

64



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

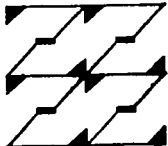
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

ADHERENCIA DE Gardnerella vaginalis A DIFERENTES LINEAS CELULARES.

TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO PRESENTA: ANGEL MARIO SANCHEZ JUAREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. en C. FERNANDO MARTIN GUERRA INFANTE

UNAM FES ZARAGOZA



LO HUMANO EJE DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

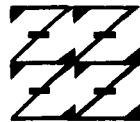
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.

PAGINACION DISCONTINUA

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXION

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. en C. Fernando M. Guerra Infante.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A mis padres: Vicente y Lucia †

Con amor y admiración, por la confianza y el amor que supieron darme. Por decirnos siempre sin palabras:

“La misión de ustedes consiste en ser todo lo que puedan, la nuestra es apoyarlos”.

GRACIAS.

A mis hermanos:

Rosalía, Vicente, Esther, Gustavo, Patricia, Carmen, Humberto y José Luis. Por compartir la vida juntos, por su confianza y por su apoyo incondicional.

GRACIAS.

A mis maestros y compañeros:

Con admiración y respeto a mis profesores de la FES-Zaragoza y a mis compañeros, por tantas experiencias y momentos que vivimos juntos que nunca olvidare. En especial a Gricelda a quien recordare siempre con cariño.

GRACIAS.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

A mi director y codirector de tesis:

Con admiración y respeto al Dr. Guerra, por su gran apoyo para la realización de este trabajo, por su paciencia y por confiar en mí.

A la Maestra Graciela M. González Lugo, Por la Mística que hay en sus enseñanzas no solo en el que hacer científico, sino también en los diferentes aspectos de la vida.

GRACIAS.

A mis compañeros:

del laboratorio de microbiología veterinaria, por su apoyo y por compartir tantas momentos y experiencias juntos.

GRACIAS.

A Nueva Acrópolis:

A mi Maestra Lidia, mis dirigentes, instructores y compañeros, por recordarme que las enseñanzas sólo pueden ser fructíferas si las vivimos, por invitarme a triunfar y mostrarme el camino.

GRACIAS.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

PAGINA

I
N
D
I
C
E

G
E
N
E
R
A
L

CAPITULO I. Introducción

I. Fundamentación teórica.	1
1.1 Adherencia como mecanismo de patogenicidad.	6

CAPITULO II. Planteamiento del problema. 8

CAPITULO III. Objetivos e Hipótesis.	
3.1 Objetivos.	9
3.2 Hipótesis.	9

CAPITULO IV. Materiales y métodos.	
4.1 Diseño de investigación.	10
4.1.1 Tipo de estudio.	10
4.1.2 Población	10
4.1.2.1 Características morfológicas y coloniales de las cepas de <i>Gardnerella vaginalis</i> .	11
4.1.3 Criterios de inclusión.	12
4.1.4 Criterios de exclusión.	12
4.1.5 Criterios de eliminación	13
4.1.6 Variables.	13
4.2 Cepas bacterianas.	13
4.3 Medios de cultivo bacteriano.	14
4.4 Ensayo de curva de crecimiento.	14

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

PAGINA

4.5 Líneas celulares	14
4.5.1 Preparación de células en microplaca de 24 pozos.	16
4.6 Ensayos de adherencia.	17
4.6.1 Ensayos de adherencia en células fijadas	17
4.6.2 Ensayo de adherencia en células no fijadas	19
4.7 Índices relativos, porcentajes y patrones de adherencia	21
4.8 Diseño estadístico	21

CAPITULO V. Resultados.

5.1 Medios de cultivo.	22
5.2 Ensayo de adherencia de la cepa de <i>Gardnerella vaginalis</i> (ATCC 14018) con células fijadas.	23
5.3 Ensayo de adherencia de la cepa de <i>Gardnerella vaginalis</i> (ATCC 14018) con células no fijadas.	35
5.4 Adherencia de cepas de <i>Gardnerella vaginalis</i> - aisladas de pacientes con vaginosis bacteriana en células fijadas.	39
5.5 Adherencia de cepas de <i>Gardnerella vaginalis</i> - aisladas de pacientes con vaginosis bacteriana en células no fijadas.	44
5.6 Adherencia de cepas de <i>Gardnerella vaginalis</i> - aisladas de pacientes sin signos y síntomas de vaginosis bacteriana en células fijadas.	49

CAPITULO VI. Discusión.	53
-------------------------	----

CAPITULO VII. Conclusiones.	58
-----------------------------	----

CAPITULO VIII. Propuestas y/o recomendaciones.	59
--	----

I
N
D
I
C
E

G
E
N
E
R
A
L

CONTENIDO

PAGINA

CAPITULO IX. Apéndice

- | | |
|---|----|
| 9.1 Medios de cultivo. | 60 |
| 9.2 Pruebas bioquímicas de identificación. | 64 |
| 9.3 Soluciones y colorantes. | 69 |
| 9.4. Determinación de la concentración bacteriana con la turbiedad expresada en unidades Klett-Summerson. | 70 |

