

870127
28
24

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

EFFECTO DE LA AZIDA DE SODIO EN EL PRIMOAISLAMIENTO
De *Gardnerella vaginalis* A PARTIR DE 100 MUESTRAS
DE EXUDADO VAGINAL.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
LEONOR ELIZABET SANCHEZ ARAMBURO

Asesor: Q.F.B. María del Socorro Pulido García
GUADALAJARA, JALISCO 1986



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.

INDICE

Páginas

1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Justificación y objetivo del trabajo.....	2
2. GENERALIDADES.....	5
2.1. Aspectos históricos.....	6
2.2. Taxonomía de <u>Gardnerella vaginalis</u>	7
2.3. Aspectos microbiológicos de <u>G.vaginalis</u>	10
2.3.1. Caracteres morfológicos y coloniales.....	10
2.3.2. Requerimientos de cultivo.....	12
2.3.3. Características bioquímicas.....	12
2.3.4. Producción de hemólisis.....	14
2.3.5. Características antigénicas.....	15
2.4. Aspectos clínicos y epidemiológicos de vaginitis.....	16
2.4.1. Fisiología ecología de la vagina.....	16
2.4.2. Manifestaciones clínicas de vaginitis....	17
2.4.3. Vaginitis per <u>G.vaginalis</u>	18
2.4.4. Patogenicidad de <u>G.vaginalis</u>	20
3. MATERIAL Y METODO.....	23
3.1. Procedencia de las muestras.....	24
3.2. Metodología Microbiológico.....	24
3.2.1. Toma de muestras.....	24
3.2.2. Microscopía.....	25
3.2.3. Inoculación y estriación.....	25
3.2.4. Primoaislamiento.....	26
3.2.5. Identificación bioquímica.....	29
3.2.6. Plan de Trabajo.....	31

4. RESULTADOS.....	32
5. CONCLUSIONES.....	43
6. BIBLIOGRAFIA.....	48

1. INTRODUCCION .

1.1. Justificación y objetivo del trabajo.

A pesar de que la vaginitis es una de las enfermedades ginecológicas más comunes, las causas fueron por mucho tiempo desconocidas no pudiendo ser atribuidas a ninguno de los agentes etiológicos probados, llamada por ésto, "vaginitis no específica" (19).

En 1953, Leopold observó que un organismo tipo Haemophilus se encontraba presente en casos de vaginitis, posteriormente, en 1955, Gardner y Duker recuperaron este organismo de la mayor parte de casos de vaginitis, llamándolo Haemophilus vaginalis; desde entonces se tiene conocimiento de la frecuente presencia de este organismo en vaginitis bacteriana y otros desórdenes ginecológicos (24).

La significancia del aislamiento de este organismo de el tracto genital inferior, ha sido controversial porque se encuentra frecuentemente, que en mujeres asintómicamente se obtienen cultivos positivos para Gardnerella vaginalis (27), por otro lado, se acepta la evidencia de que este organismo está relacionado con casos de vaginitis, además de que se ha transmitido la infección por la inoculación de voluntarios con descarga vaginal de mujeres infectadas (4) por ésto, mucha gente duda de su patogenicidad y ha sido considerada parte de la flora vaginal normal (24).

Otro tema de controversia ha sido la clasificación --

taxonómica de este organismo, siendo primero llamado Haemophilus vaginalis, pero debido a que no requiere para su -- crecimiento los factores X y V, se colocó en el género Corynebacterium, con el nombre de Corynebacterium vaginale ; a su vez se observó que era un organismo gram negativo. Durante mucho tiempo estos nombres continuaron usándose a pesar de ser inadecuados, hasta hace algunos años en que -- Greenwood y Pickett propusieron la creación de un nuevo género, Gardnerella, llamándole, Gardnerella vaginalis (12), y éste es el nombre que más aceptación y reconocimiento taxonómico tiene y el que será usado en el presente estudio.

Se han probado numerosos medios de cultivo para el -- aislamiento de este organismo, siendo el más utilizado y -- más efectivo el medio preparado con base Agar Columbia más 5% de sangre humana y como inhibidores los antibióticos colimicina y ácido nalidixico para evitar el crecimiento de flora entérica y su interferencia en el primocultivo.

Sin embargo, surgió el problema de que la colimicina -- está en proceso de discontinuación por parte de los laboratorios farmacéuticos fabricantes. Por otro lado la medicación así como la preparación de este medio de cultivo en el laboratorio de diagnóstico resulta laborioso y meticuloso -- con posibilidades importantes de fallas en su preparación.

El presente estudio se propone en un esfuerzo, mediante una meticulosa evaluación, la utilización de un ---

inhibidor al alcance de la mayoría de los laboratorios clínicos, como lo es la azida de sodio, substancia conocida desde hace muchos años como inhibidora de gram negativos, principalmente para flora entérica, organismos que en un momento dado podrían dificultar el aislamiento e identificación de G.vaginalis, a partir fundamentalmente de exudado vaginal. Hasta el momento se desconoce el efecto de dicha substancia sobre esta bacteria.

Por lo tanto, este estudio tiene por objeto primordial determinar la concentración óptima para un mejor aislamiento de G.vaginalis a partir de exudados vaginales. -- Siendo probadas 3 concentraciones distintas:

- 0.05 gr/lt.

- 0.10 gr/lt.

- 0.20 gr/lt.

en las que después de 48 hrs. de incubación a 37°C y 5-10% de CO₂, se observará el efecto que tiene esta substancia sobre G.vaginalis y sobre la flora vaginal normal (Flora de Döderlein). Para que una vez terminado y definido en cuál de ellas se observa mejor recuperación, pueda recomendarse y utilizarse en el laboratorio clínico de diagnóstico.

2. GENERALIDADES .

2.1. Aspectos históricos.-

En la práctica ginecológica, aproximadamente un paciente de cada cuatro necesita ayuda médica por presentar una excesiva o maloliente descarga vaginal. Tal descarga puede ser un síntoma de una infección vaginal o cervical.- En el pasado, conocidos patógenos tales como Candida albicans, Trichomonas vaginalis y Neisseria gonorrhoeae fueron considerados causantes de tales infecciones (9), y eran -- aislados sólo de algunos pacientes, y de la mayoría de estas infecciones al no encontrarse un agente etiológico, -- fueron llamadas, por esto, "vaginitis no específica".

El manejo y tratamiento de pacientes con vaginitis no específica ha sido frecuentemente insatisfactoria por la -- incertidumbre que rodea la etiología, en el último cuarto de siglo, G.vaginalis ha sido implicada como el agente -- etiológico de mayor importancia en vaginitis inespecífica de acuerdo a numerosos estudios (1,15).

Durante el período de 1953 a 1955, varias publicaciones reportaron el aislamiento de una pequeña bacteria gram negativa y hemofílica del tracto genitourinario. Leopold -- (1953) aisló la bacteria, dando una parcial descripción y sugirió una relación con el género Haemophilus. Independientemente, en 1955, Gardner y Duker recuperaron un bacilo gram negativo pleomórfico de 127 de 138 casos de vaginitis y describieron la condición clínica de esta enfermedad.

