cápsula es grande y ligeramente más densa que la que rodea a los microorganismos intracelulares⁸⁵. Se piensa que las anteriores diferencias pueden radicar en la degradación parcial de la cápsula por efecto de las enzimas lisosomales²⁸. Con respecto al material capsular, Davis^{27,28} encontró que éste se encuentra delimitado en su periferia externa por una membrana que podría corresponder a residuos de vacuolas fagocíticas pertenecientes a la célula mononuclear, a alguna respuesta del tejido huésped hacia el microorganismo, a un producto de protección de la bacteria o simplemente a cierto artefacto; en seguida de esta probable membrana capsular describió una capa interna, homogénea e irregularmente contorneada bajo la cual se observa a la cápsula propiamente dicha. Asimismo, señala que se manifiestan finas fibrillas con distribución radial entre la pared celular y la periferia de la cápsula, en este sentido, se han detectado estructuras capsulares similares en las levaduras de Histoplasma capsulatum al efectuarse las biopsias correspondientes, sugiriéndose que se trata de una respuesta no especí-

fica del tejido in vivo²⁸.

Por otro lado, la pared celular es de apariencia ondulan- te y evidencia evaginaciones filiformes y vesiculares y la mem- brana celular es angosta y en ciertas ocasiones manifiesta su estructura trilaminar; además, cuando el microorganismo se en- cuentra en división puede apreciarse la invaginación de la pa- red y la membrana celulares pero no la formación de septos^{35,85}.

En cuanto al citoplasma, puede observarse la madeja fila- mentosa de ribosomas, el nucleoplasma en su región central y - numerosos gránulos densos ubicados en la periferia; en ciertas publicaciones^{28,35} se hace referencia a estas granulaciones -- como estructuras fágicas empero, nunca se les ha detecta- do alguna membrana proteica limitante o los arreglos paracris- talinos que caracterizan a la formación de los virus durante - su desarrollo intracitoplasmático; del mismo modo, alguna vez se sugirió que las prolongaciones de la pared celular corres- pondían a cabezas de virus observables durante su ataque a la bacteria^{27,28}.

Por último, cabe señalar que las diferentes investigacio- nes relacionadas con la ultraestructura de Calymmatobacterium granulomatis han establecido que este microorganismo no posee flagelos^{28,35,85}.

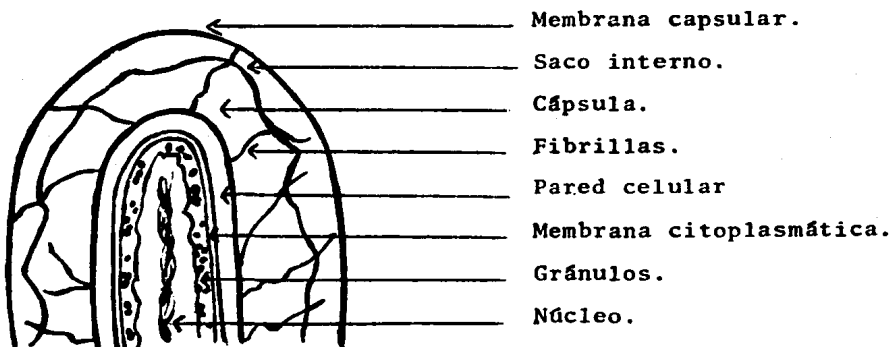


Diagrama esquemático de Calymmatobacterium granulomatis.

2.1.3 CARACTERISTICAS DEL CULTIVO.

En 1943, Anderson⁶ logró cultivar por primera vez a - - - Calymmatobacterium granulomatis al inocular fragmentos tisulares de individuos con granuloma inguinal en el saco vitelino - de huevos embrionados de gallina con 5 días de incubación; en esa ocasión después de 72 horas de mantenerlos a 37°C, observó microorganismos capsulados en preparaciones procedentes del -- fluido correspondiente.

Más tarde, Dulaney²⁰ obtuvo su desarrollo in vitro em--- pleando la técnica siguiente: extrajo asépticamente yemas de - huevos embrionados de gallina con 5 a 8 días de incubación, --

las adicionó a un matraz que contenía perlas de vidrio y un volumen igual de solución estéril de Locke; provocó su ruptura, las homogeneizó y distribuyó el homogenado en tubos de ensayo, colocó éstos en posición inclinada y estimuló la coagulación de la lecitina mediante vapor a 80°C durante 15 minutos. Posteriormente, sembró cada tubo con 0.2 ml del material proveniente de lesiones, les agregó solución de Locke hasta cubrir 3/4 partes del plano inclinado y finalmente los incubó en posición vertical durante 48 a 72 horas a 37°C.

Goldberg⁵² observó que, en el medio de Dulaney, Calymmatobacterium granulomatis no desarrollaba su cápsula, aunque secretaba una sustancia mucoide y que los microorganismos se encontraban en la solución de Locke y no sobre la yema coagulada.

Por su parte, Dienst³² también cultivó a la mencionada bacteria empleando medios con yema de huevo, a los cuales preparó de esta manera: obtuvo asépticamente yema de huevos frescos, la diluyó 1:2 con solución salina isotónica estéril y, finalmente mezcló en proporciones iguales la dilución y un medio base previamente esterilizado y enfriado a 45°C, constituido por 1% de peptona, 0.3% de Tryptone, 0.3% de dextrosa, 0.2% de sales y 0.12% de agar, con un pH 7.3. Cabe señalar que la concentración de agar que utilizó se estableció previa experimentación. Una vez distribuido el medio en tubos de ensayo,

los inoculó con 0.1 cm^3 de fluido de saco vitelino infectado - por Calymmatobacterium granulomatis y los incubó durante 4 --- días a 37°C .

Al efectuar las observaciones correspondientes, encontró que los microorganismos cultivados en este medio, a diferencia de los que crecían en el Dulaney, sí presentaban cápsula y una morfología similar a la de los que provenían de las lesiones - de individuos que padecían granuloma inguinal. Además, comprobó que los bacilos permanecían viables durante 8 a 10 días --- cuando se almacenaban en el medio que diseñó, a temperatura ambiente o en refrigeración³².

Posteriormente, Goldberg⁵² postuló que el factor que estimulaba el crecimiento del microorganismo estaba relacionado -- con la yema de huevo y no con los productos del desarrollo embrionario e intentó sustituirlo sin ningún éxito por: hemoglobina, tiamina, triptofano, cistina, asparagina, biotina, ácido pimélico, uracilo, adenina, guanina, xantina, ácido pantoténico, extracto de hígado de conejo, extracto de levadura y mucina gástrica. Sin embargo, logró su objetivo empleando hidrolizado de lactoalbúmina (digerido enzimático de albúmina) o --- Phytone (digerido enzimático de harina de soya) en sustitución de la yema de huevo; los adicionó a un medio base que contenía L-cistina, cloruro de sodio, fosfato dipotásico, tioglicolato de sodio y un pH de 7.2, al cual había esterilizado previamente

te a 121°C durante 15 minutos; el desarrollo resultó óptimo -- después de una incubación de 37°C durante 4 días⁴⁷. El trabajo mencionado originó más información valiosa en lo que se refiere al factor que promueve el crecimiento del bacilo de -- -- Donovan. Así, se cree que es de naturaleza polipeptídica y, -- de acuerdo a las características del hidrolizado de lactoalbúmina, también se ha deducido lo siguiente:

1. La esterilización en autoclave no lo destruye.
2. El calor y la adición del ácido tricloroacético al -- 10% no provoca su precipitación.
3. No es dializable a través de membranas ordinarias de diálisis.
4. No se destruye al exponerse a ácidos y bases fuertes sin presencia de calor.
5. Origina reacciones positivas con ninhidrina y Biuret.

Además, Goldberg⁴⁷ sugiere que el suministro de un bajo -- potencial de óxido-reducción es primordial para cultivar a -- Calymmatobacterium granulomatis; así lo demuestra el hecho de -- que obtuvo un desarrollo excelente en el medio inclinado de -- DuLaney cuando se adicionó medio fluido de tioglicolato en lugar de solución de Locke. Sin embargo, como el bacilo no creció cuando se sembró en el medio tioglicolato, se comprobó que

éste sólo confiere condiciones adecuadas en cuanto a potencial redox y que la yema de huevo (o su sustituto) es indispensable como factor de crecimiento.

Según lo expuesto anteriormente las condiciones adecuadas de incubación para Calymmatobacterium granulomatis son: temperatura de 37°C y un bajo potencial de óxido-reducción; en cuanto al tiempo, éste depende del medio empleado pero, en general, se puede establecer que varfa entre 2 y 4 dfas.

2.2 PATOLOGIA Y EPIDEMIOLOGIA.

El granuloma inguinal es una enfermedad que se transmite generalmente por contacto directo e involucra a los genitales externos en el hombre, a la vulva, vagina y recto en la mujer y a la región perianal en los homosexuales. No obstante, también puede afectar la mucosa oral cuando el paciente practica el coito per os^{25,41} y, con mayor frecuencia, a la zona inguinal^{51,70,128}. Al parecer, los microorganismos penetran la mucosa y/o la piel a través de las pequeñas escoriaciones que se generan durante el acto sexual¹.

Por lo que se refiere al período de incubación del padecimiento, se considera que éste varía entre 3 días y 6 meses¹²⁷, dependiendo del número de bacterias inoculadas¹¹⁸. En este sentido, las investigaciones efectuadas en voluntarios humanos han mostrado que el período que puede transcurrir antes de que aparezcan los síntomas es de 40 a 50 días⁵⁷; empero, no se debe pasar por alto el hecho de que existen diferencias, que bien pueden ser definitivas, entre las condiciones naturales y las experimentales.