CAPITULO X. Referencias

72

I
N
D
I
C
E

G
E
N
E
R
A
L

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

	PAGINA
1. Curva de crecimiento de <i>Gardnerella vaginalis</i> .	22
2. Adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> (ATCC 14018) a células HeLa Fijadas con metanol.	29
3. Adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> (ATCC 14018) a células HEp-2 Fijadas con metanol.	30
4. Adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> (ATCC 14018) a células McCoy Fijadas con metanol.	31
5. Adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> (ATCC 14018) a células PK15 Fijadas con metanol.	32
6. Adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> (ATCC 14018) a células J774 Fijadas con metanol.	33
7. Adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> (ATCC 14018) a células L-929 Fijadas con metanol.	34
8. Adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> (ATCC 14018) a células HeLa y HEp-2 no fijadas.	37
9. Adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> (ATCC 14018) a células McCoy y PK15 no fijadas.	38
10. Adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> de pacientes con vaginosis bacteriana en células McCoy fijadas.	42
11. Adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> de pacientes con vaginosis bacteriana en células McCoy no fijadas.	43
12. Adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> aisladas de pacientes con vaginosis bacteriana en células McCoy no fijadas A) Cepa 1B. B) Cepa 2B.	47
13. Adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> aisladas de pacientes con vaginosis bacteriana en células McCoy no fijadas A) Cepa 3B. B) Cepa 4B.	48

CONTENIDO

	PAGINA
1. Líneas celulares empleadas para estudio de adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> .	15
2. Índices relativos de adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> (ATCC 14018) en células fijadas.	24
3. Porcentaje de adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> (ATCC 14018) a células fijadas.	26
4. Patrón de adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> (ATCC 14018) en células fijadas.	28
5. Índice relativo, Porcentaje y Patrón de adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> (ATCC 14018) a células no fijadas.	36
6. Índice relativo y Porcentaje de adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> aisladas de pacientes con vaginosis bacteriana en células fijadas.	40
7. Patrón de adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> aisladas de pacientes con vaginosis bacteriana en células fijadas.	41
8. Índice relativo y Porcentaje de adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> aisladas de pacientes con vaginosis bacteriana en células no fijadas.	45
9. Patrones de adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> aisladas de pacientes con vaginosis bacteriana en células no fijadas.	46
10. Índice relativo y Porcentaje de adherencia de cepas de <i>Gardnerella vaginalis</i> aisladas de pacientes sin vaginosis bacteriana en células fijadas.	50
11. Patrón de adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> aisladas de pacientes sin vaginosis bacteriana a células fijadas.	52

CONTENIDO

	PAGINA
1. Líneas celulares empleadas para estudio de adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> .	15
2. Índices relativos de adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> (ATCC 14018) en células fijadas.	24
3. Porcentaje de adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> (ATCC 14018) a células fijadas.	26
4. Patrón de adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> (ATCC 14018) en células fijadas.	28
5. Índice relativo, Porcentaje y Patrón de adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> (ATCC 14018) a células no fijadas.	36
6. Índice relativo y Porcentaje de adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> aisladas de pacientes con vaginosis bacteriana en células fijadas.	40
7. Patrón de adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> aisladas de pacientes con vaginosis bacteriana en células fijadas.	41
8. Índice relativo y Porcentaje de adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> aisladas de pacientes con vaginosis bacteriana en células no fijadas.	45
9. Patrones de adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> aisladas de pacientes con vaginosis bacteriana en células no fijadas.	46
10. Índice relativo y Porcentaje de adherencia de cepas de <i>Gardnerella vaginalis</i> aisladas de pacientes sin vaginosis bacteriana en células fijadas.	50
11. Patrón de adherencia de <i>Gardnerella vaginalis</i> aisladas de pacientes sin vaginosis bacteriana a células fijadas.	52

La adherencia es una propiedad de un gran número de bacterias que le permite su fijación a la superficie de las células. Constituye uno de los factores más importantes para la colonización de la piel y mucosas por la flora nativa y por la puesta en marcha de la infección.

Tal es el caso de *Gardnerella vaginalis*, que ha sido descrita como una de las causantes de la vaginosis bacteriana, la cual provoca la aparición de signos y síntomas que se caracterizan por la producción abundante de descarga vaginal homogénea, grisácea, con un pH mayor a 4.5 y presencia de células de descamación cubiertas por abundantes bacterias adheridas que oscurecen el borde celular (células clave).

El objetivo de éste estudio fue determinar la capacidad de adherencia de *Gardnerella vaginalis* en diferentes líneas celulares empleando modelos *in vitro*, de las cuales se describieron índices relativos, porcentajes y patrones de adherencia en células fijadas y no fijadas.

En este estudio se empleó una cepa de referencia de *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018, cuatro cepas de *Gardnerella vaginalis* procedentes de pacientes con signos y síntomas de vaginosis bacteriana y cuatro cepas de *Gardnerella vaginalis* procedentes de pacientes sin signos y síntomas de vaginosis bacteriana. Las cepas fueron incubadas con células HeLa, HEP-2, McCoy, PK15, J774 y L-929 no fijadas y fijadas con metanol, en una microplaca de 24 pozos e incubadas a 37° C durante 1,3,6 y 24 h.

Los resultados mostraron que tanto cepa de referencia como cepas procedentes de pacientes con signos y síntomas de vaginosis bacteriana sobre las células Hela, Hep-2 McCoy presentaron un índice relativo, porcentaje y patrón de adherencia del tipo agregativo (AggA), semejante a lo que se observa en células clave; a un tiempo de incubación de 3 h.

Con respecto a células PK,5, J774 y L--929 se observaron índices relativos y porcentajes de adherencia menores que en células Hela, Hep-2 y McCoy, siguiendo un patrón de adherencia del tipo difuso.

Los resultados obtenidos en células no fijadas presentaron índices relativos y porcentajes de adherencia menores a lo observado en células fijadas y en algunos casos dicho evento no se observó.

Las cepas de *Gardnerella vaginalis* de pacientes sin signos y síntomas de vaginosis bacteriana no mostraron más de 2 bacterias adheridas por célula en las diferentes líneas celulares empleadas.