Sobre la base de este estudio, ellos le asignaron el nombre de Haemophilus vaginalis. Al mismo tiempo, Wurch y Lutz (1955) reportaron la ocurrencia de este organismo en casos de leucorrea (6).

Rápidamente, numerosos reportes confirmaron la existencia de la bacteria y de vaginitis con la cual fué asociado. Ray y Naughan (1956), Gardner, Dempster y Dukes (1957), Brewer, Halpern y Thomas (1957), lograron aislar G.vaginalis en 89 de 211 casos de pacientes con leucorrea (24) Edmunds (1959), Heltai (1959), y Gardner y Dukes (1959) reportaron los aspectos clínicos de dicha entidad y las características bacteriológicas de esta bacteria (6).

A pesar de todos estos estudios y otros sin mencionar el status patógeno y taxonómico de este organismo ha sido sujeto de mucha controversia, esto quizás se deba a la inconsistencia en cuanto al medio usado para el aislamiento de G.vaginalis y al criterio utilizado para la identificación de este organismo.

2.2. Taxonomía de G.vaginalis.

Por más de 30 años, se ha tenido el conocimiento de que la mayor parte de infecciones vaginales e inexplicables descargas vaginales, las cuales fueron tradicionalmente llamadas "vaginitis inespecífica", fueron causadas por un bacilo morfológicamente característico corto y gram

negativo.

Tal vez, por la urgencia y la falta de una clasificación más lógica, Gardner y Duker propusieron el nombre de Haemophilus vaginalis para el agente causal de vaginitis inespecífica. El nombre fué plenamente aceptado hasta que fué demostrado por Lapage en 1961, que los factores X y V no eran requeridos para crecimiento. El sugirió que el organismo podría pertenecer al género Corynebacterium. En 1963, Zinneman y Turner también concluyeron que el organismo era posiblemente un Corynebacterium y propusieron el nombre específico de Corynebacterium vaginale. El nuevo nombre fué extensivamente publicado y como una consecuencia, muchos autores después de 1970 usaron C.vaginale, y ésto, a pesar de la evidencia acumulada de que el organismo no era un Corynebacterium (10).

En 1978, Greenwood y Pickett propusieron la creación de un nuevo género, Gardnerella, esta proposición fué basada sobre los resultados de un estudio taxonómico utilizando hibridaciones de DNA, análisis bioquímicos de constituyentes de la pared celular y microscopía electrónica (12).

Finalmente en 1980, fué aceptado este género, y a la bacteria se le llamó Gardnerella vaginalis.

Características más importantes del género Gardnerella(13)

- 1.- Bacilos pleomórficos, no capsulados, inmóviles, no esporulados.
- 2.- Gram negativo a gram variable.

- 3.- Bacteria quimioorganotrófica, fermentativa.
 - 4.- Acido, no gas producido a partir de carbohidratos.
 - 5.- Mol % G + C de DNA = 42-44.
-

Como se ve, estos organismos son ahora definidos como baciles pleomórficos que no producen filamentos. Gardnerella también es definida como una bacteria no capsulada, inmóvil y quimioorganotrófica que tiene un tipo fermentativo de metabolismo. Acido pero no gas, es producido de una --- gran variedad de carbohidratos. Otras dos importantes características de este organismo son su falta de habilidad de producir catalasa y oxidasa (13).

Las moles por ciento de guanina más citosina de el -- DNA son definidas entre 42 y 44 %. Esta es una importante característica genética, porque ha sido mostrado que organismos que tienen valores de G + C que varían más del 10 % dividen relativamente pocas secuencias. Gardnerella es también una bacteria gram negativa a gram variable.

Si Gardnerella es una bacteria gram. negativa ó gram positiva es todavía materia de controversia, diversos estudios no han contestado este planteamiento de manera satisfactoria.

Reyn y col. dieron evidencias con microscopía electrónica que es una bacteria gram positiva. Recientemente, Harper y Davis han usado cromatografía en capa fina para demostrar el tipo gram positivo de la composición de los ami

noúcidos de la pared celular. Adicionalmente, los patrones de susceptibilidad a antibióticos de Gardnerella y su mecanismo regulatorio para citrato-sintetasa es más típico de gram positiva que gram negativa bacteria (13).

Por otro lado, Criswell y col. presentaron micrografías electrónicas para demostrar el tipo gram negativo de la membrana externa.

Así mismo, algunas evidencias han sido presentadas para apoyar que la pared celular de G.vaginalis contiene lipopolisacáridos, una sustancia casi siempre encontrada en bacteria gram negativa; por otro lado los citocromos de esta bacteria se han mostrado más consistente con los encontrados en las bacterias gram negativa (13).

Micrografías electrónicas han mostrado que la estructura externa es glicocalyx, y se ha visto que este tipo de estructura está frecuentemente relacionado con la adhesión bacteriana a las células epiteliales.

En suma, G.vaginalis es ahora una especie bacteriana definida. Basados en análisis más amplios de la pared celular, futuros estudios podrían probablemente asociar este género con otros gram negativos o gram positivos (13).

2.3. Aspectos microbiológicos de Gardnerella vaginalis.

2.3.1. Caracteres morfológicos y coloniales.

Morfología:

La bacteria aparece como un bacilo pequeño con bordes redondeados ó bacilos pleomórficos teniendo una disposición "diphtheroide" que miden de 0.3 a 0.6 por 1.0- a 2.0 micras; las células son gram negativas en cultivos jóvenes (6 a 36 hrs.), aunque en cultivos viejos (72 a 96-hrs) muestran tendencias hacia el pleomorfismo y desigual-coloración. Esta característica está asociada con la formación de formas de involución conteniendo gránulos no definidos, los cuales tienden hacia la gram positividad (8).

Características coloniales:

Las colonias aparecen pequeñas, convexas, circulares, borde entero, homogénea, lisa, translúcida, como gota de rocío, midiendo de 0.1 a 0.8 mm de diámetro. La mayoría de cepas produce una decoloración verde a café como hemólisis en medio Casman; en agar-sangre humana el 96% de cepas produce una difusa beta-hemólisis después de 48 hrs de incubación, también se ha reportado que 55 de 59 cepas de G.vaginalis mostraron este tipo de beta-hemólisis sobre agar sangre de conejo (12).

La variación liso-rugosa no ha sido observada; la morfología colonial permanece constante después de varias -- transferencias. Un visible crecimiento aparece después de 12 a 16 hrs de incubación a 37°C, y el organismo permanece viable por únicamente 48 a 72 hrs a esta temperatura.

La viabilidad puede ser mantenida por 2 a 3 días cuan

do los cultivos son refrigerados a 3°C. La viabilidad a -- temperatura ambiente (20 a 24°) es de 3 a 5 días (6).

