

37  
2ej.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

Comparación entre el método tradicional  
y el uso de discos con polianetol sulfato  
sódico para la identificación de  
Gardnerella vaginalis en muestras de  
exudado vaginal en la Clínica de Medicina  
Familiar Tlalnepantla ISSSTE.

T E S I S  
Que para obtener el Título de  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
p r e s e n t a n

**Elvia Alejandra Parra Acevedo**  
**Jesús Alberto Higuera Acuña**

Director: M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez  
Coasesor: Q.F.B. Elvia Luz Robledo Cano

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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

1.	Resumen	1
2.	Introducción	
2.1	Anatomía y Fisiología de la vagina	2
2.1.1	Flora normal de la vagina	6
2.2	Vaginitis Inespecífica	9
2.2.1	Manifestaciones clínicas	9
2.2.2	Epidemiología	11
3.	Generalidades	
3.1	Género Gardnerella	13
3.2	Morfología	14
3.3	Patogenicidad	15
3.4	Nutrición y Crecimiento	18
3.5	Diagnóstico de Laboratorio	
3.5.1	Identificación por pruebas bioquímicas	20
3.5.2	Identificación por discos con polianetol sulfonato sódico	21
3.6	Tratamiento y Control	22
4.	Objetivos	24
5.	Metodología	
5.1	Procesamiento de la muestra	26
5.2	Técnica de Identificación por discos con polianetol sulfonato sódico	29
6.	Resultados	30
7.	Discusión	56

8.	Conclusiones	63
9.	Sugerencias	65
10.	Apéndice	
	10.1 Materiales	66
	10.2 Medios de Cultivo	68
	10.2.1 Preparación del Polienriquecimiento	70
11.	Referencias	71

## 1. RESUMEN

En el presente trabajo se investigaron 250 muestras de exudado vaginal de mujeres que manifestaban secreción vaginal anormal o esta era descubierta durante el exámen ginecológico, para la búsqueda específica de Gardnerella vaginalis, la cual fué aislada sola o en asociación con otros patógenos en 30 muestras (12%) de las 250 pacientes.

Se comparó la identificación de Gardnerella vaginalis por el método tradicional bioquímico y la susceptibilidad a discos que contienen polianetol sulfonato sódico (SPS) al 5%; encontrando que todos los aislamientos de Gardnerella vaginalis (30) fueron positivos a la inhibición con SPS, mientras que sólo el 73.3% (22 aislamientos) fueron positivos a la identificación bioquímica de Gardnerella vaginalis.

El uso de discos con SPS acompañado de la tinción de Gram es un excelente método para la identificación de Gardnerella vaginalis en muestras de exudados vaginales.

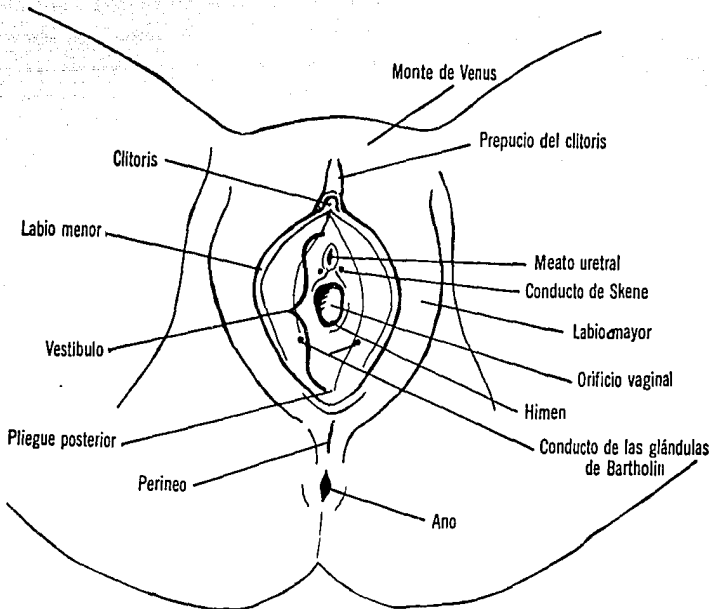
## 2. INTRODUCCION

### 2.1 ANATOMIA Y FISIOLOGIA DE LA VAGINA

La vagina es un órgano que cumple las funciones de vía para la salida del flujo menstrual, de recibir al pene durante el coito y de formar la parte inferior del conducto o canal del parto. Se trata de un conducto musculoso membranoso recubierto por mucosa de unos 10 cm de longitud. La vagina se sitúa entre la vejiga y el recto y está orientada en sentido postero superior, comunica en su extremo superior con el útero y la mucosa vaginal. En la unión de la vagina con el cuello uterino, se forma alrededor de éste una bóveda o fondo de saco de la vagina. La mucosa vaginal consiste desde el punto de vista histológico, en epitelio escamoso estratificado y tejido conectivo dispuestos en un conjunto de pliegues transversos (arrugas vaginales), que le confieren su enorme capacidad de dilatación. La mucosa vaginal no presenta glándulas excepto las glándulas de Bartholín y Skene localizadas en el introito y cerca del orificio uretral. La túnica muscular está compuesta por fibras de músculo liso susceptibles de estiramiento considerable. (43, 50, 71)

La mucosa vaginal almacena grandes cantidades de glucógeno, cuyo desdoblamiento da origen a la presencia de ácidos orgánicos. Estos últimos confieren al medio vaginal un pH bajo que hace lenta la reproducción bacteriana, pero también resulta dañino para los espermatozoides. El líquido seminal neutraliza la acidez de la vagina y con -

ello alarga la vida de los espermatozoides en la propia -  
vagina. (50, 74)



La descarga vaginal normal presenta una mezcla de -  
 varios componentes principalmente: secreciones de las -  
 glándulas de Bartholin y Skene, transudación a través de  
 la pared vaginal, células epiteliales vaginales de desca-  
 mación, moco cervical, fluido endometrial y leucocitos. -  
 (14, 43, 50)

La cantidad de secreción vaginal producida por una -  
 mujer en edad reproductiva está entre 1-3g/24hrs. La de-  
 terminación de la secreción vaginal se ha cuantificado -  
 por el uso de tampones intravaginales o por lavados vagi-  
 nales. La estimulación sexual incrementa la producción de  
 fluido vaginal como resultado de un incremento en la vas-  
 cularidad y fenómeno de humedad de la vagina. El moco cer-  
 vical contribuye de manera importante en la secreción va-  
 ginal. Consta principalmente de agua (90-95%), componen-  
 tes de bajo peso molecular, tales como sales orgánicas e  
 inorgánicas y compuestos de alto peso molecular tales co-  
 mo mucinas, proteínas y macromoléculas. La producción dia-  
 ria de moco varía entre 20-600mg. (43, 50)

Las características de la secreción normal de la va-  
 gina son: (44, 50, 70)

- color blanquecino mucoso
- cantidad mínima o variable
- consistencia flocular
- pH menor a 4.5
- leucocitos escasos
- bacilos gram positivos (*Lactobacillus*)
- células epiteliales de descamación

Los constituyentes orgánicos en mayor proporción de  
 la secreción vaginal son: proteínas, carbohidratos, urea



y ácidos grasos. Las proteínas del fluido vaginal provienen de la transudación de proteínas séricas y de proteínas producidas en el cérvix y en el tracto genital superior, principalmente son albúmina, inmunoglobulinas y aminoácidos. Todas las proteínas presentes en el fluido vaginal son también encontradas en el moco cervical. Las inmunoglobulinas probablemente provienen del moco cervical pero es posible que la vagina por sí misma presente una función inmune. La biosíntesis de IgA o IgG por tejidos vaginales de conejo han sido reportados y células plasmáticas han sido demostradas en la mucosa vaginal. (50)

Mezclas de ácidos orgánicos de bajo peso molecular proporcionan un olor a la vagina dependiente del vapor por la temperatura corporal y del pH vaginal. Estos ácidos son normalmente constituyentes fisiológicos de los fluidos vaginales y su investigación es posible utilizando cromatografía de gas líquido. (12, 50)

La presencia de éstos ácidos proviene de los productos metabólicos de la flora bacteriana. Todas las mujeres producen ácidos, principalmente acético y láctico. La producción normalmente se incrementa durante la mitad del ciclo menstrual y disminuye durante la fase lútea. (43, 50)

### 2.1.1 Flora normal de la vagina

La flora vaginal se ve influenciada por varios factores tales como el glucógeno almacenado en las células epiteliales, glucosa, pH, aporte hormonal, embarazo, traumas, coito, primer método de control, cirugía, antimicrobianos, DIU,\* cremas locales, anticonceptivos orales, etc. (36, 50, 70)

Döderlein, en 1892, describió la predominancia de bacilos gram positivos largos en la flora vaginal normal. Desde entonces, las muestras de fluido vaginal se han clasificado en base a la presencia o ausencia de flora de Döderlein y presencia de ciertos cocos. Los bacilos de Döderlein comprenden un grupo heterogéneo de bacilos acidofílicos gram positivos que generalmente se han referido al género *Lactobacillus*. (14, 44, 50, 70)

Los *Lactobacillus* son los organismos predominantes en la flora vaginal normal, aunque otros estudios han demostrado la presencia de organismos facultativos y anaeróbicos obligados en varias concentraciones como: (44, 50)

Facultativos: *Staphylococcus epidermidis*

Especies de *Lactobacillus*

*Streptococcus* no hemolíticos

Difteroides

Anaeróbicos: *Peptostreptococcus*

*Peptococcus*

Especies de *Bacteroides*

\* DIU: Dispositivo Intra Uterino

Existe una relación inversa entre la concentración de Lactobacillus y otras bacterias tales como: anaeróbicos, coliformes o enterococos. Algunas de estas bacterias son frecuentemente aisladas de infecciones del tracto genital tales como: Staphylococcus aureus, Streptococcus grupo B, Escherichia coli y Clostridium perfringes, Streptococcus anaeróbicos y Bacteroides fragilis en menor proporción. (10, 11, 44, 50, 69)

Estudios periódicos en mujeres han demostrado que las concentraciones de anaerobios se mantienen relativamente constantes durante el período menstrual, mientras que en el período premenstrual existe una disminución en la concentración de bacterias aeróbicas. Por otra parte, se ha encontrado que la flora vaginal es muy similar en el canal cervical inferior y en la parte superior de la vagina. El canal cervical superior es estéril o contiene muy pocos organismos. (44, 50)

Después de la menstruación, el glucógeno contenido en las células epiteliales vaginales se incrementa. El incremento en la producción de ácido láctico disminuye el pH vaginal y éste microambiente ácido favorece el crecimiento de Lactobacillus y otros organismos acidofílicos. El bajo pH inhibe el crecimiento de otras bacterias potencialmente patógenas. (43, 50)

Al igual que el aumento en el glucógeno almacenado en las células epiteliales vaginales el aumento de Lactobacillus es más común en mujeres que utilizan anticonceptivos orales. (50, 74)

Durante el embarazo la prevalencia de Lactobacillus se incrementa y las bacterias anaeróbicas disminuyen, mientras que las enterobacterias, Streptococcus grupo B y

otras bacterias facultativas permanecen sin cambio. (44, 50)

Los mecanismos por los cuales existen estos cambios no son conocidos pero quizás influyan cambios en el pH vaginal, almacenaje de glucógeno y vascularidad. (50, 74)

El incremento en *Lactobacillus* puede servir de protección al producto, en contra de organismos más virulentos al tiempo del nacimiento. Además de un incremento en la prevalencia de anaerobios virulentos como *Bacteroides* y anaerobios facultativos como *Escherichia coli* puedan ocasionar infecciones puerperales. (44, 50)

Algunas mujeres presentan un ecosistema muy delicado que en algunas temporadas, cambia el pH vaginal y esto es suficiente para el establecimiento de organismos patógenos. Tales pacientes comparten la infección con sus compañeros después del coito. (50)

La flora vaginal en niñas recién nacidas y en adolescentes es en la mayoría de los casos colonizada por *Lactobacillus*. Esta bacteria presenta efectos antibacterianos en la vagina observados por la reducción del pH vaginal causada por la actividad metabólica de estas bacterias. (44, 50)