En cuanto a las lesiones que caracterizan a la enfermedad, es posible establecer que básicamente pueden ser de 3 tipos, todos los cuales son precedidos por un intenso prurito^{56,60,154}:

1. La variedad exuberante: es la de mayor incidencia y -

se caracteriza por la aparición de pápulas duras e in doloras que en los días siguientes se ulceran; histológicamente, dichas lesiones manifiestan la formación de tejido hipertrófico por la gran proliferación epitelial¹⁵, una densa infiltración de macrófagos y plasmocitos y cantidades variables de polimorfonucleares y linfocitos²⁷. Posteriormente, tanto la induración como el edema se extienden hacia las ingles dando --- lugar al pseudobubón, cuyo nombre deriva de que no -- afecta, aunque así lo parece, a los linfáticos inguinales; por cierto que éste puede ser firme o fluctuante, pero cualquiera que sea el caso, existe la posibilidad de que se rompa evidenciando al microscopio granulomas típicos¹¹⁸.

2. La ulcerativa: denominada así porque la zona involucrada muestra varias úlceras dolorosas cubiertas por exudado, las cuales se originan normalmente por efecto de infecciones secundarias en las lesiones de tipo exuberante⁵⁶.
3. La variedad cicatrizal: en este grupo se incluye a -- aquel tipo de lesiones que el organismo resuelve por fibrosis dando lugar a cicatrices queloides. Lógicamente, pueden observarse áreas irregulares de epitelio despigmentado con abundante tejido cicatrizal⁵⁶.

Comúnmente, las alteraciones o pápulas primarias no son detectadas en forma temprana debido a que son indoloras; luego entonces, no es sino hasta que ha transcurrido un mes o más, -- que aparecen síntomas locales tales como dolor durante la defecación, disuria, dispareunia, prurito y olor característico^{56,128}, cuando el paciente se alerta y acude al médico para que éste efectúe el diagnóstico correspondiente; además, el sangrado vaginal suele ser el primer signo de donovanosis oculta¹¹⁸. En cuanto a los casos tardíos, el dolor es tan evidente que inclusive las mujeres llegan a presentar dificultad para caminar; -- por otro lado, la fiebre, leucocitosis y otros signos de enfermedad sistémica no son frecuentes y más bien sugieren infección secundaria¹¹⁵.

Por lo que toca a las principales complicaciones, se ha publicado ampliamente que éstas sobrevienen en un cierto porcentaje de mujeres embarazadas, de enfermos no tratados, inmunocomprometidos o cuya terapia no ha sido la adecuada; en esas condiciones, una posibilidad viable es la diseminación hematógena del microorganismo, involucrando huesos, articulaciones y vísceras, provocando al paciente, debilitamiento progresivo, caquexia, anemia, pérdida de peso y leucocitosis^{108,109,132}.

Al parecer, las mujeres negras embarazadas²⁴ y las negras postmenopáusicas⁷³ figuran entre las personas más afectadas -- por el granuloma inguinal diseminado; no obstante, Greenblatt⁵⁶

señala que, en general, las lesiones extragenitales de la donovansiosis ocurren en el 6% de los casos y la mayoría tiene relación con el embarazo.

El edema de los genitales externos en estadios tempranos progresa, en algunas ocasiones, a pseudoelefantiasis masiva⁷⁰; ésta es relativamente común en la mujer y casi inexistente en el hombre⁸¹. Tanto las afecciones del cérvix como la extensión del proceso hacia útero, trompas y ovarios son raras y sólo se presentan después de alguna lesión previa o durante la preñez¹³⁰.

Otras complicaciones del granuloma inguinal son la mutilación del escroto, pene y/o tejido inguinal⁴² (debido a la evolución indolora del padecimiento) y la estenosis de uretra, vagina, ano y otras áreas cuyas lesiones se han resuelto por fibrosis¹²⁸.

El índice de mortalidad es muy bajo y sólo involucra a pacientes no tratadas que dan a luz o abortan; sin embargo, algunos enfermos se han suicidado al sentirse excluidos de la sociedad como resultado de mutilaciones, campañas de desprestigio, infertilidad, etc.^{118,128}.

Finalmente, cabe destacar que algunos autores sugieren la existencia de cierta relación entre el granuloma inguinal y el cáncer genital, debido a que se han observado varios casos¹⁵ en que ambos padecimientos coexisten; los hechos siguientes --

apoyan la afirmación anterior^{27,50,118}:

1. Se detectaron anticuerpos anti-Calymmatobacterium granulomatis en el suero de 9 individuos de entre 62 que presentaban carcinoma genital.
2. La incidencia de cáncer genital es elevada en regiones donde el granuloma inguinal es endémico.
3. Una cantidad considerable de sujetos que padecieron donovanosis han desarrollado cáncer, particularmente en áreas despigmentadas (en las que las lesiones se resolvieron por fibrosis).
4. Varios tipos de condiciones granulomatosas crónicas de la piel pueden dar origen a procesos malignos.

Sin embargo, la duda permanece, ya que está demostrado -- que el carcinoma genital comparte factores predisponentes con el granuloma inguinal; por ejemplo, la carencia de hábitos higiénicos. Además, bien podría ser que un cáncer preexistente haya proporcionado la puerta de entrada a Calymmatobacterium granulomatis en los casos en que ambos padecimientos cursan paralelamente¹¹⁸.

Por lo que se refiere a la epidemiología, es importante -- señalar que en casi todo el mundo han aparecido reportes de -- granuloma inguinal; no obstante, éste parece presentar una ma-

yor incidencia en regiones tropicales y subtropicales tales -- como las islas caribeñas, India, Brasil y la costa Este de --- Africa⁷³. Del mismo modo, se piensa que las personas de piel oscura muestran mayor susceptibilidad en virtud de que su epidermis posee un estrato córneo más delgado y, por tanto, más frágil^{41,118}, lo anterior es apoyado por estadísticas que indican que en la India por cada 72 hindúes enfermos sólo hay 1 mahometano afectado⁷³; asimismo, en Estados Unidos de Norteamérica los casos parecen estar concentrados entre la población negra del Sureste del país¹²⁷. Se asegura que la carencia de hábitos higiénicos y el bajo nivel socioeconómico van asociados a la donovanosis⁴¹. Además, la edad de la mayoría de pacientes con granuloma inguinal coincide con el período de mayor actividad sexual; sin embargo, existen reportes de niños pequeños que han adquirido el padecimiento^{73,127}. Finalmente, en lo que se refiere a la distribución de la afección en función del sexo, ésta varía notablemente de una publicación a otra -- pero, en general, parece ocurrir con más frecuencia en los hombres que en las mujeres¹¹⁸.

Aunque todo indica que la enfermedad se transmite preferentemente a través del contacto sexual no debe descartarse la posibilidad de que existan otros caminos; de hecho, han surgido algunas controversias en torno a la determinación de la verdadera vía de transmisión. No obstante, las siguientes razones apoyan la teoría de la transferencia sexual⁴⁹:

1. En la mayoría de los casos se ha comprobado la exposición sexual antes de la aparición de la lesión.
2. La incidencia de la enfermedad en grupos etarios --- sexualmente activos es considerablemente elevada.
3. Es muy frecuente que los homosexuales muestren ulceraciones en la región perianal.
4. En ocasiones, el padecimiento sólo afecta a los genitales internos.
5. Es común que las lesiones se localicen en las áreas - perigenital y genital externa.

Por otra parte, suele plantearse este tipo de situaciones:

- El hecho de que muchos pacientes con granuloma inguinal declaren exposiciones sexuales previas a la enfermedad, es de poco valor, pues los datos indican que - la frecuencia del coito y el número total de contactos sexuales no es mayor en los sujetos afectados que en otros individuos del mismo estrato socioeconómico - que no la han padecido⁴⁹.
- Que el padecimiento sea más común en grupos de edades sexualmente activos es de poca trascendencia, si se - toma en cuenta que en poblaciones donde el mal es endémico, la actividad sexual inicia muy temprano y con

tinúa hasta la 5a o 6a década de la vida¹¹⁸.

- Las ulceraciones perianales observadas en homosexuales no deben considerarse concluyentes ya que existe la posibilidad de que Calymmatobacterium granulomatis se encuentre como flora habitual del intestino; en -- este sentido, podría hablarse de autoinoculación más -- que de transmisión sexual⁴⁸.
- Si bien la existencia de lesiones que sólo involucran al cérvix sugiere transmisión sexual, también es probable que el agente etiológico provenga del intestino por falta de condiciones higiénicas del sujeto⁴⁹.

A lo antes mencionado, podrían anexarse los siguientes -- hechos comprobados^{48,49,118}:

1. La enfermedad también afecta a personas que no son -- sexualmente activas.
2. El índice de infección en prostitutas y parejas sexuales de individuos con donovanosis es bajo.
3. Se ha podido aislar a Calymmatobacterium granulomatis de las heces de pacientes con granuloma inguinal.

Otras publicaciones interesantes mencionan que la afec-- ción se ha observado en niños e inclusive, en recién nacidos, -- pero generalmente se trata de hijos de personas enfermas; en --

este contexto, hay quien sugiere que la infección puede transmitirse a través de material contaminado, o quizá, de piojos - p^ublicos¹¹⁸. Asimismo, existe un reporte que relata el caso de un hombre que adquirió el padecimiento en la zona inguinal, -- a pesar de que 16 años antes le habían sido amputados los genitales externos⁴⁹.

En relación a lo expuesto anteriormente, Goldberg⁴⁸ especula que "el microorganismo puede ser un residente fecal que invade algunas lesiones previas de la piel y mucosa genitales- para originar el proceso patológico conocido como donovanosis; sin embargo, la susceptibilidad del paciente al microorganismo ha de estar relacionada con factores aún desconocidos".