2.3.2. Requerimientos de cultivo.

Una de las primeras características de G.vagi-
nalis que causó conflicto tanto en el laboratorio como en
la clínica, fué la naturaleza fastidiosa en sus requeri---
mientos de crecimiento y requiere 5 vitaminas B: riboflavi
na, niacina, ácido fólico y tiamina, pero no nicotinamida-
adenina dinucleótido (factor V), hemina (factor X) o coen-
zimas (26). Requerimientos de aminocidos no son conocidos.

el crecimiento es facilitado por carbohidratos fermen
tables y proteosa peptona no. 3.

Es un organismo facultativo, sacarolítico, su creci-
miento mejora por incremento de CO₂. Temperatura óptima, -
36 a 37°C, pH óptimo a 6.5 (8).

2.3.3. Características bioquímicas.

Aunque numerosos reportes han sido publicados--
durante los últimos 20 años sobre las reacciones bioquími-
cas de G.vaginalis, este organismo todavía permanece pobre
mente caracterizado, parte de este problema puede ser por-
descripciones de especies verdaderas de Haemophilus erró-
neo para G.vaginalis.

También las diferencias en metodología para determinar las características bioquímicas parecen ser las primariamente responsables de estos conflictivos resultados(12).

Características taxonómicas de *G.vaginalis* (13).

Test	Resultado
Indel	-
Ureasa	-
Voges-Proskauer	-
Rojo de metilo	+
H ₂ S Producción	-
H ₂ O ₂ inhibición	+
Benzidina (citocromos)	-
Nitrato a nitrito	-
Hidrólisis de almidón	+
Hidrólisis de hipurato	+
Acido producido de	
dextrosa, dextrina, maltosa,	
ribosa, almidón.	+
L-arabinosa, lactosa, galactosa,	
inulina, fructosa, manosa, sucrosa	v
Arbutina, celobiosa, glicerol,	
inositol, manitol, salicina	-

Esta tabla muestra pocas de las más significantes -- reacciones bioquímicas de este organismo. Otras dos importantes características de esta bacteria son las pruebas de

oxidasa y catalasa negativas para este organismo. La fermentación de almidón es una reacción fuerte y es uno de los importantes criterios para el aislamiento e identificación de G.vaginalis. Otro criterio útil para la identificación es la prueba del hipurato, que demuestra la habilidad de esta bacteria de hidrolizar hipurato a glicina (13).

Un estudio realizado por Esquer (33), en cuanto a la cantidad mínima, indispensable, práctica y además costeable como perfil bioquímico seguro, consta de las pruebas de: catalasa (% de cepas positivas: 0%), oxidasa (0%), hidrólisis de hipurato (76.19%), lactosa (10.53%), y reducción de telurito (0%).

2.3.4. Producción de hemólisis.

Las colonias de G.vaginalis pueden ser macroscópicamente distinguidas en varios medios ya sea por su acción sobre el almidón (producción de ácido ó hidrólisis) o por una distinta beta-hemólisis alrededor de las colonias sobre agar sangre de conejo y humana. Esta zona de beta-hemólisis es pequeña, clara, y con bordes difusos (26).

El grado y tipo de hemólisis producido sobre agar sangre por G.vaginalis es reportado con diferentes resultados.

Leopold (1953) describió una clara hemólisis. Lutz y col. (1956) especificaron un halo verde rodeado por una delgada zona de clara hemólisis. Amies y Jones no descri-

ben reacción sobre agar sangre. Edmunds (1960) reportó que todas las cepas fueron hemolíticas sobre agar sangre humana cuando eran aisladas originalmente, pero algunas se hicieron no hemolíticas después de subcultivos.

Las discrepancias entre estos reportes posiblemente son debidas a variaciones en el medio y los métodos empleados (6).

2.3.5. Características antigénicas.

La identificación serológica de G.vaginalis no ha sido muy utilizada porque los antisueros preparados comercialmente no están disponibles. Redmond y Kotcher reportaron la presencia de un antígeno específico en esta bacteria, lo cual indica que la sero-identificación puede ser factible (7).

Hace pocos años se reportó que G.vaginalis se podía detectar por inmunofluorescencia en frotis vaginales. La preparación del antisuero se logró en conejos por la inyección intravenosa del antígeno preparado de esta bacteria.

Se observó, mediante el método de inmunofluorescencia, reacción cruzada con Corynebacterium xerosis pero a títulos muy bajos, específicamente dilución 1:10, pero como la dilución de trabajo encontrada fué de 1:200, dicha prueba podría ser útil en estudios clínicos y epidemiológicos, los cuales podrían establecer el papel, si tiene alguno, que G.vaginalis juega en vaginitis inespecífica (3).

2.4. Aspectos clínicos y epidemiológicos de vaginitis.

2.4.1. Fisiología y ecología de la vagina.

La vagina humana está formada por epitelio escamoso estratificado, el cual no tiene glándulas. Los mayores componentes de las secreciones vaginales son transudados de la pared vaginal, células epiteliales descamativas, moco cervical, fluidos del tracto genital superior y leucocitos. Los estrógenos y la estimulación sexual son factores que incrementan el fluido vaginal.

Los constituyentes orgánicos del fluido vaginal son -teínas, carbohidratos y ácidos grasos. Los ácidos orgánicos surgen como productos metabólicos de la flora vaginal-bacteriana, causan el olor vaginal, y muestran cambios cíclicos excepto con el uso de contraceptivos orales.

Estudios semicuantitativos en humanos así como en estudios de modelo animal han confirmado que la flora vaginal es un sistema dinámico y cerradamente interrelacionado.

Bacterias más prevalentes en la flora vaginal de mujeres sanas:

Facultativos

Staphylococcus epidermidis

Especies de Lactobacillus
Estreptococos no-hemolíticos.

Diphtheroides

Anaeróbicos

Peptococos

Peptocestreptococo

Especies de Bacteroides

Especies de Eubacterium

Lactobacillus es el organismo más prevalente en la -- vaginal normal, aunque se ha demostrado por estudios que - muchos otros organismos facultativos y anaerobios obliga-- dos están presentes en altas concentraciones.

La flora vaginal está influenciada por varios facto-- res, como el contenido de glicógeno de las células epita-- liales, glucosa, pH, hormonas, método de control de natali-- dad utilizado, coito y otros (23).

2.4.2. Manifestaciones clínicas de vaginitis.

La leucorrea se define como una descarga vagi-- nal suficiente para ensuciar la ropa; es una condición co-- mún y generalmente indica una infección del tracto genital inferior. Una pequeña cantidad de secreciones son normal--

mente formadas en la vagina, primariamente es respuesta a estimulación estrogénica. La infección es evitada por mantenimiento de la acidez vaginal, la cual está relacionada a influencias hormonales y carbohidratos utilizados por -- las bacterias normales de la cavidad.

Factores predisponentes a una vaginitis podrían ser: seriedad extrema, alteraciones en los niveles hormonales (en embarazos, menopausia), u otras situaciones clínicas cuando la infección vaginal es una complicación (diabetes, terapia antimicrobiana y de corticosteroides).