## 2.2 VAGINITIS INESPECIFICA

Se determina Vaginitis Inespecífica, cuando en una -  
descarga vaginal no se aíslan Trichomonas vaginalis, -  
Candida albicans y Neisseria gonorrhoeae. (2, 6, 19, 69,  
77)

Reportes realizados en 1955 por Gardner y Dukes des-  
criben el aislamiento de bastones pequeños gram negativos,  
inmóviles y pleomórficos en el 92% de mujeres con Vagini-  
tis Inespecífica. Esta bacteria es ahora conocida como -  
Gardnerella vaginalis. (38, 42, 45)

En la actualidad la Vaginitis por Gardnerella vaginalis  
es reconocida como Vaginosis Bacteriana, adoptándose éste  
término por la falta de inflamación y de leucocitosis que  
hay en éste padecimiento. (20, 40, 69)

Sin embargo, en la mayoría de los casos Gardnerella  
vaginalis se encuentra asociada con otros géneros anaero-  
bios como Mobiluncus spp., Bacteroides spp., Peptostrep-  
tococcus, los cuales en número adecuado podrían causar -  
los síntomas de la Vaginitis Inespecífica, es decir, la -  
inflamación y la presencia de leucocitos en el exámen -  
fresco. (11, 17, 27, 38, 49, 67)

### 2.2.1 Manifestaciones clínicas

Las pacientes infectadas con Gardnerella vaginalis -  
presentan un incremento variable en la descarga vaginal,  
la cual es blanquecina, homogénea, de consistencia cremo-

sa y de olor desagradable especialmente detectado después del coito. (19, 42)

El moco cervical, el cual es un indicador de infección es característicamente claro indicando la ausencia de alguna respuesta inflamatoria diferenciando ésta a la cervicitis en donde existe un moco cervical purulento. La descarga vaginal de pacientes con Vaginitis Inespecífica cuando es diluida con solución salina y examinada al microscopio muestra 3 aspectos característicos: (1) Una flora predominante de cocobacilos, (2) No hay exceso de leucocitos polimorfonucleares y (3) La presencia de células epiteliales vaginales cubiertas de cocobacilos gram negativos. (19)

La presencia de células "clue" es positiva en un 90% a Gardnerella vaginalis en pacientes con Vaginitis Inespecífica pero no es un signo que indique 100% la infección por ésta bacteria ya que hay otros microorganismos que pueden adherirse a células epiteliales. (9, 14, 19, 38, 45, 51)

El fluido vaginal en éstas pacientes presenta un olor a pescado resultado de la liberación de aminas volátiles cuando el pH del fluido vaginal es elevado, esto puede ser detectado "in vitro" por la adición de hidróxido de potasio al 10% o "in vivo" por la retención del semen el cual contiene una solución bufferada que eleva el pH de la vagina. (16, 19, 20, 31, 48, 68)

La putrescina y la cadaverina son las aminas presentes en mayor cantidad, y se ha encontrado que la producción de éstas aminas se ve incrementada cuando Gardnerella vaginalis está asociada con anaerobios, ya que al cultivar una mezcla de la flora anaeróbica total presente en la -

vagina en medios inoculados con fluido vaginal se detecta la producción de estas aminas además de ácido gama amino butírico (GABA) el cual es también encontrado en fluido vaginal, pero no es producido por Gardnerella vaginalis sino por la flora anaeróbica mixta (Bacteroides spp., Peptostreptococcus anaerobius, Mobiluncus spp., etc.). (9, 13, 16, 38, 67)

pH vaginal: El valor normal de pH de la secreción vaginal es aproximadamente de 4.5 o menos. Un valor arriba de 4.5 se observa en alrededor del 90% de los casos de mujeres con Vaginitis Inespecífica. (2, 9, 16, 38, 48, 69)

El pH de la secreción vaginal depende de la flora acidofílica predominante en la vagina normal constituida generalmente por Lactobacillus. (16, 19)

El incremento del pH se presenta al aumentar la cantidad de bacterias patógenas lo cual trae como resultado una disminución de Lactobacillus y por consiguiente un desequilibrio en el microambiente de la vagina. (16, 48)

Se ha encontrado que un pH óptimo de desarrollo para Gardnerella vaginalis varía de 6.0-6.5. (16, 19, 48)

### 2.2.2 Epidemiología

Gardnerella vaginalis es raramente encontrada antes de la pubertad, la prevalencia en mujeres con Vaginitis Inespecífica es alta, y se ve incrementada en mujeres con mayor actividad sexual o promiscuidad. (19, 68, 78)

El papel que juega Gardnerella vaginalis en pacien-

tes masculinos no es totalmente claro, se le ha asociado con prostatitis y se ha encontrado en casos raros de infección en el tracto urinario en hombres. Se ha aislado también de sangre en pacientes con septicemia seguida de prostatectomía. (9, 13, 19, 57, 76, 82)

Gardnerella vaginalis se ha aislado de la uretra de un 70-90% de casos en donde la mujer estaba infectada. La colonización de la uretra aparece como un estado asintomático de la enfermedad. (2, 19, 35, 68, 79)

La infección por Gardnerella vaginalis es menor en mujeres cuya pareja usa preservativo que en mujeres que toman pastillas anticonceptivas o emplean DIU, posiblemente se deba a cambios hormonales que afectan la flora vaginal normal y favorecen el desarrollo de anaerobios (pastillas anticonceptivas) y a irritación mecánica local (DIU), lo que incrementa el número de leucocitos y aumenta la secreción de moco elevando ligeramente el pH vaginal. (1, 29, 37)

Se ha encontrado un alto índice de reinfecciones en pacientes sin tratamiento. (16, 40)

La Vaginitis por Gardnerella es reconocida como una enfermedad de transmisión sexual. Esta bacteria es raramente encontrada en niñas, en mujeres vírgenes adultas y en otras enfermedades transmitidas sexualmente es frecuentemente aislada. (1, 20, 68, 70, 76)

En Estados Unidos, la Vaginitis por Gardnerella vaginalis ocupa de un 10-15% en mujeres casadas con ocupación de oficina, más del 40% en mujeres solteras activas sexualmente y más del 60% en ciertos grupos de mujeres tales como prostitutas. (20, 70)



### 3. GENERALIDADES

#### 3.1 GENERO GARDNERELLA

La Vaginitis Inespecífica fué reconocida por primera vez en 1955 por Gardner y Dukes quienes propusieron el nombre de Haemophilus vaginalis al agente causal de ésta enfermedad. El nombre fué ampliamente aceptado hasta que, en 1961, Lapage demostró que no requería de los factores X y V para su crecimiento, por lo que fué reclasificado en el género Corynebacterium llamándolo Corynebacterium vaginale, ya que éste microorganismo se teñía como gram positivo y se agrupaba en forma de letras chinas, características de Corynebacterium. Esta reclasificación se basó también en algunas características bioquímicas y de crecimiento, sin embargo, estudios taxonómicos más definitivos sobre la composición de ácidos grasos, la hibridación de DNA, comparando los géneros Haemophilus y Corynebacterium sugirieron que el microorganismo no correspondía a ninguno de éstos géneros por lo que fué transferido a un nuevo género llamado Gardnerella vaginalis como tributo a las observaciones iniciales de Gardner. (20, 22, 24, 36, 70)

### 3.2 MORFOLOGIA

Gardnerella vaginalis es un cocobacilo gram variable con tamaño de 0.4 por 1-1.5  $\mu\text{m}$ , no esporulado, no presenta cápsula ni flagelo. En un estudio por microscopía electrónica con tinción negativa, se encontró que algunos de éstos microorganismos presentan pilis. Gardnerella vaginalis se agrupa sola o en pares y algunas veces en empalizadas, con un arreglo parecido a *Corynebacterium*. (22, 25, 59, 70)

Gardnerella vaginalis tiene una pared celular muy delgada con características gram negativas de tinción, es aparentemente laminar. No muestra una membrana externa. Por otro lado, extractos de pared celular examinados por métodos específicos para lipopolisacáridos dieron reacción negativa para la endotoxina en el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus*. Sin embargo, en extracciones con fenol acuoso y calor utilizando material preparado de la pared celular con el fin de separar lipopolisacáridos o sustancias parecidas, se obtuvieron resultados positivos en dicho ensayo, pero sólo a muy altas concentraciones. (59, 70)

Estudios ultraestructurales y de composición química muestran que ésta bacteria es inequívocamente gram positiva. La naturaleza de la pared celular de Gardnerella vaginalis ha sido muy discutida. Generalmente llega a tenerse de gram positivo quizás por la formación de un septo durante la división celular que permite la retención del cristal violeta. (59)

El patrón de sensibilidad a antibióticos de Gardnerella vaginalis también se parece al de las bacterias gram positivas. Microscopía electrónica de transmisión de secciones de la pared celular muestran que es delgada y en algunos casos laminar y su estructura ha sido reportada por varios investigadores como típicamente gram positiva trilaminar. (59, 70)

Análisis de la composición de la pared celular de Gardnerella vaginalis revela que solo el 20% del total del peso de la pared celular es péptido glicán, lo cual es quizá bajo para un organismo gram positivo. También se encontraron aminoácidos incluyendo lisina pero no diaminopimelato presente en el péptido glicán. Por esto, algunos describen a éste organismo como una bacteria gram negativa. El ácido ribitol teicoico fué reportado ausente en la pared celular de Gardnerella vaginalis pero éste no está siempre presente en la pared celular de gram positivos. No se encontró heptosa en la pared celular de Gardnerella vaginalis. (59)

### 3.3 PATOGENICIDAD

La patogenicidad de un agente infeccioso es una medida que define la posibilidad de que un microorganismo cause una infección clínica cuando esté presente. La enfermedad puede ser aparente o inaparente para el paciente. La infección vaginal asociada con Gardnerella vaginalis es superficial y no caracterizada por invasión de tejido. (42, 70)

Por muchos años, ginecólogos consideraron a Gardnerella vaginalis como un organismo con baja virulencia y patogenicidad y algunos sugirieron que forma parte de la flora vaginal normal. Sin embargo, Gardner encontró que este organismo es responsable de síntomas de irritación vaginal leve en 90% de casos de Vaginitis previamente clasificadas como no específicas. (21, 45, 72, 76)

El hallazgo de que Gardnerella vaginalis pueda ser aislada en la flora vaginal de mujeres aparentemente sanas tiene gran dificultad en su interpretación, se piensa que esta bacteria por si sola no puede causar la infección sintomática, pero en presencia de anaerobios puede ocasionar una descarga vaginal de olor desagradable. Otra explicación es la existencia de biotipos no patógenos de Gardnerella vaginalis encontrados en pacientes asintomáticas. (2, 5, 19, 30, 35, 62, 70)

En la actualidad se considera a Gardnerella vaginalis como un patógeno vaginal debido a que:

- Es el organismo predominante en la vagina de pacientes con Vaginitis Inespecífica.
- Es la única bacteria aislada constantemente en vaginas de estas pacientes.
- Es raramente aislada de pacientes que no presentan la infección clínica.
- Puede reinfectar la vagina o transmitirse a la pareja sexual.
- La enfermedad clásica se desarrolla cuando mujeres sanas son inoculadas con material de una vagina infectada.