R
E
S
U
M
E
N

Capítulo

I

Introducción

INTRODUCCIÓN

I. FUNDAMENTACION TEORICA.

La vaginosis bacteriana (VB) se reconoce como una de las principales causas del flujo vaginal que se presenta en mujeres que acuden a consulta ginecológica, en el ámbito mundial. (1) En México la frecuencia de vaginosis bacteriana en las clínicas de enfermedades de transmisión sexual es de 32 a 64 %, en medicina familiar de 12 a 25 % y en la práctica obstétrica es del 10 al 26 %. Se le ha asociado también como causante de infecciones amnióticas, corioamniotitis histológica, endometritis poscesárea, infección de vías urinarias, enfermedad pélvica inflamatoria y embarazo prematuro entre otros. (2)

En el caso de la patogénesis de la vaginosis bacteriana algunas de las características más importantes es la presencia de células de descamación vaginal cubiertas por abundantes bacterias adheridas que oscurecen el borde celular (células clave), cuya especie predominante es *Gardnerella vaginalis*, aunque se ha señalado que también especies de *Bacteroides sp.* y *Mobiluncus sp.* Que pueden adherirse a esta célula. Otra característica es el flujo vaginal que es de olor fétido, abundante, homogéneo, grisáceo, y con un pH mayor a 4.5

Por otro lado, se ha observado que *Gardnerella vaginalis* es capaz de adherirse a otro tipo de células tales como las células uretrales femeninas y masculinas, por lo que esto puede ser un mecanismo de patogenicidad para esta bacteria. Aunque se han efectuado diferentes estudios *in vitro* sobre la adherencia de *Gardnerella vaginalis* empleando células de epitelio vaginal, así como células McCoy, no se han identificado completamente los mecanismos que permitan el desarrollo y la adherencia de la bacteria a las células epiteliales de descamación de la vagina, por lo que es necesario realizar un mayor número de investigaciones al respecto.

La vaginosis bacteriana fue reportada por primera vez en 1955 por Gardner y Dukes, quienes describieron los signos y síntomas de esta infección como una descarga vaginal grisácea, homogénea, maloliente, que tendía a adherirse a la pared vaginal provocando una elevación de pH, así como presencia abundante de células epiteliales que mostraban bacterias de forma cocobacilar adheridas a estas. ⁽³⁾

Gardnerella vaginalis ha sido estudiada desde varios aspectos como su taxonomía, estructura y genética entre otros. El interés científico sobre esta bacteria es por la estrecha relación fisiopatológica que tiene en el desarrollo de la vaginosis bacteriana. ⁽⁴⁾

En 1984 Johnson y Davies⁽⁵⁾ mediante estudios de microscopía electrónica demostraron la presencia de estructuras fimbriales en la pared celular en 5 de las 8 cepas estudiadas. Esta estructura mostraba una disposición de tipo peritrico y con un diámetro de 3.0 - 7.5 nm.

Un año después Peeters y Piot⁽⁶⁾ demostraron que *Gardnerella vaginalis* se adhiere de manera *in vitro* a células de epitelio vaginal. Las variables que influyeron en la capacidad de adherencia fueron el pH, la temperatura de incubación, la exposición a radiación ultravioleta y el tratamiento con sustancias como peryodato de sodio, azúcares y antibióticos. Los resultados mostraron que *Gardnerella vaginalis* presenta una capacidad de adherencia óptima entre pH de 5 a 6. El tratamiento con calor a 56 °C y radiación ultravioleta por 30 minutos a las células de epitelio vaginal no provocó alteraciones en la adherencia de la bacteria. Sin embargo, el tratamiento con peryodato de sodio sí causó una disminución en el número de bacterias adheridas a las células.

Esto último posiblemente sugiere que uno o varios carbohidratos presentes en la superficie celular actúan como moléculas receptoras de la bacteria. A pesar de esto, el tratamiento de las bacterias con diferentes azúcares antes de realizar el ensayo de adherencia mostró que ninguno de los azúcares empleados inhibía la adherencia. Por lo que concluyeron que una proteína o una terminación glucosídica eran la parte importante que tenía a actuar como adhesina.

El uso de antibióticos demostró que empleando concentraciones mínimas inhibitorias de ampicilina, la bacteria presentaba crecimiento adecuado y sin alteraciones en el ensayo de adherencia, a diferencia de lo que ocurrió con el metronidazol, el cual redujo la adherencia de la bacteria a las células de epitelio vaginal.

Para 1987 L. Boustouller y A.P. Johnson ⁽⁷⁾ mediante microscopia electrónica, demostraron que de 16 cepas de *Gardnerella vaginalis*, solo 14 presentaron características fimbriales en la superficie bacteriana. La reexaminación de las 2 cepas sin aspecto fimbrial se encontró que se habían hecho ya varios subcultivos, y que este era el motivo por el cual la bacteria tendía a perder su capacidad de producir estructuras fimbriales.

En el mismo año G. Scott y J. Smyth⁽⁸⁾ realizaron estudios de adherencia en la línea celular McCoy, así como estudios de hemaglutinación empleando eritrocitos humanos de diferentes grupos sanguíneos, con el fin de describir los mecanismos de acción de adhesina-receptor. Sus resultados demostraron que el tratamiento de la bacteria con formalina, tripsina y lipasa provoca una disminución, pero no una inhibición en los ensayos de hemaglutinación, sin embargo el tratamiento con peryodato de sodio, calor y pronasa (mezcla de proteasas relativamente poco específicas, procedentes de *Streptomyces griseus*, la cual se emplea para efectuar proteólisis completa) produce una inhibición completa de la actividad hemaglutinante. Al tratar a los eritrocitos con neuraminidasa se observó una marcada reducción de la aglutinación, caso opuesto al tratamiento con formalina que no mostró efecto sobre la misma.