2.3 DIAGNOSTICO EN EL LABORATORIO.

La identificación de Calymmatobacterium granulomatis en el laboratorio constituye una tarea ardua y difícil, entre --- otras razones, porque no se logra aislarlo o cultivarlo in --- vitro con regularidad y, consecuentemente, muy pocas cepas se han podido caracterizar. No obstante, tanto la apariencia clínica como la evolución de las lesiones que provoca suelen representar datos casi determinantes para diagnosticar el padecimiento¹²⁷.

El diagnóstico definitivo del granuloma inguinal deriva de la detección de los cuerpos de Donovan en el material proveniente de las lesiones^{24,32,56}; en este sentido, el método confiable para lograrlo contempla el examen de frotis teñidos preparados de la siguiente manera¹¹⁸:

1. Seleccionar una lesión activa, preferentemente libre de contaminación superficial.
2. Lavarla y secarla cuidadosamente.
3. Extraer una pequeña porción de tejido granulomatoso con instrumental adecuado o raspando el borde de la úlcera.
4. Colocar la muestra entre 2 portaobjetos y presionarla.
5. Fijar ambas preparaciones con metanol (durante 20 min.)

6. Tefir mediante las técnicas de Giemsa o Wright.
7. Examinar al microscopio empleando el objetivo de inmersión.

Los cuerpos de Donovan corresponden a bacilos pleomórficos contenidos dentro de los fagosomas de grandes células mono nucleares, los cuales se observan de coloración azul cuando se tiñen por Giemsa o azul a púrpura y rodeados por cápsulas rosas con el colorante de Wright¹²⁷. Cabe mencionar que los --- cuerpos de Donovan persisten visibles en los frotis durante 5 a 14 días, cuando se les proporciona un tratamiento adecuado⁶⁰.

Sin embargo, la observación de las inclusiones es difícil cuando el espécimen que se examina procede tanto de lesiones tempranas como de las tardías¹¹⁸; en estos casos, se recomiendan biopsias del margen de la lesión que incluyan tejido normal y sean procesadas adecuadamente, es decir, fijadas con formaldehído e incluidas en plástico en vez del empleo de glutaraldehído y cera, respectivamente³⁵.

Los 3 aspectos histológicos que determinan conjuntamente la presencia de granuloma inguinal son¹²⁹:

1. La abundancia de macrófagos en cuyo interior se encuentran los característicos cuerpos de Donovan.
2. Un infiltrado dérmico denso.

3. Hiperplasia epitelial.

El primero es único para donovanosis; el segundo se presenta en la mayoría de lesiones granulomatosas debidas a la acción de microorganismos intracelulares, como los que causan tuberculosis, histoplasmosis y rinoescleroma y, el último, es clásico también de algunas micosis y de infecciones treponémicas.

Como ya se mencionó, la célula patognomónica del granuloma inguinal es un tipo distintivo de histiocito de 20 a 90 μ de diámetro con un núcleo que se manifiesta fuertemente picnótico y excéntrico y cuyo citoplasma se encuentra invadido por numerosas inclusiones (cuerpos de Donovan) de 1 a 2 μ de diámetro que generalmente presentan cápsula cuando las lesiones son crónicas; en el caso de que el padecimiento curse como agudo, frecuentemente predominarán las formas no capsuladas^{29,115}. Es importante destacar que, ocasionalmente los microorganismos se encuentran dentro de los polimorfonucleares^{28,35,85} y los macrófagos que no contienen cuerpos de Donovan, adquieren el mismo aspecto de los macrófagos activados; es decir, con núcleo grande, abundantes lisosomas y mitocondrias, así como retículo endoplásmico y complejo de Golgi prominentes⁸⁵. Otras características de los tejidos afectados son la presencia de grupos localizados de células plasmáticas, fibroblastos, escasos eritrocitos, fragmentos de tejido conectivo y, en cuanto a los

vasos, éstos presentan paredes gruesas y eventualmente la luz de algunos de ellos se encuentra congestionada³⁵.

Con respecto al diagnóstico serológico, puede establecerse que Anderson⁶ fue el primero en demostrar que el suero de los individuos que padecen granuloma inguinal contiene anticuerpos anti-Calymmatobacterium granulomatis que fijan el complemento; posteriormente, Goldberg⁵³ sugirió que la prueba de fijación de complemento podía constituir una herramienta útil para diagnosticar de manera indirecta a la donovanosis; entre sus hallazgos sobre esta prueba, encontró que sus resultados correlacionaban con la edad de las lesiones, ya que los sueros de pacientes cuyas afecciones eran de 3 meses o más, originaban reacciones positivas manifestando títulos más elevados que los provenientes de individuos con lesiones de menor tiempo. Asimismo, observó que los sueros tanto de sujetos sanos como de los que experimentaban otros padecimientos granulomatosos no redituaban falsos positivos. Más tarde, el mismo Goldberg⁴⁸ fue capaz de detectar a Calymmatobacterium granulomatis en las heces de pacientes con granuloma inguinal mediante pruebas de fijación de complemento; en esa ocasión utilizó sueros de enfermos y sueros específicos preparados en cuyos, indudablemente, este tipo de métodos podrá representar un argumento definitivo para efectuar el diagnóstico de la enfermedad en un futuro inmediato; sin embargo, se debe establecer que, en la actualidad, no existen aún métodos serológicos de rutina para investi

gar el padecimiento en cuestión.

Por último debe subrayarse el hecho de que el granuloma inguinal puede confundirse con otras entidades clínicas, tales como el cáncer de los genitales o el recto con o sin metástasis inguinal, la hernia femoral o inguinal, tuberculosis, amebiasis, blastomycosis, elefantiasis debida a filarias y a --- otros agentes o factores que bloquean el drenaje linfático, --- así como con algunas afecciones de transmisión sexual, destacando el chancroide, el linfogranuloma venéreo y la sífilis⁵⁶, 127,128; cabe recordar que estas 3 últimas frecuentemente coexisten con el granuloma inguinal y, para poder diferenciarlas deben considerarse las características distintivas: en el chancroide el período de incubación es corto, existen úlceras muy dolorosas con bordes no determinados y bubones que supuran y los frotis al Gram revelan bacilos Gram-negativos agrupados en forma de huellas dactilares. El linfogranuloma venéreo origina síntomas sistémicos, bubones sensibles, fistulas y úlceras superficiales con base amarilla; finalmente, las lesiones propias del condilomata lata tienden a aparecer pálidas y generalmente con escaso sangrado o sin él y se identifica en forma definitiva mediante las técnicas de observación en campo oscuro y/o las serológicas específicas para sífilis^{118,127,135}.

2.4 TRATAMIENTO.

Antes de la aparición de los antibióticos las sales antimoniales tales como el tartrato de antimonio constituían los medicamentos de elección para efectuar el tratamiento del granuloma inguinal; no obstante, se abandonó su uso en cuanto la gente se percató de su toxicidad para el humano¹⁰⁸. Posteriormente se emplearon con relativo éxito terramicina, aureomicina^{119,135} y triacetiloleandomicina⁷⁵. Pero hoy en día, los antibióticos más utilizados son: estreptomycin, tetraciclinas, cloramfenicol y co-trimoxazol y, como opción secundaria, eritromicina, ampicilina, gentamicina y lincomicina¹¹⁸.

La estreptomycin se ha considerado como efectiva desde hace tiempo, a razón de 4 g diarios durante 5 días por vía intramuscular^{119,154}, aunque algunos autores reportan que el tratamiento debe ser oral⁶⁰; empero, cabe destacar que este medicamento paulatinamente se ha sustituido por la tetraciclina, la cual actualmente se clasifica como el fármaco de elección, en dosis de 500 mg cada 6 horas, durante 2 a 4 semanas^{60,127,154}.

No obstante, al igual que el cloramfenicol y la estreptomycin, la tetraciclina está contraindicada en el embarazo y, aparentemente, algunas cepas son resistentes a ella; en el primer caso se recomienda el empleo de co-trimoxazol¹¹⁸ (aun-

que existe quien rechaza a este último), o bien, de eritromicina combinada con lincomicina o ampicilina^{60,154} y, para el segundo, el co-trimoxazol (80 mg de trimetoprim y 400 mg de sulfametoxazol)⁶⁰, aunque por lo general, el granuloma inguinal no responde a la terapia con sulfonamidas²⁵.

En Papua, Nueva Guinea, donde se reporta gran incidencia del padecimiento, el antibiótico seleccionado es el cloramfenicol, en dosis de 500 mg. 4 veces al día y durante 1 a 3 semanas, dependiendo de la respuesta del paciente¹¹⁸.

Para Schwarz¹²⁷ y Robinson¹²⁰, la eritromicina constituye una opción aceptable cuando se aplica en dosis de 2 g diarios por vía oral durante 10 a 21 días, pero su efectividad sigue cuestionándose¹⁴⁵.

Con respecto a la utilización de ampicilina, puede señalarse que resultó exitosa en dosis de 250 mg, 4 veces al día, por un período de 3 a 11 semanas, cuando se le administró a pacientes con granuloma inguinal sin respuesta a la tetraciclina¹⁴⁵; sin embargo, su eficacia se considera variable⁶⁰.

Por otro lado, es importante subrayar que, aunque los efectos de los antibióticos sobre Calymmatobacterium granulomatis no se han investigado debidamente, el hecho de que el 10% de los pacientes experimenta recidivas después de meses de "haber sanado" sugiere que algunos fármacos entre los de mayor

empleo sólo funcionan como bacteriostáticos¹²⁷.