Gardnerella vaginalis es capaz de atacar células -  
epiteliales tanto "in vivo" como "in vitro" originando -  
las células "clue" características de una Vaginosis Bacte-  
riana. (11, 45, 60, 62, 74)

El mecanismo de adhesión de Gardnerella vaginalis a  
las células epiteliales de descamación es a través de pro-  
teínas llamadas adhesinas que son termolábiles y son afec-  
tadas por la luz ultravioleta. Varias investigaciones de  
cepas de ésta bacteria mostraron que Gardnerella vaginalis -  
presenta un mayor grado de adhesión a células epiteliales  
que las bacterias presentes en la flora vaginal normal. -  
Este es un factor muy importante en la colonización de -  
las superficies de membranas mucosas para ocasionar la -  
infección. (11, 60, 61, 62, 76)

La existencia de pilis sobre las cepas de Gardnerella  
vaginalis está relacionada con la adherencia a células -  
epiteliales vaginales y juegan un papel muy importante en  
la patogenicidad de la Vaginosis Bacteriana. (8, 32, 60,  
70)

Gardnerella vaginalis es también ocasionalmente -  
aislada de la uretra en hombres sanos. Recientemente se -  
ha sugerido que esta bacteria es el posible agente etioló-  
gico de infecciones severas como endometritis, cistitis,  
amnionitis, septicemia neonatal y meningitis. Sin embargo,  
los componentes de patogenicidad de G.vaginalis no están  
completamente caracterizados, a excepción de su habilidad  
para adherirse a las células epiteliales. (9, 13, 23, 33,  
46, 57, 76, 82)

Estudios recientes "in vitro" sobre la capacidad de  
Gardnerella vaginalis para producir zonas de beta hemólisis  
alrededor de las colonias sobre placas de agar que -

contienen sangre humana han demostrado que ésta bacteria produce y libera al medio una proteína con actividad citolítica hacia eritrocitos y células nucleadas tales como - células endoteliales y neutrófilos. (52, 58, 64)

Esta citolisina tiene un peso molecular de 61-63 - KDa, es lábil al calor y es inactivada por proteasas tales como tripsina y alfa quimotripsina y agentes reductores como mercaptoetanol y ditiotreitól, lo que sugiere que los enlaces disulfuro pueden ser relevantes para la función de la molécula. Esta toxina muestra una marcada especificidad para eritrocitos humanos ya que eritrocitos de caballo, conejo, oveja y cobayo fueron resistentes a esta citolisina aún a concentraciones 100 veces mayor que las que causaban efecto sobre eritrocitos humanos. (58)

### 3.4 NUTRICION Y CRECIMIENTO

Gardnerella vaginalis es una bacteria fastidiosa en cuanto a requerimientos para su crecimiento. (53, 70, 76)

Para su crecimiento, Gardnerella vaginalis requiere de nitrógeno, vitaminas, bases púricas y pirimídicas y - vitaminas del grupo B como son: tiamina, riboflavina, - ácido nicotínico, ácido biotínico y una o más bases de - ácidos nucleicos. (53, 70)

Gardnerella vaginalis no necesita para su crecimiento de la hemina (factor X) y tampoco de la nicotinamida - adenina dinucleótido: NAD (factor V), sin embargo se ha encontrado que un factor en las células rojas es necesario para su crecimiento. (20, 24, 70, 73)

Para un eficiente aislamiento de Gardnerella vaginalis de muestras clínicas es necesario usar un medio rico como el agar - Columbia o agar Casman suplementado con 5% de sangre humana, de conejo o de caballo, y con un carbohidrato fermentable como el almidón o la dextrosa. (6, 13, 41, 70, - 72)

Entre otros medios para el aislamiento de Gardnerella vaginalis se encuentra el agar peptona-almidón dextrosa, - agar almidón, agar chocolate, agar Columbia-ácido colistín nalidíxico, etc. (25, 53, 66 72)

Gardnerella vaginalis es un microorganismo de crecimiento lento en una atmósfera de 5-7% de CO<sub>2</sub>. Este microorganismo desarrolla colonias pequeñas puntiformes, redondas de una pequeña zona difusa de beta hemólisis, las cuales miden de 0.4 a 0.5 mm de diámetro, circulares, - simétricas, convexas y grisáceas después de 24 a 48 horas de incubación a 37°C. (12, 25, 56, 64, 70)

### 3.5 DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

#### 3.5.1 Identificación por pruebas bioquímicas

Gardnerella vaginalis son cocobacilos inmóviles, - gram variable negativo, que presenta las siguientes características bioquímicas: (5, 25, 29, 70, 73)

Prueba bioquímica	Resultado
Catalasa	(-)
Oxidasa	(-)
Indol	(-)
Ureasa	(-)
Producción de H <sub>2</sub> S	(-)
Ornitina descarboxilasa	(-)
Voges Proskauer	(-)
Rojo de metilo	(+)
Hidrólisis del hipurato	(+)
Hidrólisis del almidón	(+)
Producción de ácido de:	
glucosa	(+)
dextrosa	(+)
maltosa	(+)
ribosa	(+)
almidón	(+)
lactosa	(d)



### 3.5.2 Identificación por discos con polianetol sulfonato sódico

El polianetol sulfonato de sodio (SPS) es un anti-coagulante que es añadido de rutina a la mayoría de los medios de hemocultivo comerciales para evitar la coagulación de la muestra de sangre, para inhibir la fagocitosis y el complemento; precipita lipoproteínas, fibrinógeno, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, e inmunoglobulinas G. Inactiva aminoglucósidos y polimixinas. (34, 37, 55, 81)

Recientemente se encontró que Gardnerella vaginalis es inhibida por el polianetol sulfonato sódico en medios de cultivo suplementados con sangre, lo cual podría considerarse como un método presuntivo para la identificación de ésta bacteria. (34, 55, 56)

La prueba consiste en impregnar discos de papel filtro de 6 mm de diámetro con 25  $\mu$ l de solución de polianetol sulfonato sódico al 5% y colocarlos sobre una placa de agar Brucella previamente sembrada con las colonias aisladas sospechosas de Gardnerella vaginalis e incubar a 37°C por 24 a 48 horas en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. (34, 56)

Una prueba positiva requiere de una zona de inhibición mayor o igual a 12 mm de diámetro. (34, 56, 80)

### 3.6 TRATAMIENTO Y CONTROL

En la actualidad el agente más eficaz contra la Vaginosis Bacteriana es el metronidazol, que es activo contra Gardnerella vaginalis y anaerobios en la mayoría de los casos. (4, 6, 42)

La dosis ideal y la duración del tratamiento ha sido muy discutida. Se recomienda tratar la Vaginosis con 500 mg de metronidazol, ingeridos dos veces al día durante siete días normalizando la flora vaginal normal constituida principalmente por *Lactobacillus* spp. (3, 4, 15, 18, 26, 28, 31, 40, 47, 75)

El metronidazol se conoce como una droga indeseable. Se sabe que es carcinógeno en ratas y ratones y mutágeno en las bacterias, por lo tanto, no debe administrarse durante el embarazo ni para las infecciones asintomáticas; además, el metronidazol ocasiona trastornos en el Sistema Nervioso Central, alteraciones sanguíneas y reacciones secundarias como vómitos, gastritis y náuseas. (39)

Como otra posibilidad, se incluyen otros antibióticos como la penicilina G, ampicilina y eritromicina en dosis oral de 500 mg, cuatro veces al día durante siete días, pero son menos eficaces en situaciones clínicas, aunque constituyen una opción terapéutica para personas en quienes está contraindicado el metronidazol. (19, 25, 54, 65)

La baja efectividad de estos antibióticos en el tratamiento de la Vaginosis asociada con Gardnerella vaginalis, podría explicarse por una posible degradación de la penicilina y una resistencia por un sinergismo entre los

microorganismos asociados con éste síndrome. El pH vaginal interfiere aparentemente con la actividad de productos como la eritromicina; y las cefalosporinas presentan una acción muy baja contra la Gardnerella vaginalis lo mismo que las sulfonamidas "in vitro". (39)

Una terapia efectiva en la Vaginosis Bacteriana debe consistir en la elección de una droga que actúe contra Gardnerella y además contra bacterias anaeróbicas que se encuentren en sinergismo con ésta. (39, 47)

Se recomienda un tratamiento de rutina a los compañeros sexuales de las pacientes con ésta enfermedad ya que es una enfermedad transmitida sexualmente. El microorganismo se ha identificado en el 96% de compañeros de mujeres con la enfermedad clínica. En parejas de mujeres que usaban el condón la enfermedad no se presentó. (1, 39, 42, 76)

#### 4. OBJETIVOS

1. Comparar el método tradicional bioquímico y el uso de discos con polianetol sulfonato sódico (SPS) para el aislamiento de Gardnerella vaginalis a partir de exudados vaginales.

2. Comprobar la sensibilidad de Gardnerella vaginalis a discos con SPS al 5% sobre agar Brucella.

3. Determinar la incidencia de Gardnerella vaginalis en muestras de exudado vaginal en la Clínica de Medicina Familiar Tlalnepantla ISSSTE.

4. Asociar a Gardnerella vaginalis con la Vaginitis Inespecífica en exudados vaginales tomados en la Clínica de Medicina Familiar Tlalnepantla ISSSTE.

## 5. METODOLOGIA

Para este estudio se tomaron 250 muestras de exudado vaginal de mujeres que acudían de Agosto de 1991 a Enero de 1992 a consulta de control de la natalidad y/o ginecología en la Clínica de Medicina Familiar Tlalnepantla - ISSSTE, que manifestaban secreción vaginal anormal o esta era descubierta durante el exámen ginecológico. La muestra fué tomada del endocervix y fondo de saco vaginal.

Al momento de la toma de las muestras se pidió a cada paciente que contestara el siguiente cuestionario:

Datos anamnésicos:

Nombre de la paciente: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ Estado civil: \_\_\_\_\_

Actividad sexual: \_\_\_\_\_

Medio de control: \_\_\_\_\_

Tratamiento actual: \_\_\_\_\_

Se hicieron las siguientes observaciones de las pacientes que presentaban secreción:

Flujo: Escaso ( ) Moderado ( ) Abundante ( )

Olor: \_\_\_\_\_

Color: \_\_\_\_\_

Consistencia: \_\_\_\_\_

Inflamación: \_\_\_\_\_

Ulceración: \_\_\_\_\_

Prurito: \_\_\_\_\_

Otras: \_\_\_\_\_

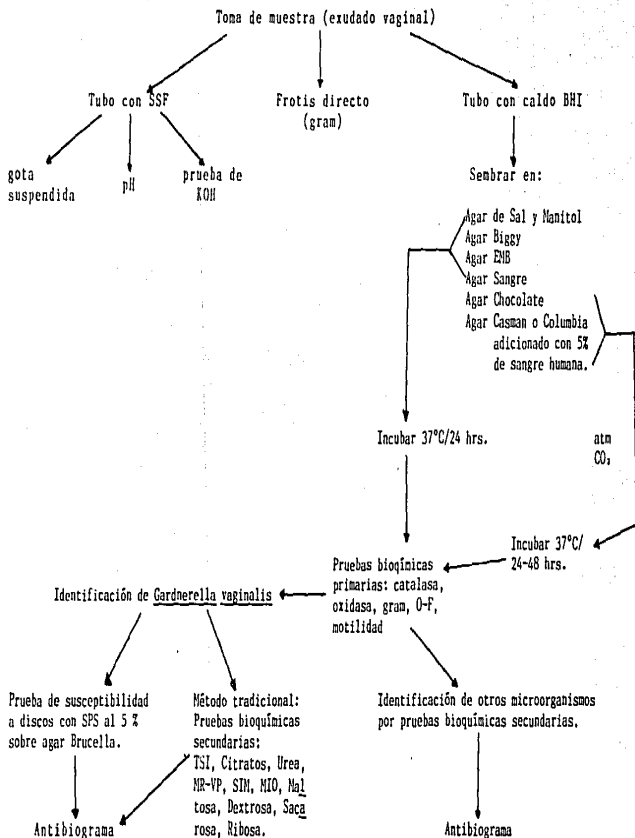
Y posteriormente se inició el diagnóstico de cada paciente de la siguiente manera:

### 5.1 Procesamiento de la muestra

1. Para la toma de muestra de exudado vaginal se utilizó el espejo vaginal y 3 hisopos; uno de ellos se introdujo en solución salina fisiológica al 0.85%, se realizó la gota suspendida y se determinó el pH; con otro hisopo se colocó un poco de la secreción sobre un portaobjetos para realizar la prueba de aminas (KOH) y en un segundo portaobjetos se hizo un frotis directo de la misma para observar la presencia de células "clue" por medio de la tinción de Gram; un último hisopo se introdujo en caldo BHI y posteriormente se sembró en los siguientes medios: agar Biggy, agar Casman o agar Columbia adicionado con 5% de sangre humana, agar Chocolate, agar de Eosina y Azul de Metileno o agar MacConkey, agar de Sal y Manitol y agar Sangre. Se incubó a 37°C/24 horas, a excepción del agar Chocolate y agar Casman que se incubaron con una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C/24 a 48 horas.
2. Una vez que se desarrolló el crecimiento bacteriano se procedió a la identificación por pruebas bioquímicas primarias: catalasa, oxidasa, gram, motilidad y Oxidación-Fermentación.