Probables agentes etiológicos de una vaginitis:

Candida albicans

Trichomonas vaginalis

N.gonorrhoeae

Gardnerella vaginalis

Bacilos gram negativos

Deficiencia estrogénica

Reacción a cuerpos extraños

2.4.3. Vaginitis por G.vaginalis.

Como ya se mencionó anteriormente, esta bacteria ha sido implicada como agente etiológico de vaginitis inespecífica, se le atribuyó como causante de esta enfermedad si las pacientes tenían un examen microscópico negati-

Vo para levaduras y Trichomonas vaginalis y si dos o más - de los siguientes hallazgos anormales se presentaban: a) el pH del fluido vaginal mayor de 4.5. b) una descarga vaginal homogénea. c) células "clue" (son células epiteliales con bacilos adheridos en su superficie), presentes en fluido vaginal. d) desprendimiento de un olor a aminas cuando el fluido vaginal se mezcla con KOH al 10% (30,32).

La cantidad de descarga va de ligera a copiosa, frecuentemente tiene una apariencia de pasta delgada y tiende a adherirse a la pared vaginal. La inflamación de la vagina es raramente observada. Se ha reportado que G.vaginalis es un parásito estricto de superficie que altera las secreciones vaginales y eleva ligeramente el pH vaginal sin invadir tejidos (15).

La vaginitis por G.vaginalis es una enfermedad venérea. De todas las enfermedades sexualmente transmitidas -- las cuales son clínicamente manifiestas, ésta es la más -- prevalente y una de las más contagiosas.

Observaciones que sostienen ésto son:

1.- Muchas mujeres curan de la enfermedad, pero si sus esposos no son tratados, se vuelven a infectar.

2.- G.vaginalis puede ser aislado de un 90% de esposos de mujeres infectadas, aunque raramente exhiben evidencia clínica de la infección.

3.- G.vaginalis esencialmente no existe en niñas, y es encontrada raramente en mujeres vírgenes.

4.- La infección está frecuentemente asociada con otras enfermedades sexualmente transmitidas y ésto es altamente significativo.

5.- Grupos de población conocidos a ser sexualmente promiscuos tienen una alta prevalencia de la infección (10).

2.4.4. Patogenicidad de G.vaginalis.

A pesar de los numerosos estudios hechos sobre ésta bacteria, persiste la controversia sobre si ésta es patógeno primario ó parte de la flora vaginal normal; ésto tiene una variedad de explicaciones, incluyendo el aislamiento del organismo en cultivos, falta de empleo de criterios establecidos para reconocimiento de la entidad clínica, y falta de algunos investigadores a emplear protocolos de investigación (11).

Ultimamente, el empleo de medios más sensibles para la detección de G.vaginalis y la semicuantificación de cultivos, han dado por resultado la observación de que esta bacteria es el organismo predominante en pacientes con vaginitis inespecífica y que G.vaginalis puede estar como parte de la microflora vaginal normal en una significativa minoría de mujeres sin signos o síntomas de esta infección.- La tasa de mujeres normales portadoras es de 30-40 %.

G.vaginalis es un patógeno oportunista en bajo grado; los síntomas se presentan en números incrementados de esta

bacteria y bajo ciertas condiciones. Factores locales ambientales pueden determinar en parte el resultado de la colonización vaginal con este organismo. Recientemente, varios estudios han indicado que vaginitis inespecífica es una infección sinérgica que requiere la participación de organismos, particularmente anaerobios (5,31).

Esto puede ayudar a explicar porque un gran número de mujeres son colonizadas con G.vaginalis sin presentar síntomas (18,27,32).

Por otro lado, se sostiene la patogenicidad de G.vaginalis, ya que ha sido aislada de pacientes con cistitis, aborto (20), de infecciones del tracto urinario de pacientes inmunocomprometido, septicemia neonatal (25), bacteriuria en mujeres con preeclampsia (28).

Gardner, que junto con C.D.Dukes, fueron los primeros en dar la descripción de este organismo, sostiene la patogenicidad de esta bacteria basado en las siguientes observaciones:

1.- G.vaginalis es el organismo predominante en las vaginas de pacientes, con la descrita entidad clínica, y la recuperación de cultivos puros no es infrecuente.

2.- G.vaginalis es la única bacteria aislada consistentemente de tales pacientes.

3.- La experiencia de muchos investigadores ha sido que G.vaginalis es raramente aislada de pacientes que no muestran evidencias clínicas de la infección.

4.- Cuando G.vaginalis es erradicada, los resultados -- clínicos y del laboratorio asociados con la infección desaparecen abruptamente, pero estos vuelven con la reexposición al consorte sexual infectado.

5.- Muchas mujeres normales desarrollaron la clásica infección cuando fueron inoculadas con material de vaginas infectadas.

6.- La enfermedad es fácilmente establecida en base a cultivos puros de G.vaginalis, cuando el inóculo es tomado del período óptimo del crecimiento logarítmico (11).

Sobre la controversia del sinergismo entre anaerobios y este organismo, Gardner dice que "en cultivos de cavidades corporales de cualquier grupo de población de mujeres, ya sean órganos normales e enfermos, desarrollan una gran cantidad tanto de bacterias aeróbicas como anaeróbicas. La vasta mayoría de estos organismos son parte de la flora normal y no patógenos para el órgano del cual el inóculo -- fue tomado" (11).

Por lo que se ve, la patogenicidad de G.vaginalis es difícil de valorar, quizás estudios posteriores den respuesta a la siguiente pregunta: Gardnerella vaginalis: patógeno o comensal?

3 . M A T E R I A L Y M E T O D O .

3.1. Procedencia de las muestras.

El trabajo de laboratorio se realizó con 100 muestras de exudado vaginal de pacientes que fluctuaron entre los 15 y 50 años de edad, remitidos a la sección Microbiología del Laboratorio de Patología Clínica del Hospital Dr. Ángel Leaño, para su estudio.

Para la inclusión de estos pacientes a este trabajo, se tomó como único parámetro clínico definitivo: la leucorrea.

3.2. Metodología Microbiológica.

3.2.1. Toma de muestra.

Se colocó el espejo vaginal, previa acomodación de la paciente en posición ginecológica, para la visualización de fondo de saco, de donde se procedió a tomar la muestra por medio de 2 hisopos estériles.

Con una tira reactiva se determinó el PH de la mucosa.

Con un hisopo se practicaron dos frotis para la tinción de Gram y para después colocar el mismo en solución salina a 37°C y llevar a cabo el examen directo: el segundo hisopo se introdujo en el medio de transporte y mantenimiento Stuart.

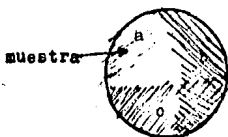
3.2.2. Microscopía.

Se práctico el exámen directo para descartar la Presencia de Trichomonas vaginalis y células de levadura como probables causantes de la infección.

Los frotis se tñeren con la coloración de Gram para determinar:

- Leucocitos polimorfonucleares,
- Diferentes morfotipos bacterianos.
- Baciles gram positivos correspondientes a la Flora de Döderlein normal de vagina.
- Presencia o ausencia de células de Gardner y Duker que son células del epitelio vaginal cuyo citoplasma esta cubierto con cocobacilos gram negativos con o sin pleomorfismo y que puede guardar relación con el aislamiento de G.vaginalis.