Finalmente, cabe mencionar que la cirugía representa un papel complementario pero importante para ciertos individuos con granuloma inguinal, ya que algunas lesiones que involucran al prepucio pueden ser eliminadas mediante circuncisión y, en cuanto a los casos de pseudoelefantiasis de los labios, también pueden ser corregidos; pero debe hacerse hincapié en el hecho de que nunca debe practicarse antes de haberse aplicado la terapia antimicrobiana adecuada, para evitar el riesgo de que la enfermedad se disemine^{118,154}.

CAPITULO III

**PREVENCION DE LAS ENFERMEDADES
DE TRANSMISION SEXUAL.**

III. PREVENCIÓN DE LAS ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL

Sin lugar a dudas, los factores que determinan la desafortunada propagación de las enfermedades de transmisión sexual no pueden controlarse con las medidas clásicas de salud pública, debido a que se encuentran estrechamente relacionadas con la conducta de los individuos; luego entonces, existe la necesidad de diseñar y emplear tácticas educativas porque, no obstante, las afecciones en cuestión no dejan de constituir padecimientos transmisibles para los cuales se deben aplicar los métodos profilácticos correspondientes^{16,21,55}.

En este sentido, las medidas del caso se clasifican de acuerdo a diferentes niveles: la prevención primaria se contempla en la fase prepatogénica y, la secundaria, cuando el (la) paciente ya se encuentra afectado^{59,138}.

Entre las medidas propuestas para el nivel primario destaca la educación de las comunidades en cuanto a higiene y aspectos sexuales, ya que ello puede influir decisivamente en la conducta de las personas^{44,122,151}. La ignorancia de conceptos sexuales, concretamente de los que originan las enfermedades venéreas, funge como responsable de su frecuencia. Sin embargo, no basta con que las personas obtengan los conocimientos, ya que el proceso suele involucrar elementos afectivos que varían con la personalidad de los sujetos^{16,44,59}.

De hecho, la única fórmula infalible es la abstinencia, pero considerando que ésta es inaceptable para la gran mayoría, la monogamia y la reducción del número de parejas, excluyendo a las que tienen otros contactos, constituyen las opciones más recomendables. Asimismo, los individuos sexualmente activos pueden reducir los riesgos si inspeccionan previamente a su pareja en turno, para detectar a tiempo la presencia de lesiones, erupciones y/o descargas anormales^{54,138}.

Los dispositivos contraceptivos tales como condones y diafragmas y las sustancias espermicidas confieren relativa protección; el uso de condones reduce el riesgo de infecciones tanto por microorganismos transferidos por el semen - - - (Neisseria gonorrhoeae y Chlamydia trachomatis), como por --- Treponema pallidum, Haemophilus ducreyi y el virus del herpes genital, que se transmiten generalmente por contacto directo con la piel o membranas afectadas. Por su parte, los diafragmas y espermicidas, los cuales suelen utilizarse como métodos anticonceptivos asociados, proporcionan cierta protección contra las enfermedades de transmisión sexual, pues la acción mecánica de los primeros probablemente se ve reforzada con la propiedad de los segundos disminuyendo la cantidad de microorganismos y espermatozoides¹³⁸.

La micción y la ducha postcoitales pueden manifestar una acción mecánica de arrastre pero, en general, se considera --

que su efectividad en la protección no es tan elevada como hubiera de desearse¹³⁸.

Por lo que se refiere a la administración de antimicrobianos como medida profiláctica, ya sea antes o después del contacto sexual, ésta no es muy recomendable, ya que puede ocasionar reacciones alérgicas al individuo y/o el surgimiento de cepas resistentes, además, puede resultar que la bacteria transmitida no sea sensible al antibiótico elegido¹³⁸.

Por otro lado, es importante subrayar que tanto las prácticas heterosexuales atípicas como las homosexuales incrementan las posibilidades de que se adquiera este tipo de padecimientos; por ejemplo, el coito ano-rectal origina afecciones en virtud de que el epitelio rectal es más delicado que el vaginal y se lesiona más frecuentemente brindando a los microorganismos las condiciones adecuadas para establecerse⁵⁴.

Particularizando en la prevención del chancroide, según Scharwz¹²⁷, en ésta influye directamente la higiene de las personas; asimismo, se ha demostrado que la circuncisión y/o el empleo de condones ofrecen una aceptable protección a los hombres.

Por lo que respecta al granuloma inguinal, Richens¹¹⁸ y Scharwz¹²⁷ han establecido que la higiene y la educación juegan un importante papel en su prevención.

En cuanto a las medidas preventivas a nivel secundario, -
 cabe señalar que el diagnóstico temprano y el tratamiento pre-
 coz constituyen los principios básicos para el control de las-
 enfermedades de transmisión sexual⁴⁴. Desde luego, una de las
 metas prioritarias consiste en localizar a los contactos de --
 los enfermos para someterlos al tratamiento adecuado; sin em--
 bargo, dicha búsqueda no siempre es exitosa, ya que, aún con--
 tándose con una buena organización y el personal capacitado, -
 existen infalibles obstáculos psicológicos y sociales, tales -
 como^{16,22,47,91}.

1. La insuficiente colaboración de los enfermos.
2. La negativa actitud del personal hacia los pacientes
 que padecen enfermedades de transmisión sexual.
3. Lo inconsistente de las denuncias por parte de los -
 médicos privados.

1. En cuanto a la insuficiente colaboración de los enfermos-
 puede mencionarse que de todas las personas que adquieren el -
 contagio, sólo algunas buscan atención médica inmediata. Lógi-
 camente, este fenómeno no es particular de las enfermedades de
 transmisión sexual, sin embargo, su frecuencia es mucho mayor-
 en este tipo de afecciones. Sin duda, el factor más importan-
 te entre los que generan la búsqueda de ayuda médica es la gra-
 vedad de los síntomas, ya que cuando ésta es evidente aumenta-

las probabilidades de que el paciente decida visitar al médico de inmediato; generalmente si los signos se consideran menos agudos las personas se inclinan por aplicar procedimientos de atención propia tales como el uso de medicinas caseras o patentadas. Muchos autores coinciden en señalar 4 razones por las que el enfermo no acude a consulta voluntariamente:

- Su falta de percepción de los síntomas tempranos, -- especialmente en mujeres.
- Su creencia de que el padecimiento representa un estigma.
- Su ignorancia sobre las causas y posibles consecuencias de la enfermedad.
- Su temor al tratamiento y su desconfianza a los médicos y a los centros especializados.

Es necesario reconocer que la falta de información acerca de los síntomas, causas y consecuencias de las enfermedades de transmisión sexual es un fenómeno general entre la población. Este hecho reviste gran importancia, ya que frecuentemente el primer diagnóstico lo realiza la persona afectada y, la decisión que toma, depende en gran medida de sus propias deducciones. Asimismo, tanto el enfermo como su(s) pareja(s), cuando por fortuna llegan a entrevistarse con el médico, deben ser convencidos por éste a fin de que cooperen en -

lo que corresponde al tratamiento; en este contexto, un elevado número de ellos, sobre todo de las parejas de individuos afectados, no acata las disposiciones médicas porque no ha llegado a una definición propia de la enfermedad y desconoce sus consecuencias.

Por otro lado, el sentido de vulnerabilidad personal constituye un factor importante en lo que se refiere a la decisión del paciente para asistir a consulta cuando no experimenta síntomas; en general, lo que la persona hace depende de su nivel de conocimientos y, por ende, de su sospecha de que existe la infección. Sin embargo, en muchos hombres jóvenes que "sólo creen que saben" y consideran que "tienen la situación bajo control", el temor a la enfermedad no existe o es escaso y ello provoca que acuda tarde a la consulta médica. Aunque es de suponerse que muchas de las barreras psicológicas y sociales que impiden que los individuos consulten al médico son similares para todas las enfermedades, es evidente que éstas adquieren una dimensión notablemente mayor en la gente afectada por padecimientos de transmisión sexual.

2. Por lo que respecta a la actitud que exhibe el personal de los hospitales hacia los pacientes que padecen enfermedades de transmisión sexual, puede señalarse que la imagen de estigma social que proyectan las enfermedades venéreas a la población se extiende también a la mayoría de los profesiona-

les que se desempeñan en el campo de la salud. Desafortunadamente, esto genera que el trato que se le proporciona al paciente no sea el óptimo y, como consecuencia, que éste experimente sensaciones de incomodidad que lo conducen a rechazar el diagnóstico y/o la terapia correspondiente.

3. Acerca de la inconsistencia de las denuncias que deben hacer los médicos privados a los centros de referencia, resulta indispensable que se tomen las medidas que induzcan su desaparición. El problema principal radica en que la mayoría de los médicos prefiere proteger su relación con el paciente que a su comunidad en general. Es decir, que ante el dilema de favorecer a su paciente o a su comunidad, el médico resuelve frecuentemente denunciar sólo algunos de los casos o ninguno de ellos, incrementando las posibilidades de que la(s) enfermedad(es) en turno no sea(n) controlada(s) y se difunda(n) entre la población.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES.

IV. CONCLUSIONES

I. CHANCROIDE.

1. Con respecto al agente etiológico, se trata de un bacilo Gram-negativo que se agrupa semejando huellas dactilares.
2. Por lo que se refiere a la enfermedad, es más frecuente en negros y en individuos de niveles socioeconómicos bajos, no se ha reportado otra vía de transmisión diferente al contacto sexual; sólo afecta genitales externos y frecuentemente a la mucosa rectal pudiendo manifestarse de diversas maneras, aunque la lesión típica corresponde a úlceras dolorosas cubiertas por exudado grisáceo.
3. En caso del diagnóstico del padecimiento:
 - Las muestras adecuadas son las secreciones de las úlceras o del aspirado de los bubones y las biopsias; las dos primeras deben sembrarse en medios enriquecidos tales como agar suero fetal bovino, agar sangre de conejo y agar chocolate enriquecido, adicionados o no de vancomicina; como existen otros microorganismos que producen características macroscópicas similares, las colonias sospechosas deberán analizarse bioquímicamente para identificar a Haemophilus ducreyi mediante las pruebas de requerimiento de factor X, -

producción de oxidasa, de fosfatasa alcalina y reducción de nitratos.