En cuanto a los ensayos de adherencia a células McCoy se observó que el tratamiento de la bacteria con pronasa y calor se reduce marcadamente la adherencia, a diferencia de lo que ocurre con el tratamiento de las bacterias con peryodato o radiación ultravioleta que no mostraron alteraciones en su capacidad de adherencia. Por otro lado el tratamiento con neuraminidasa de las células McCoy no afecto la adherencia de *Gardnerella vaginalis*, sin embargo el tratamiento con formalina afecto la adherencia de la bacteria.

Para 1989 G. Scott, B. Curran y J. Smyth. ⁽⁹⁾ Realizaron estudios de microscopía electrónica y tinciones con rojo de rutenio en ensayos de adherencia y hemaglutinación con *Gardnerella vaginalis*, empleando células de epitelio vaginal, células McCoy y eritrocitos humanos. Los resultados describieron que el ataque de la bacteria a estas células parece estar mediado por una densa cubierta fibrilar presente en la superficie bacteriana la cual va de 60 a 75 nm de grosor y que puede ser de gran importancia en la participación del ataque a la célula *in vivo*.

A diferencia de lo anterior los ensayos de hemaglutinación describen que este evento parece ser dado por estructuras fimbriales de arreglo peritrico que van de 800 a 1200 nm de longitud. En el tratamiento a la cepa de *Gardnerella vaginalis* con pronasa observan que la bacteria no se adhiere a células McCoy, exponiendo que este tratamiento tubo la capacidad de remover la densa capa fibrilar que posiblemente interviene en la adherencia de la bacteria.

Con estos resultados se propone el realizar estudios posteriores que permitan clarificar el papel de la adherencia como un mecanismo de la patogénesis de la vaginosis bacteriana causada por *Gardnerella vaginalis*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En 1994 Villegas Castrejón y cols.⁽¹⁰⁾ realizaron análisis morfológicos por microscopia electrónica de los posibles mecanismos de adhesión y penetración de *Gardnerella vaginalis* a células de epitelio vaginal y células de epitelio uretral masculino en semen. Los investigadores describieron que las células de epitelio vaginal presentan numerosos lamelipodios, (proyecciones o prolongaciones citoplásmicas laminares del contorno ondulatorio de la membrana celular), en los cuales la bacteria se adhiere a través de su pared con la membrana plasmática celular. En algunos casos observaron bacterias en el interior de las células clave, con dos características importantes:

1. Citoesqueleto sin alteración cuando la bacteria se localiza en la cara interna de la membrana plasmática.
2. Citoesqueleto destruido cuando la bacteria emigra al centro de la célula.

Las células de epitelio uretral halladas en el semen, se observó que la bacteria presentaba una adhesión semejante a las encontradas en las células clave, por lo que concluyeron que el varón puede jugar un papel importante en el proceso de infección o reinfección de la mujer en los casos de vaginosis bacteriana causada por *Gardnerella vaginalis*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.1 ADHERENCIA COMO MECANISMO DE PATOGENICIDAD.

La adherencia es una propiedad de un gran número de bacterias que les permite su fijación a la superficie de las células. Constituye uno de los factores más importantes para la colonización de la piel y mucosas por parte de diferentes bacterias con capacidad patogénica.

Para infectar a un huésped, los microorganismos primero deben adherirse a la superficie de las mucosas. La adherencia bacteriana generalmente es un procesos específico que involucra estructuras de la superficie bacteriana conocidas como adhesinas y receptores complementarios en la superficie de las células susceptibles.

Las adhesinas son estructuras de la superficie de las bacterias que actúan como mediadores del fenómeno de adherencia, los estudios realizados hasta hoy han permitido demostrar que se encuentran asociadas con estructuras superficiales como las fimbrias o pili comunes con polímeros extracelulares que forman la envoltura (glucocalix) y con diversos componentes de la membrana externa (proteínas y lipopolisacáridos). Estas pueden ser de naturaleza proteica (fimbrias, proteínas de membrana externa), sacarídicas (glucocalix) o lipídica (ácidos lipoteicoicos o lipopolisacáridos).⁽¹¹⁾

Las fimbrias se pueden diferenciar por una serie de caracteres como el tamaño, peso molecular, composición en aminoácidos y poder inmunogénico, además de la capacidad de fijación selectiva en los receptores de diversas células y diferentes especies de hematíes responsables del fenómeno de hemaglutinación.

Las fimbrias se pueden diferenciar por una serie de caracteres como el tamaño, peso molecular, composición en aminoácidos y poder inmunogénico, además de la capacidad de fijación selectiva en los receptores de diversas células y diferentes especies de hematíes responsables del fenómeno de hemaglutinación.

C
A
P
I
T
U
L
O
I

Por su naturaleza química, presentan la propiedad de combinarse con receptores que contiene D-manosa que se encuentran en glucoproteínas presentes en la superficie de un gran número de células y glóbulos rojos tanto humanos como de otras especies animales, produciendo el fenómeno de la hemaglutinación, reacción que puede ser inhibida por la adición de D-manosa al medio en el cual se da la interacción (manosa sensibles o MS). Sin embargo se ha demostrado que las adhesinas o fimbrias manosa resistente (MR) se caracterizan por producir la aglutinación de los hematíes aun en presencia de D-manosa. Recientemente se ha demostrado que las fimbrias manosa-resistente no forman un grupo homogéneo, sino que agrupan todas las fimbrias que se combinan con receptores específicos que no contienen manosa; es por tanto, un grupo heterogéneo en el que se incluyen diversos tipos de fimbrias.⁽¹²⁾

Gardnerella vaginalis tiene la capacidad de adherirse a eritrocitos, células McCoy y células epiteliales, y posiblemente puede adherirse a diferentes líneas celulares, lo que hace suponer que tienden a mostrar un receptor común. Sin embargo al tratamiento con azúcares, peryodato de sodio y neuraminidasa muestran que el receptor no es una glucoproteína, ni tampoco ácido siálico. Por tal motivo es importante demostrar si en diferentes líneas celulares de diversas especies animales existe un receptor común, así como patrones de adherencia que permitan reconocer bacterias con diferente grado de patogenicidad como ocurre con *Escherichia coli*.⁽¹³⁾ Otro aspecto importante es el de lograr tener un modelo de adherencia que permita realizar diversos estudios sobre el mecanismo de adherencia de *Gardnerella vaginalis*.