3.2.3. Inoculación y estriación.



El hisopo con la muestra es colocado en el primer -- cuadrante (a), (alícuota), esterilizar, estriar (b), este- rilizar y estriar.

3.2.4. Primoaislamiento.

Del hisopo transportado en el medio de Stuart conte--
niendo las muestras, se inocularon los siguientes medios -
de cultivo:

- Agar sangre: para desarrollo de gérmenes habituales, in-
cluyendo levaduras.
- Agar chocolate: para aislamiento de Neisseria gonorrhoeae
y Haemophilus.

- CNA (Agar Columbia colimicina-ácido nalidixico): para --
gram positivos y especialmente para G.vaginalis.

Este medio per ser en el que se aísla con más fre---
cuencia este organismo fué usado como medio de compa
ración con los medios de estudio.

- Los medios de experimentación:

(Nota: debido a que se descontinuó el Agar Columbia per-
parte de los laboratorios fabricantes, se utilizó un me-
dio similar en la constitución, y este fué el agar Soya-
Trypticasa + 0.1 gr/lt de almidón + 5 % de sangre huma--
na).

- A) Agar Soya Trypticasa + 0.05 gr/lt de Azida de Na.
- B) Agar Soya Trypticasa + 0.10 gr/lt de Azida de Na.
- C) Agar Soya Trypticasa + 0.20 gr/lt de Azida de Na.

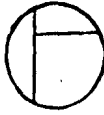
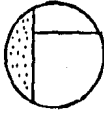
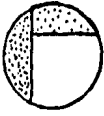
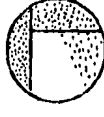

La inoculación de estos medios se llevó a cabo alter-
nada, de manera que el mismo medio no fuera inoculado siem
pre primero.

Posteriormente, los medios de cultivo se incubaron a

una atmósfera de 5-10 % de CO₂ a 37°C por 48 hrs.

A las 48 hrs de incubación se revisaron los medios de cultivo buscando el crecimiento de G.vaginalis, caracterizado por colonias pequeñas de 0.5 a 2.0 mm de diámetro, -- borde regular, convexas, brillantes y una difusa beta-hemólisis, cuya semicuantificación fue realizada de acuerdo al siguiente esquema: (Esquema No.1).

ESQUEMA No.1. Semicuantificación de las colonias por cruces.

Crecimiento	Sector I	Sector II	Sector III	
negativo	no crecimiento	no crec	no crec	
1 + escasa cantidad	colonias aisladas (3-30 col)	no crec	no crec	
2 + moderada cantidad	crecimiento confluente (abun.col)	colonias aisladas	no crec	
3 + abundante cantidad	crec. confluente (abun.col)	crec confluente	colonias aisladas	
4 + muy abun. cantidad	crec. confluente	crec confluente	crec confluente (ó muchas col aisl)	

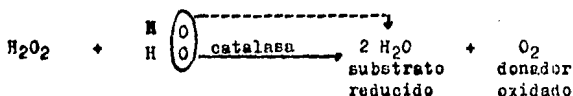
Después de encontrar colonias con dichas características, se procedió a practicar un frotis y teñirlo por el método Gram y comprobar la morfología de la bacteria: cocobacilos gram negativos, algunas veces ligeramente gram positivos.

3.2.5. Identificación bioquímica.

- Prueba de la catalasa:

De las colonias sospechosas, se efectuó la prueba de la catalasa.

- Fundamento: las bacterias que producen catalasa pueden actuar sobre el sustrato H_2O_2 , siendo uno de los productos de la hidrólisis el O_2 , con la subsecuente formación de burbujas:



- Bioquímica:

La enzima catalasa se encuentra presente en bacterias aerobias y anaerobias facultativas que poseen el sistema citocromo. Generalmente los organismos que no poseen este sistema, no contienen la enzima catalasa y por lo tanto, son incapaces de descomponer el peróxido de hidrógeno. Este compuesto es producto del desdoblamiento de los azúcares y si se acumula es tóxico para la bacteria provocando así su muerte.

- Método:

Se toma parte de la colonia sin tocar el medio de cultivo, se coloca sobre una gota de peróxido de hidrógeno al 30 %.

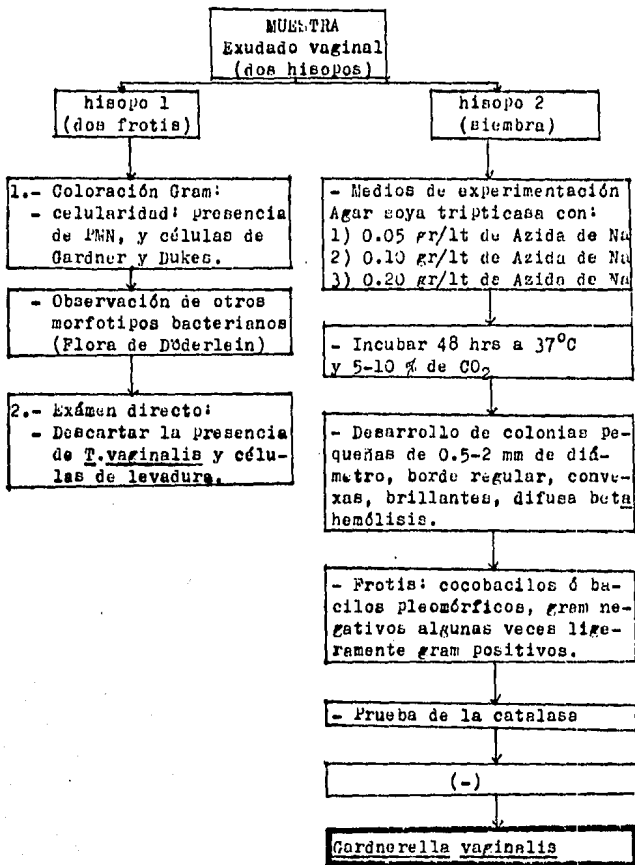
- Interpretación:

formación de burbujas..... catalasa (+)

no formación de burbujas..... catalasa (-)

Gardnerella vaginalis, catalasa (-), prueba útil para la -
diferenciación con el género Corynebacterium.

3.2.6. Plan de Trabajo.



4. RESULTADOS .

De las 100 muestras de exudado vaginal estudiadas, -- G.vaginalis fué obtenida en 24 casos (24%), observándose resultados similares en los 3 medios de experimentación y en el medio de comparación, el CNA (Agar Columbia colimicina-ácido nalidixico). Sólo en el medio No.3 hubo 2 casos en los que no se obtuvo crecimiento.

La Tabla No.1, muestra la semicuantificación por cruces del crecimiento de este organismo, tanto en los medios de experimentación como en el Agar de Columbia CNA. Para dicha semicuantificación se utilizaron los parámetros señalados en el Esquema No.1.

Aunque como se observa en la Tabla No.1, el crecimiento por cuadrantes en promedio fué similar en los 3 medios en estudio y en el CNA, no fueron similares los resultados en cuanto al diámetro de colonia y de beta-hemólisis (Fig. 1,2,3), donde si se observó gran variación (Tabla No.2).