- Es útil efectuar preparaciones de los 3 tipos de --- muestras mencionadas, tiñéndolas mediante las técnicas de Gram, Giemsa, Wright, Unna-Pappenheim o - - - Seller, para obtener más información presuntiva.
- En un futuro cercano se podrá contar con una técnica de inmunofluorescencia indirecta que detecta al microorganismo en las muestras, mediante el empleo de anticuerpos monoclonales anti-Haemophilus ducreyi.

II. GRANULOMA INGUINAL.

1. Su agente etiológico es un bacilo Gram-negativo, capsulado que, para desarrollar in vitro, requiere de bajos potenciales de óxido-reducción y de la presencia de un factor contenido en la yema de huevo (sustituible por hidrolizado de albúmina o harina de soya).
2. Por lo que se refiere a la enfermedad, ésta se adquiere principalmente por contacto sexual y afecta tanto a los genitales externos como a la región perianal. Su lesión típica es una úlcera de bordes elevados y centro enrojecido. La afección puede diseminarse e involucrar huesos, articulaciones y vísceras u originar otras complicacio--

nes como la pseudoelefantiasis o la mutilación de los g_enitales externos.

3. Por lo que toca al diagnóstico del padecimiento, la detección de cuerpos de Donovan en los tejidos afectados, utilizando las tinciones de Wright y Giemsa, representa el criterio diagnóstico definitivo. No obstante, la prueba de fijación del complemento constituye un método diagnóstico rápido y confiable.

CAPITULO V

ANEXOS

AGAR INFUSION DE CORAZON

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Infusión de corazón de res	500
Tryptosa	10
Cloruro de sodio	5
Agar	15
pH final 7.4 ±	

Preparación: Suspender 40 gramos del medio en un litro de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente -- hasta que se disuelva completamente. Distribuir en tubos o matraces y esterilizar en autoclave durante 15 -- minutos a 121°C (15 libras de presión).

AGAR MUELLER-HINTON

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Infusión de carne de res	300
Peptona Acidicase	17
Almidón	1.5
Agar	17
pH final 7.4 <u>±</u>	

Preparación: Se suspenden 38 gramos de polvo en un litro de agua destilada. Mézclase bien caliente, agitando frecuentemente y hiérvalo un minuto. Se distribuye y esteriliza en autoclave de 116 a 121°C (12-15 libras de presión) durante ~~no~~ más de 15 minutos. Enfríe a 45 ó 50°C, y si lo desea, añada sangre.

AGAR PROTEOSA No. 3

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Proteosa peptona No. 3	20
Dextrosa	0.5
Cloruro de sodio	5
Fosfato disódico	5
Agar	15
pH final 7.3+	

Preparación: Suspender 45 gramos del medio en un litro de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente -- hasta disolver completamente. Distribuir en tubos o matraces y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C (15 libras de presión).

AGAR DE SOYA TRIPTICASEINA

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Peptona de caseína	15
Peptona de soya	5
Cloruro de sodio	5
Agar	15
pH final	7.3 ± 0.1

Preparación: Suspender y remojar de 10 a 15 minutos, 40 gramos del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente durante un minuto para que se disuelva. Esterilizar en autoclave - - - entre 118 y 121°C a una presión no mayor de 15 libras -- por 15 minutos. En caso de preparar grandes volúmenes - aumentar el tiempo de esterilización pero no la presión ni la temperatura. Enfriar y vaciar en placas de Petri. Si se preparan placas de agar sangre para estudios de hemólisis, agregar de 5 a 10% de sangre de conejo o de carnero preferiblemente de esta última.

BASE DE AGAR COLUMBIA

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Peptona Polypeptone	10
Peptona Biosate	10
Peptona Myosate	3
Almidón de maíz	1
Cloruro de sodio	5
Agar	13.5
pH final 7.3 ±	

Preparación: Haga una suspensión con 42.5 gramos del material en un litro de agua destilada caliente, agitando frecuentemente y hierva un minuto. Distribuya y esterilice en autoclave a 121°C (15 libras de presión) -- durante 15 minutos.

BASE DE AGAR GC

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Peptona Polypeptona	15
Almidón de maíz	1
Fosfato dipotásico	4
Fosfato monopotásico	1
Cloruro de sodio	5
Agar	10
pH final 7.2 ±	

Preparación: Suspender 7.2 gramos del medio deshidratado en 100 ml. de agua destilada para obtener una base de doble concentración. Mezclar y dejar reposar 5 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir un minuto aproximadamente. Esterilizar en autoclave a 125°C (15 libras - de presión) durante 15 minutos. Esterilizar también en autoclave 100 ml. de una solución de hemoglobina al 2%, - añadiendo gradualmente agua a 2 gramos de hemoglobina --- seca, antes de exponerla al calor de la autoclave. Enfriar ambas soluciones a 50°C. Añadir la hemoglobina y los otros complementos de la base, según se desee y viértase en la placa.

EUGONAGAR

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Peptona Trypticase	15
Peptona Phytone	5
Cloruro de sodio	4
Sulfito de sodio	0.2
L-cistina	0.7
Dextrosa	5.5
Agar	15
pH final 7.0 ±	

Preparación: Se suspenden 45.4 gramos del material seco en un litro de agua destilada. Mezclar bien. Calentar-agitando frecuentemente y hervir un minuto. Distribuir y esterilizar en autoclave a 118°C (12 libras de presión) durante 15 minutos. Enfriar a 45°C y agregar de 5 a 10% de sangre desfibrinada estéril si así se desea. Para la mayor parte de los cultivos se puede emplear sangre de conejo, oveja o caballo. La sangre humana proveniente de banco no se debe emplear por su contenido en citrato.

MEDIO DE DIENST

Fórmula del medio base en gramos por litro de agua destilada:

Peptona	10
Tryptone	3
Dextrosa	3
Sales minerales comerciales	2
Agar	1.2
pH 7.3	

Preparación: La yema de huevos frescos se remueve asépticamente y se hace dilución de la misma con un volumen igual de solución salina estéril (0.85% de NaCl), esto se mezcla en proporciones iguales con el medio base previamente esterilizado y enfriado.

MEDIO DE DULANEY

Preparación: Remover asépticamente las yemas de huevos embrionados de gallina con 5 a 8 días de incubación y - colocarlas en un matraz que contenga un volumen igual - de solución de Locke estéril. Homogeneizar y colocar - el homogenado en tubos de ensayo en posición inclinada; coagular el contenido con vapor a 80°C durante 15 minutos. Finalmente, inocular el material proveniente de - la lesión y adicionar solución de Locke hasta cubrir -- 3/4 partes del plano inclinado. Incubar en posición -- vertical durante 48 a 72 horas a 37°C.

SOLUCION DE LOCKE

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Cloruro de sodio	9
Cloruro de calcio	0.24
Cloruro de potasio	0.42
Carbonato de sodio	0.2
Dextrosa	2.5

MEDIO DE GOLDBERG

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Hidrolizado de lactoalbúmina o Phytone	20
Cloruro de sodio	2.5
Fosfato dipotásico	1.5
Tioglicolato de sodio	0.6
L-cistina	0.4

Preparación: Los componentes se adicionan a un litro de agua destilada. Calentar hasta que se disuelvan completamente. Enfriar y ajustar el pH a 7.2. Colocar en tubos con tapón de rosca. Esterilizar a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

TINCION DE GIEMSA

Colorante de Giemsa:

Azur-eosina-azul de metileno según Giemsa	0.76 g.
Glicerina bidestilada	50 ml.
Metanol R.A.	50 ml.

Se adiciona el colorante a la glicerina y se calienta -- durante 3 horas en baño Marfa a 60°C; en seguida, adicion ar el metanol. La solución se deja en reposo durante 5 días y por último, se filtra.

Giemsa diluido:

Solución de Giemsa	30 ml.
Amortiguador de fosfatos pH 7.2	1,000 ml.

La extensión se fija durante 5 minutos con metanol. Se deja secar y se tiñe durante 20-30 minutos con una solución de Giemsa diluida en amortiguador de fosfatos pH -- 7.2. Lavar la extensión con amortiguador de fosfatos -- pH 7.2. Secar al aire en posición vertical.

TINCION DE UNNA-PAPPENHEIM

Colorante de May-Grünwald:

Eosina-azul de metileno según May-Grünwald 0.25 g.
Metanol R.A. 100 ml.

Se disuelve el colorante calentando ligeramente a 60°C en baño María. Una vez frío se filtra.

La extensión se fija durante 3 minutos con solución de May-Grünwald y, después de añadir una cantidad igual - de amortiguador de fosfatos pH 7.2, se tinte durante un minuto. Se vierte (sin lavar) la solución colorante y se añade la solución de Giemsa diluida. Teñir durante 15 minutos. Finalmente, lavar con amortiguador de fosfatos pH 7.2.

TINCION DE WRIGHT

Colorante de Wright:

Eosina-azul de metileno según Wright	0.24 g.
Glicerina	3 ml.
Metanol R.A.	97 ml.

Se disuelve el colorante en un poco de metanol y se agrega la glicerina y lo que resta de metanol. Se agita --- durante una hora, después se filtra.