Capitulo

II

Planteamiento del Problema

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Debido a que *Gardnerella vaginalis* tiene la capacidad de adherirse a células epiteliales y a células McCoy, sería de interés reconocer si esta bacteria puede adherirse a diferentes líneas celulares de diversas especies animales; así como identificar patrones de adherencia en células que han sido fijadas y no fijadas con metanol. Esto con la finalidad de conocer si las cepas que son aisladas de pacientes con vaginosis bacteriana presentan diferentes características de adherencia y diferente grado de patogenicidad, tal como ocurre con cepas patógenas de *Escherichia coli*.

III. OBJETIVO E HIPÓTESIS.

3.1 OBJETIVO GENERAL:

Determinar la capacidad de adherencia de *Gardnerella vaginalis* a diferentes líneas celulares.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar la capacidad de adherencia de *Gardnerella vaginalis* empleando modelos celulares in vitro.
2. Describir los patrones de adherencia de *Gardnerella vaginalis* utilizando líneas celulares fijadas y no fijadas con metanol.
3. Determinar el índice relativo y porcentaje de adherencia de *Gardnerella vaginalis* para ambos modelos.

3.2 HIPÓTESIS:

La capacidad de adherencia de *Gardnerella vaginalis* a las diferentes líneas celulares, dependerá del tiempo de exposición-incubación, así como del reconocimiento específico entre receptores celulares y las adhesinas bacterianas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Capitulo

IV

Materiales y Métodos

IV. MATERIALES Y METODOS.

4.1 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN:

4.1.1 Tipo de estudio. ⁽¹⁴⁾

Experimental (Prospectivo, Longitudinal, Comparativo)

4.1.2 POBLACIÓN:

Cepa de referencia de *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018 proporcionada por Dr. en C. Fernando Martín Guerra Infante; Instituto Nacional de Perinatología.

Cepas de *Gardnerella vaginalis*, aisladas de casos clínicos de vaginosis bacteriana de pacientes femeninas, de acuerdo a los criterios de Amsel. ⁽³⁾ Proporcionadas por el Biólogo Alberto González Pedraza, Centro de salud "José Castro Villagrana" Instituto de Servicios de Salud del Distrito Federal.

4.1.2.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y COLONIALES DE LAS CEPAS DE *Gardnerella vaginalis*.⁽¹⁵⁾

- Cocobacilos pequeños Gram negativos.
- Anaerobio facultativo.
- Tienden al pleomorfismo.
- Inmóvil.
- Ausencia de flagelos.
- Presencia de fimbrias.
- No forma esporas ni cápsulas.

En base de Agar Casmán + 5 % de sangre de carnero:

- Colonias pequeñas (0.2 - 0.3 mm de diámetro)
- Translucidas.
- Blanquecinas.
- Brillantes.
- Con borde regular, elevadas y convexas.
- β -hemólisis.

Pruebas bioquímicas de identificación: ⁽¹⁶⁻¹⁷⁾

- Catalasa y oxidasa: negativo.
- Hidrólisis de hipurato: positiva.
- Hidrólisis del almidón: positiva.
- Fermentación de rafinosa, glucosa, maltosa y sacarosa.

4.1.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Cepa de referencia de *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018, en cultivo joven, crecida en base de agar Casman + 5 % de sangre humana; cultivada en caldo infusión de cerebro y corazón enriquecido con 0.5 % de suero fetal de ternera con 24 horas de incubación. (ver apéndice)
- Cuatro cepas de *Gardnerella vaginalis* identificadas por pruebas bioquímicas de pacientes con signos y síntomas de vaginosis bacteriana, con un diagnóstico positivo a los criterios de Amsel.
- Cuatro cepas de *Gardnerella vaginalis* identificadas por pruebas bioquímicas aisladas de pacientes sin diagnóstico de vaginosis bacteriana de acuerdo a los criterios de Amsel.

4.1.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Cepas que no sean identificadas por pruebas bioquímicas.
- Cepas que no presenten la morfología microscópica y colonial característica de *Gardnerella vaginalis*.
- Cepas que sean catalasa u oxidasa positivo.
- Dar tratamientos físicos o químicos a cepas bacteriana previos a los ensayos de adherencia.

4.1.5 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN:

- Cepas que modifiquen su morfología colonial o microscópica.
- Cepas que presenten contaminación con otra bacteria.
- Cepas con subcultivos continuos.
- Cepas con periodos de incubación mayor de 24 horas.
- Uso de tween y antibióticos en base de agar Casman-sangre humana empleados para el crecimiento de la bacteria.

4.1.6 VARIABLES:

Adherencia bacteriana a:

- Diferentes líneas celulares.
- Utilización de líneas celulares fijadas y no fijadas.
- Diferentes tiempos de incubación.

4.2 CEPAS BACTERIANAS:

Cepa de referencia de *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018 proporcionada por Dr. en C. Fernando M. Guerra Infante, departamento de virología; Instituto Nacional de Perinatología. Cuatro cepas de *Gardnerella vaginalis* aisladas de pacientes con signos y síntomas de vaginosis bacteriana que cumplieron con los criterios de Amsel y cuatro cepas de *Gardnerella vaginalis* aisladas de pacientes sin signos y síntomas de vaginosis bacteriana proporcionadas por Biól. Alberto González Pedraza, laboratorio de microbiología del Centro de Salud Dr. "José Castro Villagrana," Instituto de Servicios de Salud del Distrito Federal. Previamente identificadas de acuerdo a pruebas bioquímicas realizadas por Taylor. ⁽¹⁷⁾

4.3 MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANOS:

Se empleó base de Agar Casman con 5 % de sangre humana para crecimiento colonial e identificación hemolítica de las bacterias. (ver apéndice).