Después de que en los medios de estudio y en el CNA, se observaran las colonias sospechosas de G.vaginalis, se procedió a practicar un frotis y a realizar la prueba de la catalasa cuyos resultados mostraron que ninguno de los 24-casos la produjo.

Morfología microscópica de las colonias en estudio:

La observación de las colonias sospechosas teñidas con el método de Gram se observaron generalmente coco-

bacilos gram negativos y en menor cantidad bacilos gram ne
gativos, encontrándose mayor pleomorfismo cuando se tenían
colonias de más de 48 hrs de incubación. No se observó nin
guna relación entre la observación microscópica con la cen
centración de azida de sodio.

Las gráficas No.1 y 2, muestran la relación que exis-
te entre la concentración de azida de sodio con el diáme--
tro de colonia y de beta-hemólisis.

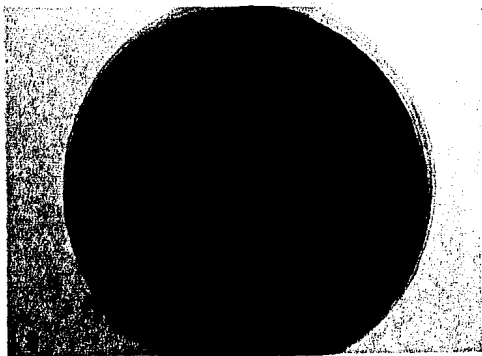
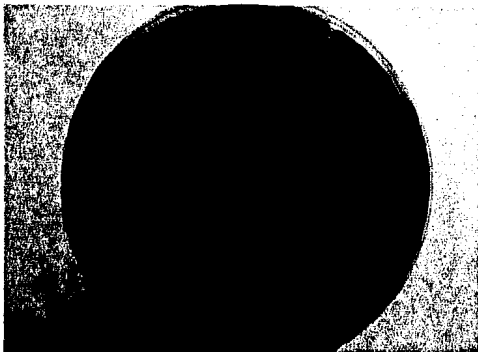


Figura No.1. Crecimiento de G.vaginalis en el medio No. 1.

Figura No.2. Crecimiento de G.vaginalis en el medio No.2

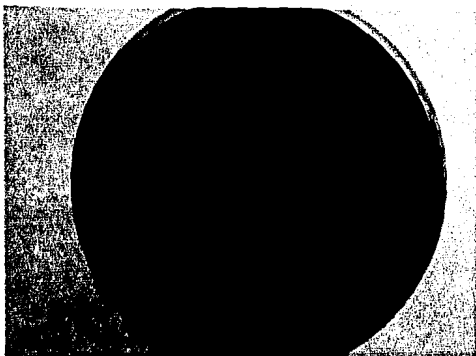


Figura No.3. Crecimiento de G.vaginalis en el medio No.3.

Tabla No.1: Semicuantificación por cruces del crecimiento de G.vasinalis, en el medio de rutina y los 3 diferentes - medios evaluados.

No.de muestra	Medio 1	Medio 2	Medio 3	CNA
1	2 +	2 +	2 +	2 +
2	4 +	4 +	4 +	4 +
3	3 +	3 +	3 +	3 + ^e
4	3 +	3 +	3 +	4 +
5	3 +	3 +	3 + ^e	3 +
6 ^e	2 +	2 +	2 +	2 +
7	2 +	2 +	2 + ^e	2 +
8	3 +	3 +	3 + ^e	3 +
9	3 +	3 +	3 +	3 +
10	3 +	3 +	3 +	4 +
11	3 +	3 +	3 +	3 +
12	3 +	3 +	2 +	3 +
13	3 +	3 +	3 +	3 +
14	3 +	3 +	3 +	2 +
15	3 +	3 +	3 +	3 +
16 ^e	2 +	2 +	2 +	2 +
17	3 +	3 +	3 +	3 +
18	2 +	2 +	2 +	3 +
19	2 +	2 +	2 +	2 +
20	3 +	3 +	3 +	3 +
21	3 +	3 +	2 + ^e	3 +
22	3 +	3 +	-	3 +

Tabla No.1 (continuación).

No.de muestra	Medio 1	Medio 2	Medio 3	CNA
23 [ⓐ]	3 +	3 +	3 +	3 +
24 [ⓐ]	2 +	2 +	-	3 +
\bar{X} del crec. (en cruces)	2.75 +	2.75 +	2.68 +	2.87 +

ⓐ Necesitaron un día más de incubación.

Medio 1 = Agar soya tripticasa + 0.05 gr/lit de Azida de Na.

Medio 2 = Agar soya tripticasa + 0.10 gr/lit de Azida de Na.

Medio 3 = Agar soya tripticasa + 0.20 gr/lit de Azida de Na.

TABLA No.2: que muestra el tamaño de la colonia y el --
diámetro de beta-hemólisis en los medios de experimentación

No.muestra	Medio 1		Medio 2		Medio 3	
	A	B	A	B	A	B
1	0.5	1.0	0.4	0.9	0.4	0.8
2	0.5	0.9	0.5	0.8	0.4	0.8
3	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	0.8
4	0.4	0.9	0.3	0.9	0.3	0.8
5	0.5	1.1	0.5	1.0	0.5	0.8
6	0.5	1.0	0.5	0.9	0.3	0.8
7	0.4	1.0	0.4	1.0	0.5	1.2
8	0.4	0.9	0.4	0.8	0.4	0.8
9	0.6	1.1	0.5	0.9	0.4	0.7
10	0.5	1.0	0.5	1.0	0.4	0.9
11	0.5	1.1	0.5	1.0	0.4	0.8
12	0.4	0.9	0.4	0.9	0.4	0.8
13	0.5	0.9	0.5	0.8	0.5	0.8
14	0.5	0.9	0.5	0.9	0.5	0.8
15	0.5	1.0	0.5	0.9	0.4	0.7
16	0.8	1.5	0.8	1.5	0.5	0.8
17	0.5	1.1	0.5	0.9	0.5	0.8
18	0.6	1.2	0.5	1.0	0.4	0.9
19	0.5	1.0	0.5	0.9	0.5	0.8
20	0.6	1.2	0.5	0.9	0.4	0.7
21	0.5	1.0	0.5	1.0	0.4	0.8

TABLA No.2 (continuación).

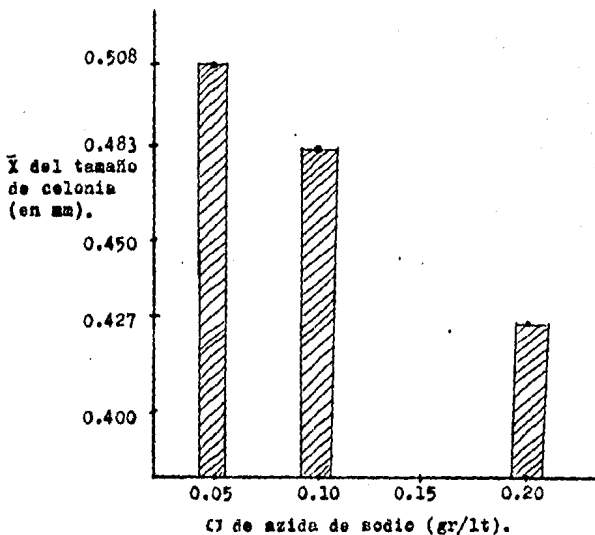
No.muestra	Medio 1		Medio 2		Medio 3	
	A	B	A	B	A	B
22	0.6	1.2	0.5	1.0	no se aisló	
23	0.4	0.9	0.4	0.8	0.4	-
24	0.5	1.0	0.5	0.8	-	-
\bar{X} (en mm)	0.508	1.03	0.483	0.937	0.427	0.795

A = diámetro de la colonia (en mm).