La extensión se cubre con la solución de Wright, se tife de 3 a 5 minutos, pasado este tiempo se añade amortiguador de fosfatos pH 7.2, se forma una superficie de brillo metálico. A los 5-7 minutos se lava con agua y se seca al aire.

Amortiguador de fosfatos pH 7.2:

Fosfato dibásico de sodio	1.14 g.
Fosfato monobásico de potasio	0.49 g.
Agua destilada	1,000 ml.

TINCION DE SELLER

Solución de azul de metileno:

Azul de metileno	1 g.
Metanol R. A.	100 ml.

Solución de fucsina básica:

Fucsina básica	1 g.
Metanol R.A.	100 ml.

Colorante de Seller:

Mezclar dos partes de solución de azul de metileno con una parte de solución de fucsina básica.

Tañir el frotis con el colorante de Seller, enjuagar - inmediatamente en agua corriente. Secar sin absorber - y examinar.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Adler, M.W. "ABC of sexually transmitted diseases. Genital skin and other conditions". Br Med J 288: 383-385 - (1984).
2. Ajello, G.W., Deacon, W.E., Paul, L., et.al. "Nutritional studies of a virulent strain of Haemophilus ducreyi". J Bacteriol 72: 802-808 (1956).
3. Albritton, W.L. "Infection due to Haemophilus species -- than Haemophilus influenzae". Ann Rev Microbiol 36: 199-216 (1982).
4. Albritton, W.L., Brunton, J.L., Slaney, L., et.al. - - - "Plasmid mediated sulfonamide resistance in Haemophilus ducreyi". Antimicrob Agents Chemother 21: 159-165 (1982)
5. Albritton, W.L., Maclean, I.W., Slaney, L., et.al. - - - "Plasmid mediated tetracycline resistance in Haemophilus ducreyi". Antimicrob Agents Chemother 25: 187-190 (1984)
6. Anderson, K. "The cultivation from granuloma inguinale - of microorganism having the characteristics of Donovan - bodies in the yolk sac of chick embryos". Science 97: - 560-561 (1943).
7. Anderson, B., Albritton, W.L., Biddle, J., et.al. "Common β -lactamase specifying plasmid in Haemophilus ducreyi -

- and Neisseria gonorrhoeae". Antimicrob Agents Chemother - 25: 296-297 (1984).
8. Artman, M., Frankl, G. "Nicotinamide adenine dinucleotide and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate splitting enzyme(s) of sheep and rabbit erythrocytes: their effect on the growth of Haemophilus". Can J. Microbiol 28: 696 - 702 (1982).
9. Asin, J. "Chancroid. Report of 1402 cases". Am J Syph Gon Ven Dis 36: 483-487 (1952).
10. Barile, M.F., Blumbert, J.M., Kraul, C.W., et.al. "Penile lesions among US armed forces personnel in Japan". Arch Dermatol 86: 273-281 (1962).
11. Beeson, P.B. "Studies on chancroid. The Ducrey bacillus - growth requirements and inhibition by antibiotics agents". Proc Soc Biol Med 61: 81-85 (1946).
12. Bilgeri, Y.R., Ballard, R.C., Duncan, M.O., et.al. - - - "Antimicrobial susceptibility of 103 strains of Haemophilus ducreyi isolated in Johannesburg". Antimicrob Agents --- Chemother 22: 686-688 (1982).
13. Blackmore, C.A., Limpakarmjanarat, K., Rigau-Pérez, J.G., et.al. "An outbreak of chancroid in Orange County, - - - California: descriptive epidemiology and disease control-measures". J Infect Dis 151: 840-844 (1985).

14. Borchardt, K.A., Hoke, A.W. "Simplified laboratory - - - technique for diagnosis of chancroid". Arch Dermatol 102: 188-192 (1970).
15. Braude, A.I. "Enfermedades infecciosas". Panamericana. - Buenos Aires (1984).
16. Brown, W.J. "El control de las enfermedades venéreas en - Estados Unidos de América" Salud Pública de México I: 55-58 (1968).
17. Brunton, J., Bennett, P., Grinsted, J. "Molecular nature of a plasmid specifying beta-lactamase production in - - - Haemophilus ducreyi". J Bacteriol 148: 788-791 (1981).
18. Brunton, J.L., Maclean, I., Ronald, A.R., et.al. "Plasmid mediated ampicillin resistance in Haemophilus ducreyi". - Antimicrob Agents Chemother 15: 294-299 (1979).
19. Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. "Bergey's manual of - - - determinative bacteriology" 8th ed. The Williams & Wilkins Co. Baltimore (1974).
20. Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. "Bergey's manual of - - - systematic bacteriology". The Williams & Wilkins Co. -- Baltimore (1984).
21. Callin, A.E. "Las repercusiones económicas de las enferme - dades venéreas". Boletín de la Oficina Sanitaria Paname-

- ricana LXX; 95-100 (1971).
22. Campos, S. "Situación actual del control de las enfermedades venéreas en México". El Médico, diciembre (1965).
 23. Chapel, T., Brown, W.J., Jeffries, C., et.al. "The ---- microbiological flora of penile ulcerations". J Infect - Dis 137: 50-56 (1978).
 24. Cherny, W.B., Jones, C.P., Peete, C.H., et.al. "Disseminated granuloma inguinale and its relationship to granuloma of the cervix and pregnancy". Am J Obste Gynecol 74: 597-605 (1957).
 25. Coovadia, Y.M., Steinberg, J.L., Kharsany, A. "Granuloma inguinale (donovanosis) of the oral cavity". S Afr Med J 68: 815-817 (1985).
 26. Daly, J.A. "Haemophilus ducreyi". Infect Control 6: 203-205 (1985).
 27. Davies, C.M. "Granuloma inguinale. A clinical, histological and ultrastructural study". JAMA 211: 632-636 (1970).
 28. Davies, C.M., Collins, C. "Granuloma inguinale: an - - - ultrastructural study of Calymmatobacterium granulomatis". J Invest Dermatol 53: 315-321 (1969).
 29. de Beer, A.L. "Citologic identification of Donovan bodies in granuloma inguinale". Acta Cytol 28: 126-128 (1984).

30. Deneer, H.G., Slaney, L., Maclean, I.W., et.al. "Mobilization of nonconjugative antibiotic resistance plasmids in Haemophilus ducreyi". J Bacteriol 149: 726-732 (1982).
31. Denys, G.A., Chapel, T.A., Jeffries, C.D. "An indirect -- fluorescent antibody technique for Haemophilus ducreyi". Health Lab Science 15: 128-132 (1978).
32. Dienst, R.B. "Laboratory diagnosis of granuloma inguinale and studies on the cultivation of the Donovan bodies". -- Am J Syph Gon Ven Dis 32: 301-306 (1948).
33. Dienst, R.B. "Virulence and antigenicity of Haemophilus ducreyi". Am J Syph Gon Ven Dis 32: 289-291 (1948).
34. Dienst, R.B., Reinstein, C.R., Kupperman, H.S., et.al. -- "Studies on the casual agent of granuloma inguinale". Am J Syph Gon Ven Dis 31: 614-618 (1947).
35. Dodson, R.F., Fritz, G.S., Winthrope, R.H., et.al. - - - "Donovanosis: a morphologic study". J Invest Dermatol 62: 611-614 (1974).
36. Eriquez, L.A., Hodinka, N.E. "Development of a test - - - system for rapid differentiation of Neisseria and Haemophilus spp.". J Clin Microbiol 18: 1032-1039 (1983).
37. Evans, N.M., Smith, D.D. "The effect of the medium and - source of growth factors an the satellitism test for - -

- Haemophilus species". J Med Microbiol 5: 509-513 (1972)
38. Fast, M.V., Nsanze, H., D'Costa, L.J., et.al. "Treatment of chancroid by clavulanic acid with amoxycillin in --- patient with β -lactamase positive Haemophilus ducreyi -- infection". Lancet 2: 509-511 (1982).
 39. Fitzpatrick, J.E., Tyler, H., Gramstad, N.D. "Treatment of chancroid". JAMA 246: 1804-1805 (1981).
 40. Flores, L.A., Bengio, R., Remondino, C.A., et.al. "Reaparición del chancro blando en Córdoba". Rev Fac Cien Med Córdoba XXX: 341-350 (1972).
 41. Freinkel, A.L., Counihan, R.J. "Granuloma inguinale --- (Donovanosis) in South Africa". S Afr Med J 63: 599-601 (1983).
 42. Fritz, G.S., Hubler, W.R., Dodoson, R.F., et.al. "Mutilating granuloma inguinale". Arch Dermatol 11: 1464-1465 (1975).
 43. Gaisin, A., Heaton, C.L. "Chancroid: alias the soft --- chancre". Int J Dermatol 14: 188-197 (1975).
 44. Garcfa, J.C. "Aspectos psicológicos, sociales y culturales de las enfermedades venéreas". Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana LXX: 79-91 (1971).
 45. Gardner, E.J. "Principios de genética". 5a. Edición. --- Limusa. México (1982).