Caldos Infusión cerebro-corazón (BHI), Todd-Hewitt, y Columbia simples y enriquecidos con suero de caballo, suero fetal de ternera, suero de pollo, extracto de levadura y poli-enriquecimiento para conocer cual de estos favorecía un mayor crecimiento y propagación bacteriana. (ver apéndice 1)

4.4 ENSAYO DE CURVA DE CRECIMIENTO:

De un cultivo de 18 - 24 h de la cepa de referencia en caldo BHI enriquecido con 0.5 % de suero fetal de ternera se agregó el volumen necesario de inóculo a un matraz nefelométrico que contenía 25 mL de caldo BHI con las mismas características para obtener una lectura inicial de 10 Unidades Klett (U.K, la cual equivale a 0.002 unidades de densidad óptica. D.O), Ajustando fotocolorímetro.

previamente a cero con caldo BHI enriquecido sin inocular. Incubando el matraz inoculado a 37°C en atmósfera parcial de CO₂, midiendo la turbidez por espacios de 2 horas durante 24 horas, registrando los datos obtenidos.

4.5 LÍNEAS CELULARES:

Las líneas celulares que se utilizaron se muestran en la tabla No. 1. Se emplearon tanto células no fijadas y fijadas con metanol absoluto mediante la siguiente técnica: de cada cultivo celular se adicionaron aproximadamente entre 20,000 y 100,000 células por 0.5 mL en una microplaca de 24 pozos que contenía cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro se incubaron por 24 h a 37°C en atmósfera parcial de CO₂. para el caso de células fijadas se procedió a eliminar el sobrenadante en condiciones de esterilidad y posteriormente fijar con 300 µl de metanol absoluto con un periodo de incubación de 10 minutos a temperatura ambiente.

Tabla 1:

LINEAS CELULARES EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO DE ADHERENCIA DE *Gardnerella vaginalis*.

LINEA CELULAR	NUMERO DE CATALOGO DE ATCC*	PROCEDENCIA	MEDIO DE CULTIVO
HeLa	CCL 2	Adenocarcinoma de cervix humano.	M-199
HEp-2	CCL 23	Epitelio de carcinoma laríngeo humano.	M-199
McCoy	CRL 1696	Fibroblastos de ratón	MEM
PK15	CCL 33	Riñón de cerdo.	MEM
J774	TIB 67	Macrófago de ratón.	Dulbecco modificado
L-929	CCL 1	Tejido conectivo de ratón.	RPMI-1640

*American Type Culture Collection - ATCC.
 Certified Cell Lines - CCL.
 Cell Repository Lines - CRL.
 Tumor Immunology Bank - TIB.
 MEM - Medio Esencial Mínimo

4.5.1 PREPARACIÓN DE CÉLULAS EN MICROPLACA DE 24 POZOS. (18)

De botellas de cultivos celulares con una confluencia entre un 70 a 80 % con 24 horas de Incubación a 37° C en atmósfera del 5 % de CO₂, se procedió a eliminar el medio de cada botella por la cara opuesta a la monocapa celular. Posteriormente se adiciono 1.5 mL de solución de tripsina-verseno (tripsina al 0.025 % en verseno al 0.05 %), la cual se dejó actuar sobre la monocapa celular por 5 - 10 segundos, se elimino y se dejo actuar la solución residual a un tiempo aproximado de 5 minutos a 37° C facilitando de este modo la disgregación celular.

Posteriormente se realizan de 2 a 3 golpes en un costado de la botella de cultivo para lograr el desprendimiento de la capa celular de su soporte, posteriormente se resuspendieron en medio MEM sin antibiótico adicionado con 10 % de suero fetal de ternera para favorecer el crecimiento. Quinientos microlitros de la suspensión celular fueron depositados en microplacas de 24 pozos que contenían previamente cubreobjetos de 12 mm de diámetro; Las microplacas se incubaron a 37° C por 24 h. Pasado el tiempo de incubación, el sobrenadante se eliminó y posteriormente treientos microlitros de metanol absoluto fueron depositados. La microplaca se incubó a temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente se eliminó el metanol y la microplaca se almacenó a menos 20° C hasta el momento de su uso.

4.6 ENSAYOS DE ADHERENCIA.

4.6.1 ENSAYOS DE ADHERENCIA EN CÉLULAS FIJADAS.

Se empleo un cultivo de 18 - 24 h de la cepa de referencia de *Gardnerella vaginalis* y cepas de campo aisladas de pacientes sintomáticas y asintomáticas de vaginosis bacteriana crecidas en caldo BHI enriquecido con 0.5 % de suero fetal de ternera,

A cada pozo de una microplaca que contenía cubre objetos con células fijadas con metanol de las diferentes líneas celulares, se agregaron quinientos microlitros de caldo de cultivo fresco y doscientos cincuenta microlitros de caldo de cultivo bacteriano. Una laminilla de cada línea celular se le adicionó quinientos microlitros de caldo de cultivo sin bacterias como control negativo de adherencia bacteriana. La microplaca se incubó a 37°C en atmósfera parcial de CO₂ durante 1,3, 6 y 24 horas. De acuerdo al método propuesto por Zepeda y col. ⁽¹³⁾

Transcurrido el tiempo de incubación y en condiciones de esterilidad se retiró el caldo de cultivo de cada pozo. Cinco lavados se realizaron con solución reguladora de fosfatos pH 7.2 posteriormente cada laminilla se fijó con trescientos microlitros de metanol absoluto durante 7 minutos a temperatura ambiente. Después las laminillas se tiñeron con colorante de Giemsa durante 30 minutos, retirando el exceso de colorante con agua corriente. Cada cubreobjetos se fijó con resina al portaobjeto, identificando: línea celular, cepa bacteriana empleada, tiempo de exposición y fecha en que se realizó el ensayo.