B = diámetro de la beta-hemólisis (en mm).

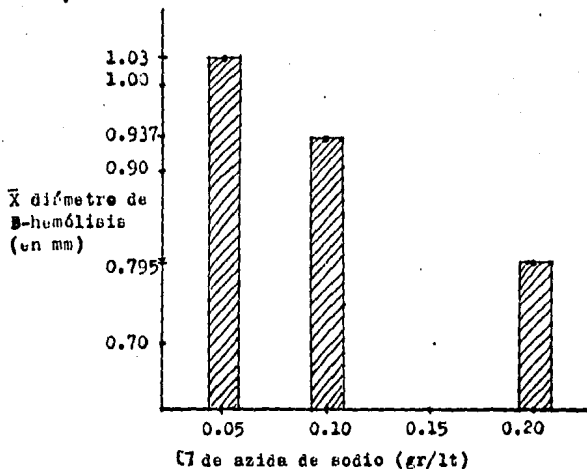
GRAPICA No.1: muestra la relación existente entre la concentración de Azida de sodio con el tamaño de la colonia.

CJ de azida de sodio (gr/lt)	X de colonia (en mm)
0.05	0.508
0.10	0.483
0.20	0.427



GRAFICA No.2: muestra la relación que existe entre la concentración de azida de sodio con el diámetro de la beta-hemólisis.

C ₁ de azida de sodio (gr/lt)	X de beta-hemólisis(mm)
0.05	1.03
0.10	0.937
0.20	0.795



5. CONCLUSIONES.

Vaginitis es una de las razones más comunes para la consulta al médico, ya que cerca de 9 de 10 pacientes con este problema sufren de infección de la vagina por especies de G.vaginalis, Candida sp ó Trichomonas vaginalis, ya sean solas ó en combinación.

El diagnóstico y efectivo tratamiento de esta infección común, depende de la exacta identificación de la entidad patológica, a fin de proscribir una terapia específica así como para la restauración del ecosistema normal de vagina.

El diagnóstico de infección por Candida sp ó T.vaginalis, usualmente no presenta problema ya que la observación en el laboratorio de una preparación en fresco confirma el diagnóstico clínico.

El organismo con el cual se presentan problemas para su identificación es G.vaginalis, ya que es exigente en sus requerimientos, y a la fecha no se ha encontrado un medio de cultivo selectivo para la exacta identificación de esta bacteria. Muchas de las controversias que han existido sobre este organismo es por este.

Ultimamente el medio más utilizado para su aislamiento es el CNA (Agar Columbia colimicina-ácido nalidixico), pero debido a que se ha descontinuado la colimicina, que es un antibiótico inhibidor de flora entérica, se pensó que la azida de sodio podría reemplazarse en su lugar ya -

que también inhibe flora entérica.

Como se señaló anteriormente Gardnerella vaginalis, - fué aislada en un 24 % de las 100 muestras de exudado vaginal, en los tres medios en estudio se obtuvo un crecimiento similar al medio de comparación, el agar CNA (Agar Columbia colimicina-ácido nalidíxico), solo en tres casos se obtuvo mayor crecimiento en CNA per solo uno en los medios de experimentación.

Aunque en los tres medios se obtuvo un resultado similar, resulta obvio en la Tabla No.2, que en el medio no.1, el promedio del diámetro tanto de la colonia como de la beta-hemólisis es más grande que en los demás medios, y que el diámetro de la colonia y de la beta-hemólisis van disminuyendo conforme se aumenta la concentración de azida de sodio, en dos casos en el medio 3, no se aisló G.vaginalis posiblemente, porque esta substancia en altas concentraciones inhibe el crecimiento de este organismo y es por esto que se observa tan pequeño el tamaño de la colonia y de la beta-hemólisis.

En numerosos estudios (9,22,26,29), se señala que la beta-hemólisis producida por este organismo es difusa, en este estudio se observó en los medios 1 y 2, una beta-hemólisis con bordes bien delimitados, beta-hemólisis no señalada en ningún otro estudio, en el medio 3 sí se observó - en pocas ocasiones una difusa beta-hemólisis.

Se observó (Gráficas No.1 y 2), una relación lineal - entre la concentración de azida de sodio y el promedio obtenido de las 24 espas recuperadas, del tamaño de la colonia y del diámetro de la beta-hemólisis.

Esto indica que en el medio No.1, se encontró que el tamaño de la colonia y de la beta-hemólisis es mayor que en los otros medios, además de que el promedio del crecimiento (en cruces), fué muy similar al medio más empleado en la recuperación de G.vaginalis, el CNA. Por esto se recomienda para su uso en el laboratorio de diagnóstico clínico, sobre todo porque la azida de sodio es una substancia que esta al alcance de todos los laboratorios.

Además como la beta-hemólisis tiene bordes bien delimitados, además del tamaño de ésta y de la colonia, hacen más rápida la identificación presuntiva de G.vaginalis.

Como se señaló en el plan de trabajo, G.vaginalis fué identificada por morfología colonial, producción de beta-hemólisis, tinción de Gram y prueba de la catalasa.

En el frotis teñido por el método Gram, de las colonias sospechosas, en el exámen microscópico se observaron generalmente cocabacilos y en menor cantidad bacilos cortos, por lo que se concluye que la azida de sodio no causa pleomorfismo sobre esta bacteria, observándose pleomorfismo cuando los cultivos tenían más de 48 hrs de incubación.

También se observó que la azida de sodio no produce cambios en la morfología colonial, notándose las colonias características de Gardnerella vaginalis; que son colonias pequeñas, brillantes, borde regular, beta-hemolíticas. Además como se señaló, la azida de sodio en bajas concentraciones, aumenta el tamaño de la colonia y de la beta-hemólisis, siendo más fácil de hacer las pruebas bioquímicas para la exacta identificación de este organismo en el laboratorio clínico.

En resumen, juzgamos a nuestro criterio que de acuerdo a la experiencia de este trabajo, se recomienda el medio No.1, que contiene 0.05 gr/lit de azida de sodio, para el aislamiento de G.vaginalis, esperamos que este trabajo sea de utilidad en la aplicación de la metodología microbiológica en el laboratorio de diagnóstico clínico.