46. Girouard, Y.C., Maclean, I.W., Ronald, A.R., et.al. ---
"Synergistic anti-bacterial activity of clavulanic acid
and amoxycillin against beta-lactamase producing strains
of Haemophilus ducreyi". Antimicrob Agents Chemother --
20: 144-145 (1981).
47. Goldberg, J. "Studies on granuloma inguinale. IV. Growth
requeriments of Donovania granulomatis and its relation-
ship to the natural habitat of the organism". Brit J --
Vener Dis 25: 266-268 (1959).
48. Goldberg, J. "Studies on granuloma inguinale. V. Isolation
of a bacterium resembling Donovania granulomatis from --
the faeces of a patient with granuloma inguinale". Brit J
Vener Dis 38: 99-102 (1962).
49. Goldberg, J. "Studies on granuloma inguinale. VII. Some
epidemiological considerations of the disease". Brit J -
Vener Dis 40: 140-145 (1964).
50. Goldberg, J., Annamunthodo, H. "Studies on granuloma ---
inguinale. VIII. Serological reactivity of sera from --
patients with carcinoma of penis when tested with ---
Donovania antigens". Brit J Vener Dis 42: 205-209 (1966)
51. Goldberg, J., Bernstein, R. "Studies on granuloma - - -
inguinale. VI. Two cases of perianal granuloma inguinale
in male homosexuals". Brit J Vener Dis 40: 137-139 (1964)

52. Goldberg, J., Weaver, R.H., Packer, H. "Studies on --- granuloma inguinale. I. Bacteriologic behavior of --- Donovania granulomatis". Am J Syph Gon Ven Dis 37: 60-70 (1953).
53. Goldberg, J., Weaver, R.H., Packer, H., et.al. "Studies on granuloma inguinale. II. The complement fixation test in the diagnosis of granuloma inguinale". Am J Syph Gon Ven Dis 37: 71-76 (1953).
54. Goldsmith, M.F. "Sexually transmitted diseases may --- reverse the revolution". JAMA 255: 1665-1667 y 1672 -- (1986).
55. González, G. "Aspectos socioculturales de la transmisión de las enfermedades venéreas". La Prensa Médica Mexicana XLII No. 11 (1977).
56. Greenblatt, R.B., Dienst, R.B., Baldwin, K.R., - - - - - "Lymphogranuloma venereum and granuloma inguinale". Med Clin North Am 43: 1493-1506 (1959).
57. Greenblatt, R.B., Dienst, R.B., Pund, E.R., et.al. - - - "Experimental and clinical granuloma inguinale". JAMA - 113: 1109-1116 (1939).
58. Greenwald, E. "Chancroidal infection". JAMA 121: 9-11 (1943).

59. Grimes, D.A. "Deaths due to sexually transmitted - - - diseases". JAMA 255: 1727-1729 (1986).
60. Growdon, W.A., Lebherz, T.B., Moore, J.G., et.al. - - - - "Granuloma inguinale in a white teenager-a diagnosis --- easily forgotten, poorly pursued". West J Med 143: 105-108 (1985).
61. Hafiz, S., Kinghorn, G.R., Mc Entegart, M.G. "Starch -- aggregation as presumptive test for Haemophilus ducreyi". Lancet 2: 872 (1982).
62. Hammond, G.W., Lian, C.J., Wilt, J.C., et.al. "Antimicrobial susceptibility of Haemophilus ducreyi", Antimicrob Agents Chemother 13: 608-612 (1978).
63. Hammond, G.W., Lian, C.J., Wilt, J.C., et.al. "Comparision - of specimen collection and laboratory techniques for --- isolation of Haemophilus ducreyi". J Clin Microbiol 7: 39-43 (1978).
64. Hammond, G.W., Lian, C.J., Wilt, J.C., et.al. "Determination of the hemin requirement of Haemophilus ducreyi: evaluation of the porphyrin test and media used in the satellite --- growth test". J Clin Microbiol 7: 243-246 (1978).
65. Hammond, G.W., Slutchuck, M., Scatliff, J., et.al. --- "Epidemiologic, clinical, laboratory and therapeutic --- features of an urban outbreak of chancroid in North ----

- America". Rev Infect Dis 2: 867-879 (1980).
66. Handsfield, H.H., Totten, P.A., Fennel, C.L., et.al. --
"Molecular epidemiology of Haemophilus ducreyi infections"
Ann Intern Med 95: 315-318 (1981).
67. Hannah, P., Greenwood, J.R. "Isolation and rapid - - -
identification of Haemophilus ducreyi". J Clin Microbiol
16: 861-864 (1982).
68. Hansen, E.J., Loftus, T.A. "Monoclonal antibodies reactive
with all strains of Haemophilus ducreyi". Infect Immun --
44: 196-198 (1984).
69. Heyman, A., Beeson, P.B., Sheldon, W.H. "Diagnosis of --
chancroid". JAMA 129: 935-938 (1945).
70. Joklik, W.K., Willet, H.P., Amos, D.B. "Microbiologfa de
Zinsser". 17a. Edici6n. Panamericana. Buenos Aires. - -
(1982).
71. J6rgensen, J., Menn6, T. "Herpes simplex infection - - -
simulating a positive auto-inoculacion for Haemophilus -
ducreyi". Acta Derm Venereol 5: 459-460 (1982).
72. Khan, M.E., Smith, H.O. "Transformation in Haemophilus-
a problem in membrane biology". J Memb Biol 81: 89-103
(1984).
73. Kalstone, B.M., Howell, J.A., Cline, F.X. "Granuloma ---

- inguinale with hematogenous dissemination to the spine".
JAMA 176: 530-532 (1961).
74. Kerber, R.E., Rowe, C.H., Gilbert, K.R. "Treatment of -
chancroid". Arch Dermatol 100: 604-607 (1969).
75. Kerdel-Vegas, F., Convit, J., Soto, J.M. "Treatment of
granuloma inguinale with triacetyloleandomycin". Arch -
Dermatol 84: 116-123 (1965).
76. Kilian, M. "Taxonomic study of the genus Haemophilus --
with the proposal of a new species". J Gen Microbiol 93:
9-62 (1976).
77. Kilian, M., Theilade, C. "Cell wall ultrastructure of --
strains of Haemophilus ducreyi and Haemophilus piscium".
Int J Syst Bacteriol 25: 351-356 (1975).
78. Kinghorn, G.R., Hafiz, S., Mc Entegart, M.G. "Oropharyngeal
Haemophilus ducreyi infection". Br Med J 287: 650 (1983)
79. Kinghorn, G.R., Hafiz, S., Mc Entegart, M.G. "Modified -
haemin-containing medium for isolation of Haemophilus --
ducreyi". Lancet 1: 393-394 (1982).
80. Kinghorn, G.R., Hafiz, S. "Sheffield isolates are - - -
Haemophilus ducreyi". Lancet 2: 1079 (1983).
81. Kingsley, H.J. "A case of granuloma inguinale (Donovanosis)"
Central Afr J Med 13: 145-146 (1967).

82. Kornblith, B.A., Jacoby, A., Chargin, L. "Chancroid". --
JAMA 117: 2150-2153 (1941).
83. Kraus, S.J., Kaufman, H.W., Albritton, W.L., et.al. ---
"Chancroid therapy. A review of cases confirmed by - - -
culture". Rev Infect Dis 4: S848-S856 (1982).
84. Kraus, S.J., Werman, B.S., Biddle, J.W. et.al. - - -
"Pseudogranuloma inguinale caused by Haemophilus ducreyi"
Arch Dermatol 118: 494-497 (1982).
85. Kuberski, T., Papadimitriou, J.M., Phillips, P. - - - -
"Ultrastructure of Calymmatobacterium granulomatis in --
lesions of granuloma inguinale". J Infect Dis 142: 744-
749 (1980).
86. Latif, A.S., Lencioni, R., Crocchiolo, P., et.al. "Single-
dose thiamphenicol for chancroid". Lancet 2: 1225 (1982)
87. Leads from the MMWR. "Chancroid Massachusetts". JAMA -
255: 1673-1674 (1986).
88. Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J., et.al. "Micro
biología clínica". 3a. Edición. Panamericana. Buenos --
Aires (1982).
89. Lundquist, C.D. "A mixed infection of syphilis and - - -
chancroid". J Am Acad Dermatol 10: 354-356 (1984).
90. Lykke-Olesen, L., Larsen, L., Pedersen, T.G., et.al. ---

- "Epidemic of chancroid in Greenland 1977-78". *Lancet* 1: 654-655 (1979).
91. Llopis, A. "Enfermedades venéreas en las Américas". ---
Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana LXX: 44-56
(1971).
92. Mac Lean, I.W., Bowden, G.H., Albritton, W.L. "TEM-type β -lactamase production in Haemophilus ducreyi" *Antimicrob Agents Chemother* 17: 897-900 (1980).
93. Mallard, R.H., Macaulay, M.E., Riordan, T., et.al. ---
"Haemophilus ducreyi infection in Manchester". *Lancet* 2:
283 (1983).
94. Marmar, J.L. "The management of resistant chancroid in Vietnam". *J Urol* 107: 807-808 (1972).
95. Marshall, B., Roberts, M., Smith, A., et.al. "Homogeneity of transferable tetracycline-resistance determinants in Haemophilus species". *J Infect Dis* 149: 1028-1029 (1984)
96. Mauff, A.C., Ballard, R.C., Bilgery, Y.R., et.al. ---
"Isolation of Haemophilus ducreyi from genital ulcerations in white men in Johannesburg". *S Afr Med* 63: 236-237 --
(1983).
97. Mc Entegart, M.G., Hafiz, S., Kinghorn, G.R. "Haemophilus ducreyi infections-time for reappraisal". *J Hug* 89: --
467-478 (1982).