3. Se realizó la identificación de los microorganismos que requieren pruebas bioquímicas secundarias y a todos los microorganismos aislados la prueba de susceptibilidad a discos con polianetol sulfonato sódico al 5%.
  
4. Se identificó específicamente a Gardnerella vaginalis y se realizó la prueba de sensibilidad a antimicrobianos en agar Mueller-Hinton adicionado con 5% de sangre humana y polienriquecimiento para microorganismos exigentes.

## METODO Y PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA





5.2 Técnica de Identificación por discos  
con polianetol sulfonato sódico

1. Preparación de la solución de SPS al 5%.

El polianetol sulfonato sódico (SIGMA) se disuelve en agua destilada para obtener una solución al 5%, - la cual es esterilizada por filtración. Esta solución es estable por más de 2 meses en refrigeración. (34, - 56)

2. Preparación de los discos con SPS.

25  $\mu$ l de la solución de SPS al 5% son inoculados en condiciones de esterilidad a cada uno de los discos de papel filtro de 6 mm de diámetro y son guardados en un frasco estéril. Los discos con SPS son estables por 6 meses cuando son almacenados a temperatura ambiente. (56, 80)

3. Prueba de susceptibilidad a discos con SPS.

Se coloca un disco con SPS sobre la superficie - de una placa de agar Brucella con 5% de sangre humana previamente inoculada con una asada de la bacteria a - probar y se incuba de 24 a 48 horas a 37°C con una - atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> para bacterias anaeróbicas.

Una prueba positiva requiere una zona de inhibición mayor o igual a 12 mm de diámetro.

## 6. RESULTADOS

El número de pacientes estudiadas fué de 250 mujeres pertenecientes al medio socioeconómico medio y bajo, a las cuales se les tomó la muestra de secreción vaginal del endocérnix y fondo de saco vaginal para la búsqueda específica de Gardnerella vaginalis.

Gardnerella vaginalis se identificó por medio de:

- frotis directo (observación de células pista)
- prueba de aminas (KOH al 10%) a partir de la secreción.
- cultivo para la observación de la morfología colonial y la identificación bioquímica.
- susceptibilidad a discos con polianetol sulfonato sódico (SPS) al 5%.

A partir de las 250 muestras investigadas se obtuvieron los siguientes resultados (en orden decreciente):

Staphylococcus epidermidis se aisló en 67 muestras que corresponden al 26.8%; 57 aislamientos (22.8%) que corresponden al grupo de las Enterobacterias; Gardnerella vaginalis con 30 aislamientos que corresponden al 12%; 28 aislamientos (11.2%) correspondieron a Candida albicans; Streptococcus alfa hemolítico se aisló en un 3.6% (9 aislamientos); Corynebacterium spp. en un 2.4% (6 aislamientos); Staphylococcus aureus con 4 aislamientos (1.6%); Trichomonas vaginalis con 3 aislamientos (1.2%) y Peptostreptococcus anaerobius en un 0.4% (1 aislamiento).

En 51 aislamientos (20.4%) se encontró Desarrollo de Flora Bacteriana Normal (*Lactobacillus* spp. y *Streptococcus* gama hemolítico) y en 3 aislamientos (1.2%) no hubo Desarrollo Bacteriano a las 48 horas de incubación. (Tabla I)

Se hizo un análisis estadístico ( $X^2$ ) de éstos resultados y se encontró que *Gardnerella vaginalis*, ocupa uno de los primeros lugares en incidencia junto con *Escherichia coli* y *Candida albicans*, no encontrándose diferencias significativas entre el número de aislamientos de éstos microorganismos.

En este estudio se pudo observar la presencia de 2 patógenos en una misma paciente, como es el caso de *Candida albicans* que se aisló en asociación con *Escherichia coli* y con *Staphylococcus aureus*. Por otra parte, *Gardnerella vaginalis* se aisló junto con *Escherichia coli* y con *Trichomonas vaginalis*. Dichas asociaciones pueden observarse en la Tabla II.

Las características del flujo vaginal y el cuadro clínico originado por los principales microorganismos aislados, se muestran en la Tabla III; en donde se observa que diferentes microorganismos provocan un flujo con características semejantes; en todos los casos existió inflamación y sólo pacientes con *Candida albicans* presentaron prurito.

A todas las muestras se les midió el pH, y se hizo la prueba de aminas (KOH al 10%); además en el exámen

fresco de la secreción se determinó la presencia de leucocitos y en el frotis directo con la tinción de Gram se observó si existían células "clue" y *Lactobacillus*. La Tabla IV muestra los resultados obtenidos en las pruebas anteriores para los microorganismos de mayor importancia en este estudio.

Al tomar en cuenta la edad de las pacientes con *Gardnerella vaginalis*, se encontró que el mayor porcentaje de aislamientos de ésta bacteria se dió entre los 21 y 40 años de edad, lo cual se indica en la Tabla V.

La correlación entre la presencia de células "clue" y la prueba de aminas para la posible identificación de *Gardnerella vaginalis* se muestra en la Tabla VI.

La prueba de sensibilidad a discos con SPS se realizó a todos los microorganismos aislados encontrándose que solo *Gardnerella vaginalis* y *Peptostreptococcus anaerobius* resultaron sensibles al SPS lo cual está reportado en otros estudios. (34, 56, 80, 81) (Tabla VII)

En la Tabla VIII se muestra que la mayoría de los cultivos de *Gardnerella vaginalis* sobre agar Casman con 5% de sangre humana presentan hemólisis beta, lo cual no se observó en ninguno de los microorganismos aislados.

Las mujeres que presentaron *Gardnerella vaginalis* se agruparon por el método de control para determinar si existe alguna relación entre el aislamiento de ésta bacteria con el método de control utilizado. (Tabla IX)

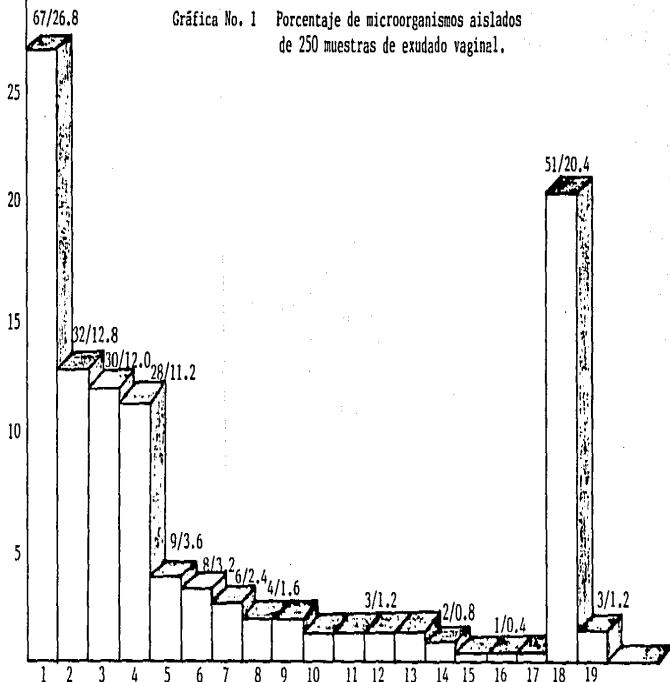
Tabla I. Microorganismos aislados de 250 muestras de exudado vaginal.

MICROORGANISMOS	NO. DE AISLAMIENTOS	PORCENTAJE (%)
<u>Staphylococcus epidermidis</u>	67	26.8
<u>Escherichia coli</u>	32	12.8
<u>Gardnerella vaginalis</u>	30	12.0
<u>Candida albicans</u>	28	11.2
Streptococcus alfa hemolítico	9	3.6
<u>Klebsiella edwardsii</u>	8	3.2
Corynebacterium spp.	6	2.4
<u>Klebsiella ozaenae</u>	4	1.6
<u>Staphylococcus aureus</u>	4	1.6
<u>Enterobacter aerogenes</u>	3	1.2
<u>Klebsiella aerogenes</u>	3	1.2
<u>Proteus vulgaris</u>	3	1.2
<u>Trichomonas vaginalis</u>	3	1.2
<u>Proteus stuartii</u>	2	0.8
<u>Klebsiella atlantae</u>	1	0.4
<u>Klebsiella oxytoca</u>	1	0.4
<u>Peptostreptococcus anaerobius</u>	1	0.4
Desarrollo de Flora Bacteriana Normal (DFBN)	51	20.4
No hubo desarrollo bacteriano	3	1.2

Nota: Es mayor del 100 % debido a la asociación de más de un patógeno en una misma paciente.

%

Gráfica No. 1 Porcentaje de microorganismos aislados de 250 muestras de exudado vaginal.



- |                                      |                                   |   |
|--------------------------------------|-----------------------------------|---|
| 1. <u>Staphylococcus epidermidis</u> | 7. <u>Corynebacterium spp.</u>    | 13. <u>Trichomonas vaginalis</u>            |
| 2. <u>Escherichia coli</u>           | 8. <u>Klebsiella ozaenae</u>      | 14. <u>Proteus stuartii</u>                 |
| 3. <u>Gardnerella vaginalis</u>      | 9. <u>Staphylococcus aureus</u>   | 15. <u>Klebsiella atlantae</u>              |
| 4. <u>Candida albicans</u>           | 10. <u>Enterobacter aerogenes</u> | 16. <u>Klebsiella oxytoca</u>               |
| 5. <u>Streptococcus</u> α-hemolítico | 11. <u>Klebsiella aerogenes</u>   | 17. <u>Peptostreptococcus anaerobius</u>    |
| 6. <u>Klebsiella edwardsii</u>       | 12. <u>Proteus vulgaris</u>       | 18. <u>Desarrollo de Flora Bact. Normal</u> |
|                                      |                                   | 19. <u>No hubo desarrollo bacteriano</u>    |

Análisis estadístico para determinar el lugar que ocupó Gardnerella vaginalis en frecuencia de patógenos en este estudio. [ji cuadrada ( $\chi^2$ )]

$$\chi^2 = \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Comparación entre Escherichia coli, Candida albicans y Gardnerella vaginalis.

Ho: No hay diferencias significativas entre el número de aislamientos de éstos microorganismos.

Hi: Si hay diferencias significativas entre el número de aislamientos de éstos microorganismos.

Microorganismo	Frecuencia observada ( $O_i$ )	Frecuencia esperada ( $E_i$ )
<u>Escherichia coli</u>	32	30
G. vaginalis	30	30
C. albicans	28	30

$$\chi^2 = \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

$$x_c^2 = \frac{(32 - 30)^2}{30} + \frac{(30 - 30)^2}{30} + \frac{(28 - 30)^2}{30}$$

$$x_c^2 = 0.2666$$

Número de microorganismos (n) = 3

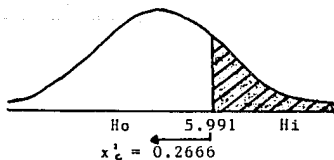
$$\begin{aligned} g1 &= n - 1 \\ &= 3 - 1 \\ &= 2 \end{aligned}$$

De tablas:

$$g1 = 2$$

$$\alpha = 0.95$$

$$x_{\alpha}^2 = 5.991$$



El valor de  $x^2$  calculado ( $x_c^2$ ) indica que no hay diferencias significativas entre el aislamiento de éstos microorganismos.



Tabla II. Asociación de Patógenos

Patógeno	Más	Número de casos	Porcentaje (%)
<u>Candida albicans</u>	<u>Escherichia coli</u>	5	2
	<u>Staphylococcus aureus</u>	1	0.4
<u>Gardnerella vaginalis</u>	<u>Escherichia coli</u>	1	0.4
	<u>Trichomonas vaginalis</u>	2	0.8

Tabla III. Características físicas del flujo vaginal y el cuadro clínico originado por los principales microorganismos aislados en este estudio.