MÉTODO DE ADHERENCIA EN CÉLULAS FIJADAS. (13)

Laminillas con células HeLa, HEp-2, McCoy, PK 15, 1774, L-929.

Cepas de *Gardnerella vaginalis* en Base de Agar Casman + 5% de sangre humana.

37° C / CO₂ 5%

Eliminar medio de crecimiento y Fijar con metanol absoluto.

Caldo BHI + 0.5 Suero fetal de ternera

Incubar 1,3,6 y 24 h.

37° C / CO₂

24 h 37° C

Lavar con PBS pH 7.2

Fijar con metanol absoluto.

Teñir con colorante de Giemsa.

Observar al microscopio.

Determinar índice relativo, porcentaje y patrón de adherencia.

500 pL Caldo de cultivo fresco + 250 pL de cultivo bacteriano

C
A
P
I
T
U
L
O

IV

4.6.2 ENSAYO DE ADHERENCIA EN CÉLULAS NO FIJADAS.

Para este ensayo se emplearon cultivos bacterianos con las mismas características dadas para el ensayo en células fijadas, pero con un sólo tiempo de incubación de 3 horas de acuerdo al siguiente método:

A cada pozo de una microplaca que contenía laminillas de células no fijadas con metanol en medio de crecimiento (MEM) sin antibiótico de las diferentes líneas celulares, se agregaron cien microlitros de caldo de cultivo bacteriano. Una laminilla de cada línea celular se le adicionó quinientos microlitros de caldo de cultivo sin bacterias como control negativo de adherencia bacteriana. La microplaca se incubó a 37° C en atmósfera parcial de 5 % de CO₂.

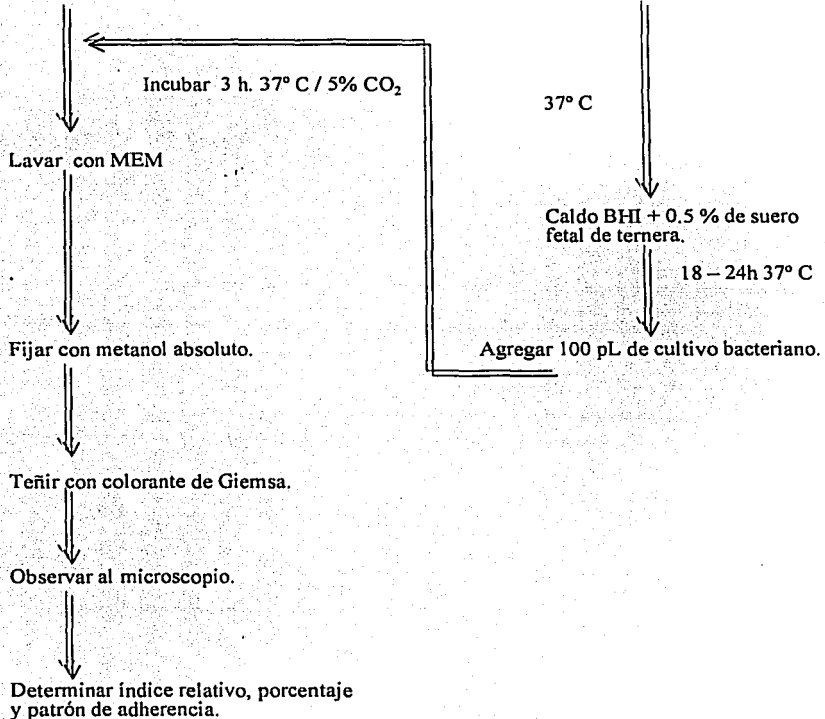
Transcurrido el tiempo de incubación y en condiciones de esterilidad se retiró el medio de crecimiento de cada pozo. Después se realizaron tres lavados con medio de mantenimiento (MEM) sin antibiótico, posteriormente las laminillas se fijaron con trescientos microlitros de metanol absoluto durante 7 minutos a temperatura ambiente.

Los cubreobjetos se tiñeron únicamente con colorante de Giemsa durante 30 minutos, retirando el exceso de colorante e identificando cada laminilla como se realizó en el ensayo de adherencia con células fijadas ya antes descrito, observando al microscopio a inmersión y determinando el índice relativo y el porcentaje de adherencia de acuerdo a los siguientes criterios: La adherencia se determinó como:

MÉTODO DE ADHERENCIA EN CÉLULAS NO FIJADAS. (13)

Células HeLa, HEp-2, McCoy, PK 15, J774 y L-929 en microplaca con medio de mantenimiento.

Cepas de *Gardnerella vaginalis*
Base de Agar Casman + 5%
de sangre Humana.



C
A
P
I
T
U
L
O

IV

4.7 INDICES RELATIVOS, PORCENTAJES Y PATRONES DE ADHERENCIA.

- Adherencia relativa.

Número de bacterias adheridas por célula, de acuerdo a los siguientes valores:

- (+++) 11 ó más bacterias adheridas por célula.
- (++) 6 - 10 bacterias adheridas por célula.
- (+) 2 - 5 bacterias adheridas por célula.
- (-/+) la mayoría con menos de 2 bacterias / célula.
- (-) No-adherencia.