98. Mc Nicol, P.J., Albritton, W., Ronald, A.R. "Characterization of ampicillin resistance plasmids of Haemophilus ducreyi - and Neisseria gonorrhoeae with regard to location of --- origin of transfer and mobilization by conjugative plasmid of Haemophilus ducreyi". J Bacteriol 156: 437-440 (1983)
99. Mc Nicol, P.J., Albritton, W.L., Ronald, A.R. "Origin and direction of in vitro replication of Haemophilus ducreyi and Neisseria gonorrhoeae ampicillin resistance plasmids". J Bacteriol 158: 393-395 (1984).
100. Mensing, H. "Treatment of chancroid with enoxacin". Acta Derm Venereol 65: 455-457 (1985).
101. Nayyar, K.C., Stoltz, E., Michel, M.F. "Rising incidence of chancroid in Rotterdam". Br J Vener Dis 55: 439-441 (1979).
102. Nobre, G.N. "Identification of Haemophilus ducreyi in the clinical laboratory". J Med Microbiol 15: 243-245 (1982)
103. Nobre, G.N. "Identifying Haemophilus ducreyi". Lancet 2: 1043 (1982).
104. Oberhofer, T.R., Back, A.E. "Isolation and cultivation - of Haemophilus ducreyi". J Clin Microbiol 15: 625-629 (1982).
105. Odumeru, J.A., Ronald, A.R., Albritton, W.L. "Characterization

- of cell proteins of Haemophilus ducreyi by polyacrylamide - gel electrophoresis". J Infect Dis 148: 710-714 (1983).
106. Odumeru, J.A., Wiserman, G.M., Roland, A.R. "Role of -- lipopolysaccharide and complement in susceptibility of - Haemophilus ducreyi to human serum". Infect Immun 50: - 495-499 (1985).
107. Odumeru, J.A., Wiserman, G.M., Ronald, A.R. "Virulence - factors of Haemophilus ducreyi". Infect Immun 43: 607-611 (1984).
108. Packer, H., Turner, H.B., Dulaney, A.D. "Granuloma --- inguinale of the vagina and cervix uteri with bone - - - metastases". JAMA 163: 327-329 (1948).
109. Paggi, L.C., Hull, E. "Metastatic granuloma venereum; report of a case". Ann Intern Med 20: 686-695 (1944).
110. Piot, P., Sloomans, L., Nsanze, H. "Isolating Haemophilus ducreyi". Lancet 2: 909-910 (1983).
111. Plummer, F.A., D'Costa, L.J., Nsanze, H., et.al. --- "Antimicrobial therapy of chancroid: effectiveness of -- erythromycin". J Infect Dis 148: 726-731 (1983).
112. Plummer, F.A., D'Costa, L.J., Nsanze, H., et.al. --- "Epidemiology of chancroid and Haemophilus ducreyi in -- Nairobi Kenya". Lancet 2: 1293-1295 (1983).

113. Plummer, F.A., Nsanze, H., D'Costa, L.J., et.al. ---
"Short course and single dose antimicrobial therapy for-
chancroid in Kenya: studies with rifampin alone and in -
combination with trimethoprim". Rev Infect Dis 5: S565-
S572 (1983).
114. Plummer, F.A., Nsanze, H., D'Costa, L.J., et.al. ---
"Single-dose therapy of chancroid with trimethoprim- ---
sulfametrole". N Engl J Med 309: 67-76 (1983).
115. Prussia, P.R. "Calymmatobacterium granulomatis". Am J -
Clin Pathol 82: 509 (1984).
116. Rajan, V.S., Sng, E.H. "Streptomycin-resistant Haemophilus
ducreyi". Lancet 2: 1043 (1982).
117. Reymann, F. "Specificity of skin test in lymphogranuloma
venereum and chancroid". Acta Derm Venereol 31: 57 (1951)
118. Richens, J. "Donovanosis-a review". Papua New Guinea Med
J 28: 67-74 (1985).
119. Robinson, H.M. "The treatment of granuloma inguinale ---
lymphogranuloma venereum, chancroid and gonorrhoea". Arch
Dermatol 64: 284-393 (1951).
120. Robinson, H.M., Cohen, M.M. "Treatment of granuloma --
inguinale with erythromycin". J Invest Dermatol 20: 407-
409 (1953).

121. Ronald, A.R. "Chancroid. Recent advances in treatment and control". Int J Dermatol 25: 31-33 (1986).
122. Ronald, A.R., Plummer, F.A. "Chancroid and Haemophilus - ducreyi". Ann Intern Med 102: 705-707 (1985).
123. Salzman, R.S., Kraus, S.J., Miller, R.G., et.al. --- "Chancroidal ulcers that are not chancroid". Arch Dermatol 120: 636-639 (1984).
124. Satulsky, E.M. "Management of chancroid in a tropical -- theater". JAMA 127: 259-262 (1945).
125. Schalla, W.O., Sanders, L.L., Schmid, G.P., et.al. -- "Use of dot-immunobinding and immunofluorescence assays- to investigate clinically suspected cases of chancroid". J Infect Dis 153: 879-887 (1986).
126. Schmid, G.P. "The treatment of chancroid". JAMA 255: -- 1757-1762 (1986).
127. Schwarz, R.H. "Chancroid and granuloma inguinale". Clin - Obstet Gynecol 26: 138-142 (1983).
128. Sehgal, V.N. "Donovanosis. Current concepts". Int J --- Dermatol 25: 8-16 (1986).
129. Sehgal, V.N., Shyamprasad, A.L., Beohar, P.C. "The -- histopathological diagnosis of donovanosis". Br J Vener Dis 60: 45-47 (1984).

130. Sengupta, S.K., Das, N. "Donovanosis affecting cervix, uterus and adnexae". *Am J trop Med Hyg* 33: 632-636 (1984)
131. Shafer, W.M., Joiner, K., Guymon, L.F., et.al. "Serum sensitivity of Neisseria gonorrhoeae: the role of - - - lipopolysaccharide". *J Infect Dis* 149: 175-183 (1984).
132. Sieber, P.E. "Granuloma inguinale with bone involment". *Am J Roetgenol* 95: 515-517 (1965).
133. Slooman, L., Vanden Berghe, D.A., Van Dyck, E., et.al. "Susceptibility of 40 Haemophilus ducreyi stains to 34 - antimicrobial products". *Antimicrob Agents Chemother* 24: 564-567 (1983).
134. Sng, E.H., Lim, A.L., Rajan, V.S., et.al. "Characteristics of Haemophilus ducreyi". *Br J Vener Dis* 58: 239-242 (1982)
135. Sobel, N., Canizares, O. "Genital lesions, venereal and nonvenereal". *Med Clin North Amer* 43: 937-939 (1959).
136. Sottnek, F.O., Biddle, J.W., Kraus, S.J., et.al. --- "Isolation and identification of Haemophilus ducreyi in a clinical study". *J Clinic Microbiol* 12: 170-174 (1980).
137. Sprott, M.S., Pattman, R.S., Richardson, I.R., et.al. "Haemophilus ducreyi and genital ulcers" *Lancet* 2: 1302-1303 (1983).

138. Stone, K.M., Grimes, D.A., Magder, L.S. "Primary prevention of sexually transmitted diseases". JAMA 255: 1763-1766 - (1986).
139. Sturm, A.W., Zanen, H.C. "Characteristics of Haemophilus ducreyi in culture". J Clin Microbiol 19: 672-674 (1984)
140. Sturm, A.W., Zanen, H.C. "Drug of choice for chancroid". Lancet 1: 125 (1982).
141. Sutton, A., Schneerson, R., Morris, S.K., et.al. - - - "Differential complement resistance mediates virulence - of Haemophilus influenzae type b". Infect Immun 35: 95--104 (1982).
142. Taylor, D.N., Pitarangasi, C., Echeverria, P., et.al. "Comparative study of ceftriaxone and trimethoprim- --- sulfamethoxazole for the treatment of chancroid in - - - Thailand". J Infect Dis 152: 1002-1006 (1985).
143. Tello, E.E., Chappuis, E.J., Martínez, R. "Los bubonú los del chancro blando". Rev Fac Cienc Med Córdoba XXX: 351-353 (1972).
144. Thayer, J.D., Field, F.W., Perry, M.I. "In vitro --- sensitivity of Haemophilus ducreyi to several antibiotics" Antibiot Chemother 5: 132-134 (1955).
145. Thew, M.A., Swift, J.M., heaton, C.L. "Ampicillin in

- the treatment of granuloma inguinale". JAMA 210: 866-867 (1969).
146. Thomson, J.A., Bilgeri, Y.R. "Plasmid-coded ampicillin - resistance in Haemophilus ducreyi". Antimicrob Agents -- Chemother 22: 689-692 (1982).
147. Torre, E. "Enfermedades venéreas en adolescentes". Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana LXXI: 558-562 - (1972).
148. Totten, P.A., Hansfield, H.H., Peters, P., et.al. - - - "Characterization of ampicillin resistance plasmids from Haemophilus ducreyi". Antimicrob Agents Chemother 21: - 622-627 (1982).
149. Verdich, J. "Haemophilus ducreyi infection resembling -- granuloma inguinale". Acta Derm Venereol 64: 452-455 -- (1984).
150. Vigil, L. "Diagnóstico y tratamiento del chancro blando -- por suspensiones del bacilo de Ducrey aislado en México". Boletín de Salubridad e Higiene 69-80 (1938).
151. Vilchis, V. "El problema de las enfermedades venéreas en México". Gaceta Médica de México 112: 3 (1976).
152. Webster, D.R., Paton, D.M. "Therapy of chancroid with -- trimethoprim-sulfamethoxazole". N Engl J Med 309: 1652 (1983)

153. Werman, B.S., Herkowitz, L.J., Olansky, S., et.al. "A - clinical variant of chancroid resembling granuloma -- inguinale". Arch Derm 119: 890-894 (1983).
154. Wistrand, R., Wegerhoff, F., "Granuloma inguinale in the eastern Transvaal". S Afr Med J 67: 13-15 (1985).
155. Woolfrey, B.F., Lally, R.T., Ireland, G.K., et.al. -- "Antimicrobial resistance in Haemophilus isolates: a --- Minnesota experience and literature review". Am J Clin Pathol 82: 311-318 (1984).