Microorganismo	Flujo	Olor	Color	Consistencia	Inflamación	Prurito
<u>Candida albicans</u>	Abu	no fétido	blanco	mucoide grumoso	+	+
Enterobacterias	Mod	no fétido	blanco	mucoide	+	-
<u>Gardnerella vaginalis</u>	Abu	fétido	blanco	homogéneo	+	-
<u>Staphylococcus epidermidis</u>	Mod	no fétido	blanco	mucoide	+	-
<u>Trichomonas vaginalis</u>	Abu	fétido	verdoso	espumoso	+	-
Desarrollo de Flora Bacteriana Normal	Mod	no fétido	blanco	grumoso	+	-

Mod: Moderado

Abu: Abundante

Tabla IV. Características encontradas en el exámen fresco y tinción de Gram de los exudados vaginales y su posible relación con los patógenos más frecuentes.

Microorganismo	pH	Prueba de aminas	Leucocitos	Células "clue"	Lactobacillus
<u>Candida albicans</u>	4.5-5.0	Negativa	0-10	-	+
Enterobacterias	5.5-6.5	Negativa	10-15	-	+
<u>Gardnerella vaginalis</u>	6.0-6.5	Positiva	escasos	+	poco frecuentes
<u>Staphylococcus epidermidis</u>	5.0-6.0	Negativa	10-12	-	+
<u>Trichomonas vaginalis</u>	6.0-6.5	Positiva	Incontables	-	poco frecuentes
Desarrollo de Flora Bacteriana Normal	5.0-5.5	Negativa	4-6	-	+

Tabla V. Distribución por edades de pacientes con Gardnerella vaginalis en muestras de exudado vaginal.

Edad en años	Número de pacientes	Porcentaje (%)
10-20	1	3.33
21-30	10	33.33
31-40	10	33.33
41-50	7	23.33
51-60	2	6.66
Total	30	100.00

Observar Gráfica No. 2

Gráfica No. 2 Distribución por edades de pacientes con Gardnerella vaginalis en muestras de exudado vaginal.

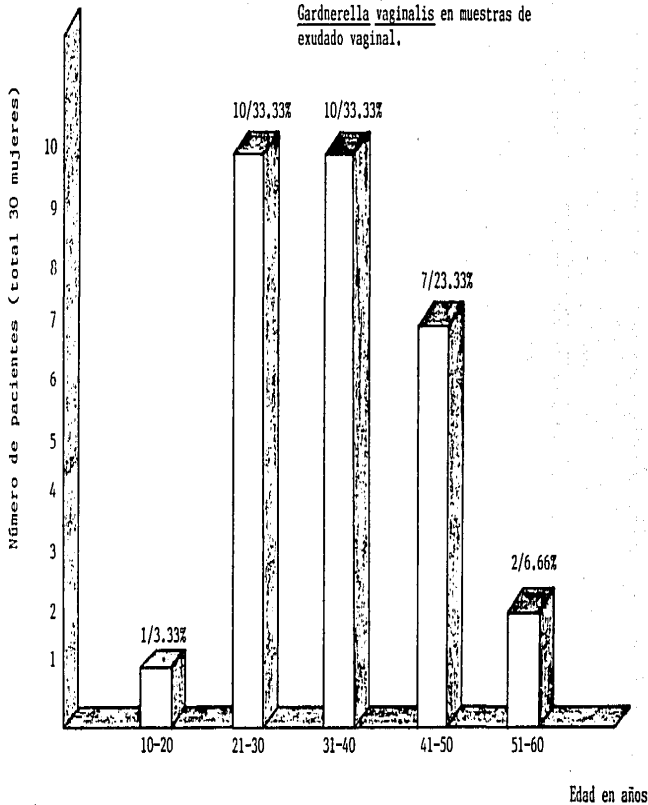
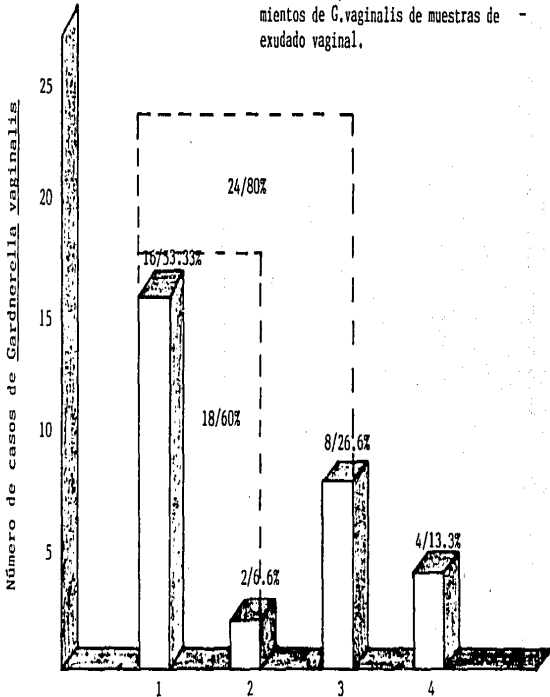


Tabla VI. Correlación entre la presencia de células "clue" y los resultados de la prueba de aminos (KOH) en 30 aislamientos de Gardnerella vaginalis de muestras de exudado vaginal.

	Presencia de Células "clue"	Prueba de aminas positiva	Ausencia de Células "clue"	Prueba de aminas negativa
Número de casos	18/30	24/30	12/30	6/30
Prueba de aminas positiva	16/30	-/30	8/30	-/30
Prueba de aminas negativa	2/30	-/30	4/30	-/30

Observar Gráfica No. 3

Gráfica No. 3 Correlación entre la presencia de células "clue" y la prueba de aminas en 30 aislamientos de *G.vaginalis* de muestras de exudado vaginal.



1. Presencia de células "clue" y prueba de aminas positiva
2. Presencia de células "clue" y prueba de aminas negativa
3. Ausencia de células "clue" y prueba de aminas positiva
4. Ausencia de células "clue" y prueba de aminas negativa

Tabla VII. Diámetro de inhibición de Gardnerella vaginalis con discos SPS.

Diámetro de Inhibición con SPS (mm)	Número de muestras
16	6
17	10
18	10
19	3
21	1

Observar Figura No. 1



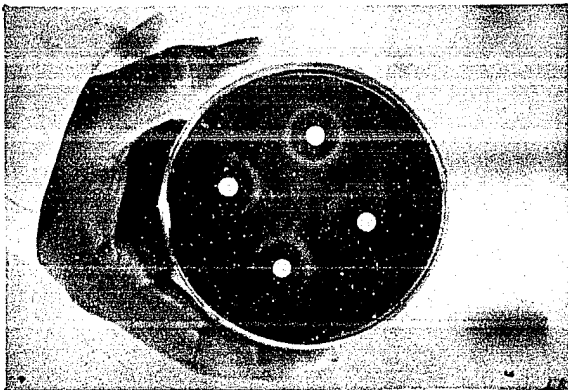


Fig. 1 Halos de inhibición encontrados en la prueba de susceptibilidad a discos con SPS.

Tabla VIII. Comparación entre la identificación bioquímica y la identificación por discos con polianetol sulfonato sódico (SPS).

Número de muestras 250	número de aislamientos	%	Identifica- ción bioquí- mica	%	Identifica- ción con SPS	%
<i>Corynebacterium</i> spp	6	2.4	6	100	0	0
Enterobacterias	57	22.8	57	100	0	0
<u>Gardnerella vaginalis</u>	30	12.0	22	73.3	30	100
<u>Peptostreptococcus anaerobius</u>	1	0.4	1	100	1	100
<u>Staphylococcus aureus</u>	4	1.6	4	100	0	0
<u>Staphylococcus epidermidis</u>	67	26.8	67	100	0	0
Streptococcus alfa hemolítico	9	3.6	9	100	0	0
No hubo desarrollo bacteriano	3	1.2	0	0	0	0
Desarrollo de Flora Bacteriana Normal	51	20.4	51	100	0	0

Nota: La identificación por discos con polianetol sulfonato sódico es positiva para Gardnerella vaginalis y Peptostreptococcus anaerobius.

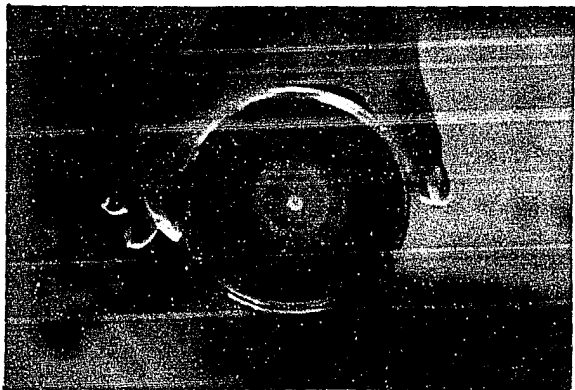


Fig. 2 Inhibición de Gardnerella vaginalis por discos con SPS al 5%.

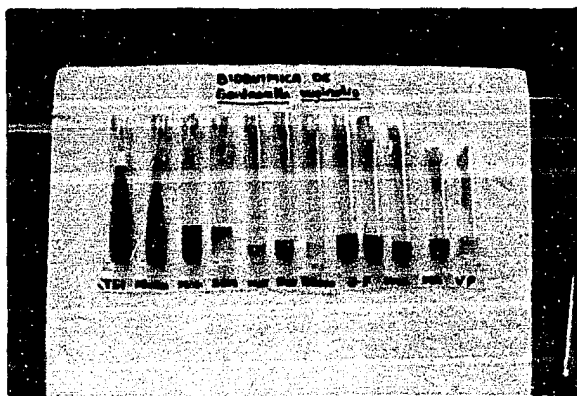


Fig. 3 Bioquímica de Gardnerella vaginalis.

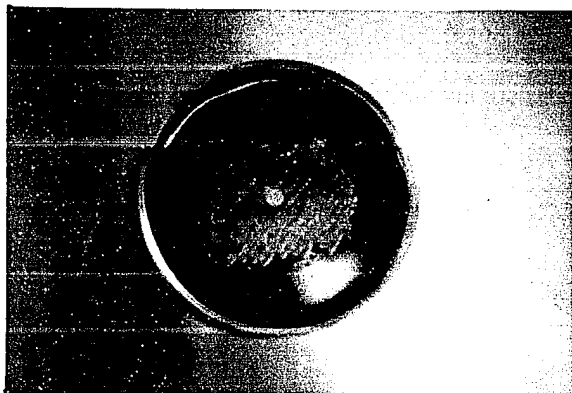


Fig. 4 Prueba negativa de susceptibilidad a discos con SPS.

Tabla IX. Correlación entre la inhibición por discos con polianetol sulfonato sódico (SPS) y la producción de hemólisis beta para la identificación de Gardnerella vaginalis.

Número de muestras 250	Inhibición por discos con SPS (> 12 mm)	Hemólisis beta sobre agar Casman y agar Brucella con 5% de sangre humana	%
<u>Corynebacterium spp.</u>	0	0	0
Enterobacterias	0	0	0
<u>Gardnerella vaginalis</u>	30	25	83.3
<u>Peptostreptococcus anaerobius</u>	1	0	0
<u>Staphylococcus aureus</u>	0	0	0
<u>Staphylococcus epidermidis</u>	0	0	0
Streptococcus alfa hemolítico	0	0	0
Desarrollo de Flora Bacteriana Normal	0	0	0



Fig. 5 Inhibición por discos con SPS y producción de beta hemólisis positiva sobre agar Brucella suplementado con 5% de sangre humana.