6. BIBLIOGRAFIA .

1. Akerlund M., Mardh P.: Isolation and identification of - Corynebacterium vaginale (Haemophilus vaginalis) in women with infections of the lower genital tract. Acta - Obstet. Gynec. Scand. Vol.53, 1974, pag. 85-90.
2. Bailey R.K., Voss J.L., Smith R.F.: Factors affecting isolation and identification of Haemophilus vaginalis - (Corynebacterium vaginale). Journal of Clinical Microbiology. Vol.9, No.1. 1979, pag. 65-71.
3. Cano R.J., Beck M.A., Grady D.V.: Detection of Gardnerella vaginalis on vaginal smears by immunofluorescence. Can. J. Microbiol. Vol.29, 1983, pag.27-32.
4. Criswell B.S., Ladwig C.L., Gardner H.L., Dukes C.D.: Haemophilus vaginalis: Vaginitis by inoculation from culture. Obstet.Gynec. Vol. 33, No. 2, 1969, pag. 195-199.
5. Dattani I.M., Gerken A., Evans B.A.: Aetiology and management of non-specific vaginitis. Br. J. Vener. Dis. Vol. 58, 1982, pag. 32-35.
6. Dukes C.D., Gardner H.L.: Identification of Haemophilus vaginalis. J. Bact. Vol. 81, 1961, pag. 277-283.
7. Dunkelberg W.E., Skaggs R., Kellog D.S.: Method for isolation and identification of Corynebacterium vagina

- le (Haemophilus vaginalis). Applied Microbiology. Vol. 19, No.1. 1970. p. 47-52.
8. Dunkelberg W.E., Skaggs R., Kellogg D.S.: A study and new description of Corynebacterium vaginale (Haemophilus vaginalis). Am. J. Clin. Pathol. Vol. 53. 1970. p. 370-377.
 9. Erkkola R., Järvinen H., Terho P., Meurman O.: Microbial flora in women showing symptoms of nonspecific vaginosis; Applicability of KOH test for diagnosis. Scand.J.Infect Dis. Suppl. 40. 1983. p. 59-63.
 10. Gardner H.L.: Non-specific vaginitis: A non-entity. Scand.J.Infect.Dis. Suppl. 40. 1983. p. 7-10.
 11. Gardner H.L.,: Pathogenicity of Gardnerella vaginalis (Haemophilus vaginalis). Scand J.Infect.Dis. Suppl.40 1983. p. 37-40.
 12. Greenwood J.R., Pickett M.J.: Salient features of Haemophilus vaginalis. J. of Clin. Microb. Vol. 9, No. 2 1979. p. 200-204.
 13. Greenwood J.R.,: Current taxonomic status of Gardnerella vaginalis. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 40. 1983 p. 11-14.

14. Jolly J.L.: Minimal criteria for the identification of Gardnerella vaginalis isolated from the vagina. J. Clin. Pathol. Vol. 36. 1983. p. 476-478.
15. Josey W.K., MacKenzie W.J., Lambe D.W.: Corynebacterium vaginae (Haemophilus vaginalis) in women with - leukorrhoea. Am. J. Obstet. Gynecol. Vol. 126, No. 5. - 1976. p. 574-578.
16. Lancet.: Haemophilus vaginalis in nonspecific vaginitis. 1978: p. 459-460.
17. Lancet.: Gardnerella vaginalis: pathogen or commensal? 1983. p. 111.
18. Lancet.: Gardnerella vaginalis. 1983. p. 343-344.
19. Leighton P.M.: Gardnerella vaginalis: laboratory isolation and clinical significance. Can. J. of Public Health. Vol. 73. 1982. p. 335-340.
20. Malone B.H., Schreiber M., Schnifder N.J., Holdeman L. V.: Obligately anaerobic strains of Corynebacterium vaginae (Haemophilus vaginalis). J. of Clin. Microb. Vol. 2, No. 3. 1975. p. 272-275.
21. Márquez-Dávila G., Martínez-Barreda C.E.: Predictive-value of the "Clue cells" Investigation and the amine

- volatization test in vaginal infections caused by Gardnerella vaginalis. J. of Clin. Microb. Vol. 22, No. 4. 1985. p. 686-687.
22. Mickelsen P.A., McCarthy I.R., Mangum M.E.: New differential medium for the isolation of Corynebacterium vaginae. J. of Clin. Microb. Vol. 5, No. 4. 1977. p. -- 488-489.
23. Paavonen J.: Physiology and ecology of the vagina. Scand J. Infect. Dis. Suppl. 40. 1983. p. 31-35.
24. Park C.H., Fauber M., Cook C.B.: Identification of Haemophilus vaginalis. Am. J. of Clin. Pathology. Vol. 38 No. 3. 1968. p. 590-593.
25. Petit P.L., Mouton R.P.: Gardnerella vaginalis in urinary tract infections of immunocompromised patients. J. of Clin. Microb. Vol. 4, No. 3. 1984. p. 357.
26. Piot P., Van Dyck E.: Isolation and identification of Gardnerella vaginalis. Scand. J. Infect. Dis. Suppl.40 1983. p. 15-18.
27. Ratnam S., Fitzgerald B.L.: Semiquantitative culture - of Gardnerella vaginalis in laboratory determination of nonspecific vaginitis. J. of Clin. Microb. Vol. 18, No. 2. 1983. p. 344-347.

28. Savige J.A., Gilbert G.L., Fairley K.F., McDowall D.R.: Bacteriuria due to Ureaplasma urealyticum and Gardnerella vaginalis in women with preeclampsia. J. of Inf. Dis. Vol. 148, No. 3. 1983. p. 605.
29. Smith R.F.: Comparison of two media for isolation of Haemophilus vaginalis. J. of Clin. Microb. Vol. 8, No. 6. 1979. p. 729-730.
30. Spiegel C.A., Amsel R., Eschenbach B., Schoenknecht F., Holmes K.K.: Anaerobic bacteria in nonspecific vaginitis. New England J. of Medicine. Vol. 303, No. 11. -- 1980. p. 601-606.
31. Tabaqchali M.K., Wilks M., Thin R.N.: Gardnerella vaginalis and anaerobic bacteria in genital disease. Br. J. Vener. Dis. Vol. 59. 1983. p. 111-115.
32. Totten P.A., Amsel R., Hale J., Piot P., Holmes K.K.: Selective differential human blood bilayer media for isolation of Gardnerella vaginalis (Haemophilus vaginalis). J. of Clin. Microb. Vol. 15, No. 1. 1982. p. 141-147.
33. Esquer Murillo Mercedes.: Evaluación de un perfil bioquímico para la identificación de Gardnerella vaginalis. Tesis para obtener el grado de QFB. UAG. Guadalajara, Jal. México. 1985.

INSTANESIS

TESIS • INFORMES • MEMORIAS
COPIAS • REDUCCIONES • EN-
CUADERNADO • IMPRESIONES •
COPI-OFFSET • TRANSCRIPCIO-
NES IBM EN LINO • DIBUJO DE
GRAFICAS, PLANOS Y ORGANI-
GRAMAS • HELIOGRAFICAS •
REVELADO KODAK.

ENRIQUE G. MARTINEZ No. 30
(ANTES PARROQUIA)
TEL. 13-99-23 GUADALAJARA