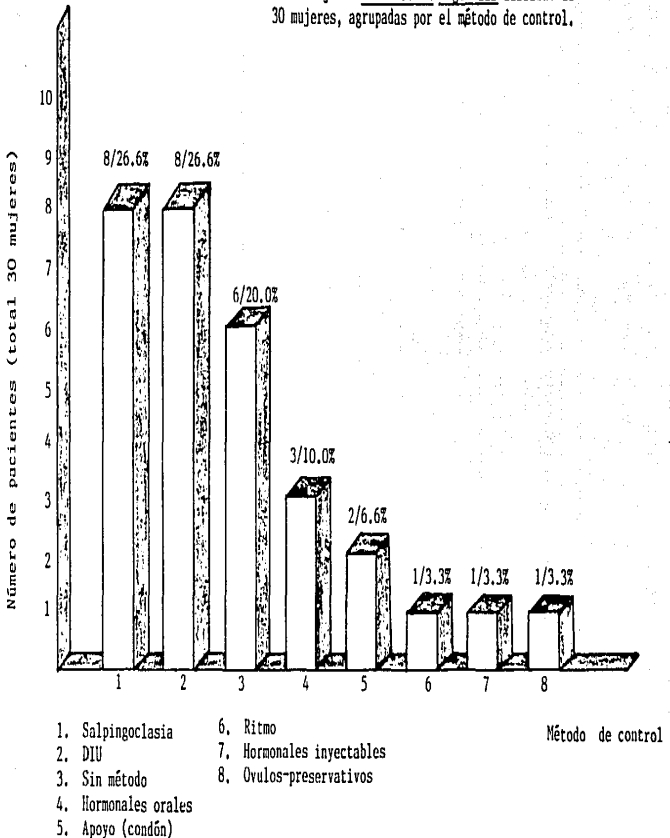
Tabla X. Porcentaje de Gardnerella vaginalis aisladas de 30 mujeres, agrupadas por el método de control.

Método de Control	Número de casos	Porcentaje (%)
Salpingoclasia	8	26.6
DIU	8	26.6
Sin método	6	20.0
Hormonales orales	3	10.0
Apoyo (condón)	2	6.6
Ritmo	1	3.3
H. inyectables	1	3.3
Ovulos-preservativos	1	3.3
Total	30	100.0

Observar Gráfica No. 4



Gráfica No. 4 Porcentaje de Gardnerella vaginalis aisladas de 30 mujeres, agrupadas por el método de control.



SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

Se realizó la prueba de sensibilidad a antimicrobianos a todas las muestras en las que se aisló un patógeno, específicamente se estudió Gardnerella vaginalis a la cual fué practicada esta prueba, obteniéndose la siguiente lectura de los halos de inhibición:

Antibióticos probados	$\bar{X}$ (mm)	Interpretación	Número de aislamientos
Cloramfenicol	23	Sensible	28/30
Ampicilina	18	Sensible	27/30
Sulfametoxazol-trimetoprim	16	Sensible	10/30
Gentamicina	18	Sensible	20/30
Penicilina	14	Sensible	21/30
Estreptomina	15	Intermedio	24/30
Eritromicina	17	Intermedio	26/30
Cefotaxima	14	Resistente	10/30
Cefalotina	15	Intermedio	22/30
Tetraciclina	19	Sensible	26/30

$\bar{X}$  (mm) = Media aritmética del diámetro de los halos de inhibición.

El halo de inhibición se midió determinando el diámetro alrededor del disco en el cual no existió desarrollo bacteriano.

Los resultados de las pruebas de sensibilidad a multidiscos comerciales indicaron que los antibióticos de elección para Gardnerella vaginalis "in vitro" son:

Cloramfenicol y ampicilina, seguidos de eritromicina y tetraciclina.

## 7. D I S C U S I O N

La frecuencia de Gardnerella vaginalis encontrada en los exudados vaginales en este estudio, comprueba que es uno de los patógenos más importantes causantes de Vaginitis junto con Candida albicans, microorganismos que con mayor frecuencia se asocian con ésta enfermedad. (Tabla I)

Gardnerella vaginalis fué aislada en un 100% de un total de 30 mujeres que presentaban actividad sexual, encontrándose la mayor incidencia de ésta bacteria (66.66%) entre los 21-40 años de edad (Tabla V), lo que es apoyado en estudios anteriores en donde la Vaginitis por Gardnerella vaginalis es reconocida como una enfermedad de transmisión sexual. (1, 19, 20, 68, 70, 76, 78)

Gardnerella vaginalis fué aislada en forma pura en 27 casos (10.8%) y en algunos casos pudo determinarse la asociación con otro patógeno en una misma paciente. Esta bacteria se aisló junto con Escherichia coli en un solo caso (0.4%) y con Trichomonas vaginalis en dos casos (0.8%). (Tabla II)

La presencia de estas bacterias y protozoarios causa una disminución en la concentración de Lactobacillus elevando el pH vaginal, lo cual favorece el establecimiento de Gardnerella vaginalis sobre el epitelio de la mucosa vaginal ya que propician las condiciones favorables para el desarrollo de G. vaginalis. (50)

Dado el alto porcentaje de aislamientos puros de Gardnerella vaginalis, se cree que esta bacteria no requiere de la asociación con otro patógeno para causar la infección y se le puede asumir el término de patógeno primario, descartando el aislamiento de anaerobios. (1, 20, 21, 70, 76)

Las características físicas del flujo vaginal encontrado en pacientes con Gardnerella vaginalis corresponde a un flujo abundante, que es fétido, de color blanco y de consistencia homogénea; éstas características podrían ayudar al igual que en el caso de Candida albicans y Trichomonas vaginalis a un posible diagnóstico pero no definitivo para su identificación. (Tabla III)

Con respecto al cuadro clínico, todas las pacientes con Gardnerella vaginalis presentaban inflamación de leve a moderada, originada por el establecimiento y proliferación de ésta bacteria sobre el epitelio de la mucosa vaginal que llega a causar irritación local incrementando la secreción de moco, que posiblemente al mezclarse con las células epiteliales de descamación adquiere una consistencia homogénea. (21, 50)

En el caso de otros microorganismos aislados en este estudio no se encontró una relación entre el microorganismo aislado con las características del flujo y el cuadro clínico, ya que las mismas características de un flujo pueden ser causadas por varios microorganismos. (Tabla III)

Gardnerella vaginalis fue aislada de secreciones vaginales que presentaban un pH de 6.0-6.5, el cual se considera un pH óptimo para el desarrollo de esta bacteria. (16, 19, 48)

Este aumento en el pH vaginal se presenta al aumentar la cantidad de bacterias patógenas establecidas sobre la mucosa vaginal, lo cual trae como resultado una disminución de *Lactobacillus* de los cuales depende el pH normal (3.5-4.5) de la secreción vaginal. (Tabla IV)

La presencia de leucocitos escasos en el exámen fresco de la secreción vaginal de pacientes con *Gardnerella vaginalis* es resultado de que la irritación causada por esta bacteria sobre el epitelio vaginal es leve por lo que la inflamación en esta zona es mínima. (Tabla IV)

*Gardnerella vaginalis* es capaz de atacar células epiteliales de descamación originando las células "clue" observadas en la tinción de Gram. (11, 61, 62, 74)

Se estudió la relación entre la observación de células "clue", la prueba de aminas y el aislamiento de *Gardnerella vaginalis*, encontrándose la presencia de células "clue" en 18 aislamientos (60%) y prueba de aminas positiva en 24 aislamientos (80%), lo que quiere decir que esta última prueba resulta más significativa en la búsqueda de *Gardnerella vaginalis*. (Tabla VI)

Al correlacionar estas pruebas se encontró que ambas resultaron positivas en 16 casos (53.33%); en 8 casos (26.66%) la prueba de aminas fué positiva y no hubo presencia de células "clue"; en 2 casos (6.66%) hubo presencia de células "clue" y prueba de aminas negativa; finalmente se encontró ausencia de células "clue" y prueba de aminas negativa en 4 casos (13.33%). (Tabla VI)

Los resultados indican que la investigación de células "clue" y la prueba de aminas no son definitivas para identificar a *Gardnerella vaginalis* en un 100% de los casos, ya que otras bacterias pueden adherirse a células

epiteliales originando falsos positivos, y se ha encontrado que una mezcla de bacterias aeróbicas y anaeróbicas - pueden dar por resultado una prueba de aminas positiva. - (45, 67)

Es necesario el cultivo y aislamiento para establecer un diagnóstico de infección por Gardnerella vaginalis.

Gardnerella vaginalis presentó un rango de inhibición variable alrededor de los discos con polianetol sulfonato sódico de 16-21 mm, encontrando que 6 aislamientos presentaron una zona de 16 mm; 10 aislamientos, 17 mm; 10 aislamientos, 18 mm; 3 aislamientos tuvieron 19 mm y un aislamiento presentó 21 mm. (Tabla VII)(Figura 1)

Ninguno de los 30 aislamientos presentó la mínima zona de inhibición considerada positiva (12 mm), por lo que se comprobó la sensibilidad de este microorganismo al polianetol sulfonato sódico. (34, 56)

Se encontró que solo Gardnerella vaginalis y Peptostreptococcus anaerobius resultaron positivos a esta prueba con un halo de inhibición mayor a 12 mm, lo que concuerda con investigaciones anteriores en donde se probó la sensibilidad de estos microorganismos al polianetol sulfonato sódico. (34, 37, 55, 56, 80, 81)

Todos los microorganismos fueron identificados por pruebas bioquímicas y se les realizó la prueba de susceptibilidad a discos con polianetol sulfonato sódico. En general todos los microorganismos aislados fueron identificados por pruebas bioquímicas en un 100%, con excepción de Candida albicans que fué identificada por la prueba de

tubo germinativo y Trichomonas vaginalis por microscopía directa en fresco. Gardnerella vaginalis solo se logró identificar en un 73.3% debido a que es una bacteria fastidiosa en cuanto a condiciones de crecimiento como son: atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>, incubación a 37°C durante 24 a 48 horas y requerimientos de vitaminas y bases nitrogenadas. (53, 70) (Tabla VIII)

Para una eficiente identificación bioquímica de Gardnerella vaginalis fué necesario agregar un polienriquecimiento a las pruebas bioquímicas que no modificara las características de los medios como son el pH final y la prueba a evaluar. (Fig. 3)

Los resultados de la tabla IX muestran que Gardnerella vaginalis presentó beta hemólisis sobre agar Casman con 5% de sangre humana, en 25 aislamientos (83.3 %). Esto comprueba que Gardnerella vaginalis produce y libera una proteína con actividad citolítica hacia eritrocitos humanos. (58)

Los demás microorganismos estudiados resultaron negativos a la producción de beta hemólisis, lo cual podría considerarse como una prueba adicional para identificar a Gardnerella vaginalis.

En estudios anteriores se considera al DIU como un factor que influye sobre la microflora vaginal. La implantación del DIU causa irritación mecánica local incrementando el número de leucocitos e incrementando la secreción de moco lo cual eleva el pH favoreciendo el estable-



cimiento de anaerobios y modificando la concentración de Lactobacillus. (50)

En este estudio no encontramos una relación entre el método de control con el establecimiento de Gardnerella vaginalis, ya que el aislamiento de ésta bacteria fué muy semejante en pacientes que presentaban DIU como en pacientes sin método de control. Con respecto a la Salpingoclasia, no se encontró relación entre ésta y el establecimiento de Gardnerella vaginalis.

La Vaginitis ocasionada por Gardnerella vaginalis se considera como una enfermedad de transmisión sexual, por lo que es importante eliminar en lo posible factores de riesgo (principalmente promiscuidad y utilizar métodos anticonceptivos de barrera). (1, 20, 68, 70, 76)

Tal como ocurre en este tipo de enfermedades es importante informar sobre la forma de transmisión y métodos de prevención, a fin de evitar la diseminación y el contagio de estas infecciones. (39)

En este trabajo no se fijó como objetivo determinar la sensibilidad de Gardnerella vaginalis a antimicrobianos, sin embargo, ésta prueba se realizó con el fin de que aquellas pacientes que presentaban infección por ésta bacteria recibieran un tratamiento; y además comprobar el patrón de sensibilidad a antimicrobianos establecido para Gardnerella vaginalis.

Es importante realizar estudios posteriores de seguimiento a las pacientes para un control de esta bacteria, así como dar tratamiento a la pareja sexual para evitar reinfecciones, ya que esta bacteria no produce síntomas en el caso del hombre.

Los antibióticos de elección para Gardnerella vaginalis "in vitro" encontrados en este estudio fueron: cloramfenicol, ampicilina, eritromicina y tetraciclina, lo cual es reportado en estudios anteriores por diversos autores. (47, 65, 70)

## 8. CONCLUSIONES

1. El uso de discos con polianetol sulfonato sódico es un método sencillo, barato y reproducible.

2. Gardnerella vaginalis y Peptostreptococcus anaerobius resultaron positivos a la prueba de susceptibilidad a discos con polianetol sulfonato sódico por lo que esta prueba no es específica para la identificación de Gardnerella vaginalis; sin embargo, provee una excelente identificación si se acompaña de la tinción de Gram de las colonias inhibidas.

3. En 250 mujeres estudiadas en la Clínica de Medicina Familiar Tlalnepantla ISSSTE, Gardnerella vaginalis junto con Candida albicans y Escherichia coli, ocuparon uno de los primeros lugares en incidencia de patógenos aislados en muestras de exudado vaginal.

4. Gardnerella vaginalis fué aislada sola o en asociación con otro patógeno en pacientes en edad reproductiva principalmente.

5. La presencia de células "clue" y la prueba de aminas no son suficientes para dar un diagnóstico de infección por Gardnerella vaginalis.

6. Se comprobó la relación de Gardnerella vaginalis con la Vaginitis Inespecífica al ser aislada ésta de pacientes que presentaban los principales síntomas de esta enfermedad.

## 9. SUGERENCIAS

1. La prueba de susceptibilidad a discos con polia  
netol sulfonato sódico (SPS) es posible realizarla sobre  
agar Casman o Columbia obteniéndose los mismos resultados  
que sobre agar Brucella.

2. Para una identificación más rápida de -  
Gardnerella vaginalis se recomienda colocar los discos -  
con SPS sobre el estriado directo de la muestra sobre -  
agar Brucella o Casman siempre y cuando se sospeche la -  
presencia de Gardnerella vaginalis (prueba de aminas y/o -  
células "clue" positivas).

## 10. A P E N D I C E

10.1 MATERIALES

## Material biológico:

250 muestras de exudado vaginal

## Material de bacteriología:

algodón

asa bacteriológica

cajas petri

cubreobjetos

discos de papel filtro de 6 mm de diámetro

gradillas para tubos

hisopos

matraz erlenmeyer graduado de 125 ml

matraz erlenmeyer graduado de 500 ml

matraz erlenmeyer graduado de 1000 ml

mechero bunsen

papel filtro Whatman No. 1

papel pH Merck

pipetas de 25  $\mu$ l

pinzas

portaobjetos

tubos de ensaye

**Equipo:**

autoclave FANSA

balanza granataria OHAUS

estufa bacteriológica BLUE M

filtro Millipore con membrana de  $0.2 \mu\text{m}$   
y diámetro de 2.5 cm

jarra GasPak BBL

microscopio óptico CARL ZEISS

refrigerador doméstico AMERICAN

10.2 MEDIOS DE CULTIVO

Agar Biggy

Agar Brucella

Agar Casman

Agar Citratos de Simmons

Agar Columbia

Agar de Eosina y Azul de Metileno (EMB)

Agar de Hierro y Triple Azúcar (TSI)

Agar de Sal y Manitol

Agar Mueller Hinton

Base de agar Sangre

Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI)

Caldo MR-VP

Caldo Rojo de Fenol y Dextrosa

Caldo Rojo de Fenol y Maltosa

Caldo Rojo de Fenol y Ribosa

Caldo Rojo de Fenol y Sacarosa

Caldo Urea

Medio basal O-F

Medio MIO

Medio SIM

Polienriquecimiento para microorganismos exigentes  
(BIOXON)



Reactivos

Acetona

Alfa naftol

Cristal violeta

Dicloruro de N,N-dimetil-1,4-fenilendiamino

Discos de SPS al 5%

Fenol al 5% (desinfectante)

Hidróxido de potasio al 10%

Hidróxido de potasio al 40%

Lugol

Multidiscos de antibióticos para gram positivos

Multidiscos de antibióticos para gram negativos

Peróxido de Hidrógeno

Polianetol sulfonato sódico al 5%

Reactivo de Erhlich

Safranina

Sensidiscos de novobiocina

Sobres para anaerobiosis en Jarra GasPak

Solución salina fisiológica al 0.85%

Rojo de metilo

### 10.2.1 Preparación del Polienriquecimiento

Se prepara en forma liofilizada, por lo que su estabilidad es indefinida, sobre todo en refrigeración.

Se reconstituye agregando el contenido (10 ml) de un vial de líquido diluyente a un vial de producto liofilizado. Se agita unos cuantos minutos hasta que el material sólido se disuelva.

Agregar 1.0 ml de la solución de polienriquecimiento a 100 ml del medio de cultivo, sólido o líquido, que se desea enriquecer.

En general, se utiliza para enriquecer con sus 12 factores y cofactores de desarrollo, a determinados medios de cultivo especialmente a aquellos diseñados para aislar y multiplicar gérmenes exigentes y delicados.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Vitamina B-12	0.010
L-Glutamina	10.000
Adenina	1.000
Clorhidrato de Guanina	0.030
Acido p-amino benzoico	0.013
L-Cistina	1.100
Glucosa	100.000
Nucleótido de difosfopiridina oxidada	0.250
Cocarboxilasa	0.100
Nitrato férrico	0.020
Clorhidrato de tiamina	0.003
Clorhidrato de Cisteína	25.900

## 11. R E F E R E N C I A S

1. Abdennader, S.; Casin, I.; Brunat, N.; Janier, M.; Perol, Y.; Morel, P. Sexual transmission of Gardnerella vaginalis. Genitourinary Medicine. 66(1): 45. 1990.
2. Admad, F.J. Vaginal Infection with Gardnerella vaginalis. The Practitioner. 229 (1401): 273-7. 1985.
3. Balsdon, N.J. Treatment of the Gardnerella - vaginalis Syndrome with a Single 2 gram Oral Dose of Metronidazole. Scandinavian Journal of Infectious Diseases [Suppl]. 40: 101-102. 1983.
4. Bannatyne, R.M.; Jackowski, J.; Cheung, R.; Biers, K. Susceptibility of Gardnerella vaginalis to Metronidazole, Its Bioactive Metabolites and Tinidazole. American Journal of Clinical Pathology. 87(5): 640-1. 1987.
5. Benito, R.; Vázquez, J.A.; Berron, S.; Fenoll, A. and Saez-Nieto, J.A. A modified scheme for biotyping Gardnerella vaginalis. Journal of Medical Microbiology. 21 (4): 357-9. 1986.
6. Bhujwala, R.A.; Buckshee, K. and Shrinivas. - Gardnerella vaginalis and associated aerobic bacteria in nonspecific vaginitis. Indian Journal of Medical Research. 81: 251-6. 1985.
7. Blackwell, A.; Fox, A.; Phillips, I. and Barlow, D. Metronidazole in Treatment of Non-specific Vaginitis. Scandinavian Journal of Infectious Diseases [Suppl]. 40: 103-106.
8. Boustouller, Y.L.; Johnson, A.P. and Taylor-Robinson, D. Pili on Gardnerella vaginalis studied by electron microscopy. Journal of Medical Microbiology. 23 (4): 327-9. 1987.

9. Boustouller, Y.L. and Johnson, A.P. Resistance of Gardnerella vaginalis to bactericidal activity of human serum. Genitourinary Medicine. 62 (6): 380-3. 1986.
10. Ching, L.Q.; Borchardt, K.A.; Smith, R.F.; Beal, C.B. A 24 hour plastic envelope method for isolating and identifying Gardnerella vaginalis - (PEM-GVA). Genitourinary Medicine. 64 (3): 180-4. 1988.
11. Cook, R.L.; Reid, G.; Pond, D.G.; Schmitt, C.A. and Sobel, J.D. Clue Cells in Bacterial Vaginosis: Immunofluorescent Identification of the Adherent Gram-Negative Bacteria as Gardnerella vaginalis. Journal of Infectious Diseases. 160 (3): 490-6. 1989.
12. Csángó, P.A.; Hagen, N. and Jagars, G. Characterization of Gardnerella vaginalis by gas Chromatography. Scandinavian Journal of Infectious Diseases [Suppl]. 40: 19-22. 1983.
13. Easmon; Clarck, L; Crane, J.P.; Green, R. Phagocytosis and killing on Gardnerella vaginalis by human neutrophils. Journal of Clinical Pathology. 38 (7): 747-9. 1985.
14. Erkkola, R.; Järvinen, H.; Terho, P. and Neuman, O. Microbial Flora in Women Showing Symptoms of Nonspecific Vaginosis: Applicability of KOH Test for Diagnosis. Scandinavian Journal of Infectious Diseases [Suppl]. 40: 59-63. 1983.
15. Eschenbach, D.A.; Critchlow, C.W.; Watkins, H.; Smith, K.; Spiegel, C.A.; Chen, KCS and Holmes, K.K. A Dose-duration Study of Metronidazole for the Treatment of Nonspecific Vaginosis. Scandinavian Journal of Infectious Diseases [Suppl]. 40: 73-80. 1983.
16. Fleury, F.J. The Clinical Signs and Symptoms of Gardnerella-associated Vaginosis. Scandinavian Journal of Infectious Diseases [Suppl]. 40: 71-2. 1983.

17. Fredricsson, B.; Hagström, B.; Evaldson, G.; -  
Nord, C.E. Gardnerella- Associated Vaginitis and  
Anaerobic Bacteria. Gynecology and Obstetrics -  
Investigation. 17(5): 236-41. 1984.
18. Fredricsson, B. and Nord, C.E. Influence of Ne-  
tronidazole Treatment on the Vaginal Microbiolo-  
gical Flora. Scandinavian Journal of Infectious  
Diseases [Suppl]. 40: 91-94. 1983.
19. Friedrich, E.G. Vaginitis. American Journal of  
Obstetrics and Gynecology. 152(3): 247-51. 1985.
20. Gardner, H.L. "Non-Specific" Vaginitis: A Non-  
entity. Scandinavian Journal of Infectious Dis-  
eases [Suppl]. 40: 7-10. 1983.
21. Gardner, H.L. Pathogenicity of Gardnerella vaginalis  
(Haemophilus vaginalis). Scandinavian Journal -  
of Infectious Diseases [Suppl]. 40: 37-40. 1983.
22. Ghione, M.; Clerici, P.A.; Piragine, G. and Ma-  
gliano, E. Humoral Circulatory Immune Response to  
Gardnerella vaginalis. Journal of Clinical -  
Microbiology. 27(9): 2138-2139. 1989.
23. Gibbs, R.S.; Weiner, M.H.; Walmer, K. and Clair,  
P. Microbiologic and Serologic Studies of -  
Gardnerella vaginalis in Intra-Amniotic Infec- -  
tion. Obstetrics and Gynecology. 70(2): 187-90.  
1987.
24. Greenwood, J.R. Current Taxonomic Status of -  
Gardnerella vaginalis. Scandinavian Journal of -  
Infectious Diseases [Suppl]. 40: 11-14. 1983.
25. Greenwood, J.R. and Pickett, N.J. Bergey's Ma- -  
nual of Systematic Bacteriology. 1: 587-591. 1984.
26. Hagström, B. and Lindstedt, J. Comparison of Two  
Different Regimens of Netronidazole in the Treat-  
ment of Non-specific Vaginitis. Scandinavian -  
Journal of Infectious Diseases [Suppl]. 40: 95-  
96. 1983.

27. Holst, E.; Skarin, A. and Mardh, P.-A. Anaerobic Comma-shaped Bacteria Recovered from the Human Genital Tract. A Review. Scandinavian Journal of Infectious Diseases [Suppl] 40: 23-30. 1983.
28. Hovik, Peer. Nonspecific Vaginitis in an Out patient Clinical. Comparison of three dosage regimens of metronidazole. Scandinavian Journal of Infectious Diseases. [Suppl]. 40: 107-110. 1983.
29. Human, R.P. and Tillotson, G.S. Identification of Gardnerella vaginalis with the API 20 Strep System. Journal of Clinical Microbiology. 21(6): 985-986. 1985.
30. Ison, C.A.; Harvey, D.G.; Tanna, A. and Easmon, C.S.F. Development and evaluation of scheme for serotyping Gardnerella vaginalis. Genitourinary Medicine. 63(3): 196-201. 1987.
31. Jerve, F.; Quigstad, E. and Eng, J. Treatment of Non-specific Vaginitis with Metronidazole. Scandinavian Journal of Infectious Diseases [Suppl]. 40: 111-113. 1983.
32. Johnson, A.P. and Davies, H.A. Demonstration by electron microscopy of pili on Gardnerella vaginalis. British Journal of Venereal Diseases. 60(6). 396-7. 1984.
33. Johnson, A.P. and Boustouller, Y.L. Extra-vaginal infection caused by Gardnerella vaginalis. Epidemiology and Infection. 98(2): 131-7. 1987.
34. Jones, B.H. Sodium Polyanetholesulfonate in the Identification of Gardnerella vaginalis. Journal of Clinical Microbiology. 22(2): 324-5. 1985.
35. Josephson, S.; Thomason, J.; Sturino, K.; Zabransky, R. and Williams, J. Gardnerella vaginalis in the Urinary Tract: Incidence and Significance in a Hospital Population. Obstetrics and Gynecology. 71(2): 245-50. 1988.
36. Kristiansen, F.V.; Oster, S.; Frost, L.; Boustouller, Y.; Korsager, B.; Moller, B.R. Isolation of Gardnerella vaginalis in pure culture from the uterine cavity of patients with irregular bleedings. British Journal of Obstetrics and Gynecology. 94(10): 979-84. 1987.

37. Krogstad, D.I. Sodium Polianethol Sulfonate Inactivation - of Aminoglycosides. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 20(2): 272-4. 1981.
38. Krohn, M.A.; Hillier, S.L. and Eschenbach, D.A. Comparison of Methods for Diagnosing Bacterial Vaginosis among Pregnant Women. Journal of Clinical Microbiology. 27(6): 1266-1271. 1989.
39. Landers, D.V. Tratamiento de la vaginitis por Trichomonas y levaduras y de la Vaginosis Bacteriana. Clínicas Obstétricas y Ginecológicas. 2: 461-467. 1988.
40. Lewis, R. The treatment of Gardnerella vaginalis infection in general practice. The Practitioner. 230(1411): 71-3. - 1986.
41. Lien, E.A. and Hillier, S.L. Evaluation of the Enhanced - Rapid Identification Method for Gardnerella vaginalis. - Journal of Clinical Microbiology. 27(3): 566-567. 1989.
42. Lossick, J.G. Gardnerella vaginalis-Associated Leukorrhea: The Disease and Its Treatment. Reviews of Infectious Diseases. 4 [Suppl]: S793-S800. 1982.
43. Lynch, M.J. Métodos de Laboratorio. Nueva Editorial Interamericana. México, D.F. Segunda edición. p. 1348-1349. - 1989.
44. Mard-Per-Anders and Soltész, L.V. In Vitro Interactions - between Lactobacilli and Other Microorganisms Occurring in the Vaginal Flora. Scandinavian Journal of Infectious Diseases [Suppl]. 40: 47-51. 1983.
45. Márquez-Dávila, G. and Martínez-Barreda, C.E. Predictive - Value of the "Clue Cells" Investigation and the Amine Volatilization Test in Vaginal Infections Caused by Gardnerella vaginalis. Journal of Clinical Microbiology. - 22(4): 686-687.
46. Moy Heang Lam; Birch, D.F. and Fairley, K.F. Prevalence of Gardnerella vaginalis in the Urinary Tract. Journal of Clinical Microbiology. 26(6): 1130-1136. 1986.
47. Munro, M.G. Treatment of Gardnerella vaginalis Vaginitis. Canadian Medical Association Journal. 132(6): 613. 1985.

48. O'Dowd, Tom. Gardnerella vaginalis: diagnosis and management. *The Practitioner*. 232 (1452): 789-91. 1988.
49. O'Dowd, T.C.; West, R.R.; Ribeiro, C.D.; Smail, J.E.; Munro, J.A. Contribution of Gardnerella vaginalis to Vaginitis in a general practice. *British Medical Journal [Clinical Research]*. 292 (6536): 1640-2. 1986.
50. Paavonen, J. Physiology and Ecology of the Vagina. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases [Suppl]*. 40: 31-35. 1983.
51. Petersen, E.E. and Peelz, K. Diagnosis and Therapy of Non-specific Vaginitis. Correlation between KOH-Test, Clue Cells and Microbiology. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases [Suppl]*. 40: 97-99. 1983.
52. Piot, P.; Van Dyck, E.; Totten, P.A. and Holmes, K.K. Identification of Gardnerella vaginalis (*Haemophilus*). *Journal of Clinical Microbiology*. 15 (1): 19-24. 1982.
53. Piot, P. and Van Dyck, E. Isolation and Identification of Gardnerella vaginalis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases [Suppl]*. 40: 15-18. 1983.
54. Ralph, E.D. Comparative Antimicrobial Activity of Metronidazole and the Hidroxy Metabolite against Gardnerella vaginalis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases. - [SUPPL]*. 40: 115-120. 1983.
55. Reimer, L.G. and Barth Reller, L. Effect of Sodium Polyanthole-sulfonate and Gelatin on the Recovery of Gardnerella vaginalis from Blood Culture Media. *Journal of Clinical Microbiology*. 21(5): 686-688. 1985.
56. Reimer, L.G. and Barth Reller, L. Use of Sodium Polyantholesulfonate Disk for the Identification of Gardnerella vaginalis. *Journal of Clinical Microbiology*. 21 (2): 146-9. 1985.
57. Reimer, L.G. and Barth Reller, L. Gardnerella vaginalis - Bacteremia: A Review of Thirty Cases. *Obstetrics and Gynecology*. 64(2): 170-2. 1984.
58. Rottini, G.; Dobrina, A.; Forgiarini, O.; Nardon, E. Ami-



- rante, G.A. and Patriarca, P. Identification and Partial -  
Characterization of a Cytolytic Toxin Produced by -  
Gardnerella vaginalis. Infection and Immunity. 58 (11): -  
3751-3758. 1990.
59. Sadhu, K.; Domingue, P.A.G.; Chow, A.W.; Nelligan, J.; -  
Cheng, N. and Costerton, J.W. Gardnerella vaginalis has a  
gram-positive cell-wall lipopolysaccharide. Journal of Med-  
ical Microbiology. 29(3): 229-235. 1989.
60. Scott, T.G.; Curran, B. and Smyth, C.J. Electron Microsco-  
py of Adhesive Interactions between Gardnerella vaginalis  
and Vaginal Epithelial Cells. Journal of General Microbio-  
logy. 135: 475-480. 1989.
61. Scott, T.G. and Smyth, C.J. Haemagglutination and Tissue -  
Culture Adhesion of Gardnerella vaginalis. Journal of Gene-  
ral Microbiology. 133[Pt 8]: 1999-2005. 1987.
62. Scott, T.G.; Smyth, C.J. and Keane, C.T. In vitro adhesi-  
veness and biotype of Gardnerella vaginalis strains in re-  
lation to the occurrence of clue cells in vaginal dischar-  
ges. Genitourinary Medicine. 63(1): 47-53. 1987.
63. Sereno Colo, J.A.; Ricalde Bas, C.; De la Cabada, J. Váz-  
quez, A. Frecuencia de diferentes patógenos como causa de  
vaginits en México. Ginecología y Obstetricia de México.  
58: 128-132. 1990.
64. Shaw, Carol E.; Forsyth, M.E.; Bowie, W.R.; Black, W.A. -  
Rapid Presumptive Identification of Gardnerella vaginalis  
(Haemophilus vaginalis) from Human Blood Agar Media. Jour-  
nal of Clinical Microbiology. 14(1): 108-110. 1981.
65. Skarin, A.; Holst, E. and Mard P-A. Antimicrobial Suscepti-  
bility of Comma-shaped Bacteria Isolated from the Vagina.  
Scandinavian Journal of Infectious Diseases. [Suppl]. 40:  
81-84. 1983.
66. Smith, R.F. Comparison of Two Media for Isolation of -  
Haemophilus vaginalis. Journal of Clinical Microbiology. 9  
(6): 729-730. 1979.
67. Spiegel, C.A.; Davick, P.; Totten, P.A.; Chen, KCS; Eschen-  
bach, D.A.; Amsel, R. and Holmes, K.K. Gardnerella -

- vaginalis and Anaerobic Bacteria in the Etiology of Bacterial (Nonspecific) Vaginosis. Scandinavian Journal of Infectious Diseases [Suppl]. 40: 41-46. 1983.
68. Staerfelt, F.; Gundersen, T.J.; Halsos, A.M.; Barlinn, C.; Johansen, A.G.; Norregaard, K.M. and Eng, J. A Survey of Genital Infections in Patients Attending a Clinic for Sexually Transmitted Diseases. Scandinavian Journal of Infectious Diseases [Suppl]. 40: 53-57. 1983.
  69. Sweet, R.L. Importance of differential diagnosis in acute vaginitis. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 152 [7 Pt 2]: 921-3. 1985.
  70. Taylor-Robinson. The Bacteriology of Gardnerella vaginalis. Scandinavian Journal of Urology and Nephrology [SUPPL]. 86: 41-55. 1984.
  71. Tortora, G.J. Principios de Anatomía y Fisiología. Editorial Harla. México, D.F. Tercera edición. p. 928-931. 1987.
  72. Totten, P.A.; Amsel, R.; Hale, J.; Piot, P. and Holmes, K. K. Selective Differential Human Blood Bilayer Media for Isolation of Gardnerella (Haemophilus) vaginalis. Journal of Clinical Microbiology. 15(1): 141-147. 1982.
  73. Tyong, D.C. and Thompson, J.S. Rapid Microbiochemical Method for Identification of Gardnerella vaginalis (Haemophilus). Journal of Clinical Microbiology. 16(1): 30-33. 1982.
  74. Van der Meijden, W.I.; Koerten, H.; Bruijn, W.C. Descriptive Light and Electron Microscopy of Normal and Clue-Cell Positive Discharge. Gynecology and Obstetrics Investigation. 25(1): 47-57. 1988.
  75. Van der Meijden, W.I. Treatment of Non-specific Vaginitis with a Single Dose of Tinidazole. Scandinavian Journal of Infectious Diseases [Suppl]. 40: 85-89. 1983.
  76. Watson, R.A. Gardnerella vaginalis: Genitourinary pathogen in men. Urology. 25(3): 217-22. 1985.
  77. West, R.R.; Kerr, K.G.; Millar, M.R.; Hawkey, P.; Godwin, P.G.R. Prevalence of Gardnerella vaginalis. British Medical

Journal [Clinical Research]. 296 (6635): 1537-8. 1988.

78. West, R.R.; O'Dowd, T.C.; Smail, J.E. Prevalence of Gardnerella vaginalis: an estimate. British Medical Journal [Clinical Research]. 296 (6630): 1163-4. 1988.
79. Weström, L. and Mardh, P.A. Definitions of Infectious and - Infectious-like Conditions in the Lower Genital Tract of - the Female. Scandinavian Journal of Infectious Diseases. - [Suppl]. 40: 65-70. 1983.
80. Wideman, P.A.; Vargo, V.L.; Citronbaum, D. and Finegold, S. M. Evaluation of the Sodium Polyanethol Sulfonate Disk Test for the Identification of Peptostreptococcus anaerobius. - Journal of Clinical Microbiology. 4(4): 330-333. 1976.
81. Wilkins, T.D. and West, S.E. Medium-Dependent Inhibition of Peptostreptococcus anaerobius by Sodium Polyanethol-sulfonate in Blood Culture Media. Journal of Clinical Microbiology. 3(4): 393-396. 1976.
82. Wilson, J.A.; Barratt, A.J. An unusual case of Gardnerella vaginalis septicaemia. British Medical Journal [Clinical - Research]. 293(6542): 309. 1986.