- Porcentaje de adherencia:

Se define como el número de células que presentan 2 o más bacterias adheridas de un total de cien células.

$$\% \text{ de adherencia} = \frac{\text{células con 2 o más bacterias adheridas}}{100} \times 100$$

- Patrón de adherencia se define como:

Agregativo (AggA): Cuando la bacteria se adhiere a la célula huésped, formando agregados que cubren el borde celular.

Difuso (DA): Cuando las bacterias se adhieren sobre toda la superficie celular.

Localizado (LA): Donde las bacterias forman microcolonias en uno o varios puntos de la célula.

4.8 DISEÑO ESTADÍSTICO.

En el análisis estadístico se determinó la media estadística y desviación estándar en las pruebas de adherencia realizadas para cada línea celular.

Capitulo

V

Resultados

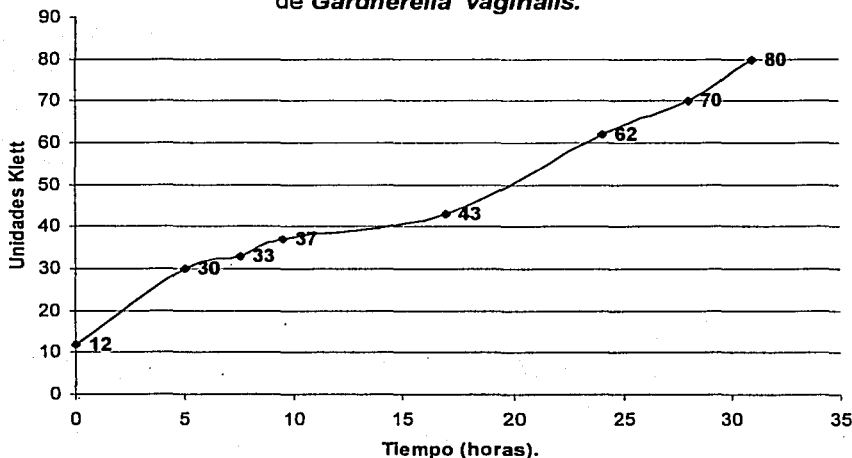
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V. RESULTADOS.

5.1 MEDIOS DE CULTIVO.

Gardnerella vaginalis es un microorganismo de difícil crecimiento y su cinética de crecimiento es poco conocida, por lo que se determinó esta actividad empleando diferentes caldos de cultivo. Los resultados mostraron que el caldo de infusión cerebro-corazón enriquecido con 0.5 % de suero fetal de ternera o suero de caballo permiten la propagación de la bacteria en un lapso de tiempo de 20 a 24 horas de incubación dando una lectura de entre 57 ± 3 Unidades Klett, sin embargo su crecimiento óptimo fue hasta las 32 h de incubación. (figura 1)

figura 1: Curva de crecimiento⁽¹⁹⁾
de *Gardnerella vaginalis*.



5.2 ENSAYO DE ADHERENCIA DE LA CEPA DE *Gardnerella vaginalis* (ATCC 14018) CON CÉLULAS FIJADAS.

En la tabla 2 se describen los índices relativos de adherencia obtenidos con la cepa de referencia de *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018 sobre las diferentes líneas celulares. Para el tiempo de incubación de 1 hora, la adherencia fue menor a 5 bacterias en 4 de las 6 las líneas celulares empleadas, a excepción de las células HEP-2 y McCoy en las que fue entre 6 y 10 bacterias.

En cuanto al tiempo de incubación de 3 y 6 horas una mayor adherencia relativa fue observada en todas las líneas celulares. Las células HeLa, HEP-2 y McCoy mostraron mayor adherencia (11 ó más bacterias adheridas por célula), que las células PK15, J774 y L929 que fueron de entre 2 y 10 bacterias adheridas por célula. (figuras 2 a 7)

A las 24 horas de incubación las líneas celulares HeLa, HEP-2 y McCoy mostraron al menos 5 bacterias adheridas por célula, mientras que las células L-929 no más de 2 bacterias adheridas por célula, excepto PK15 y J774 las cuales no mostraron adherencia.

Tabla 2:

**ÍNDICES RELATIVOS DE ADHERENCIA DE
Gardnerella vaginalis (ATCC 14018) EN CÉLULAS FIJADAS.**

Líneas celulares.	1h	3h	6h	24h
HeLa	+	+++	+++	+
HEp-2	++	+++	+++	+
McCoy	++	+++	+++	+
PK-15	-	+	++	-
J774	+	++	++	-
L-929	-	+	++	-/+

- (+++) 11 ó más bacterias adheridas por célula.
- (++) 6 - 10 Bacterias adheridas por célula.
- (+) 2 - 5 Bacterias adheridas por célula.
- (-/+) La mayoría con menos de 2 bacterias adheridas por célula.
- (-) Ausencia de adherencia.

En la tabla 3 se describe el porcentaje de adherencia obtenido con la cepa de referencia de *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018 sobre las diferentes líneas celulares. A 1 h de incubación se obtuvo de un 45 a un 59 % de adherencia en las líneas celulares HeLa, HEp-2, McCoy y J774; mientras que en las líneas celulares PK-15 y L-929 no se obtuvo adherencia.

Sin embargo a los tiempos de 3 y 6 h de incubación se observó un porcentaje de adherencia de la bacteria entre un 85 y 95 % en células HeLa, HEp-2 y McCoy, mientras que las células PK15, J774 y L-929 mostraron una adherencia entre el 26 y el 79 %. Finalmente a las 24 h de incubación la adherencia disminuyó drásticamente a menos del 45 % para células HeLa, HEp-2 y McCoy; a menos de 11 % para células L-292; mientras que para las células PK-15 y J774 no se observó adherencia de la bacteria.

Tabla 3:

**PORCENTAJE DE ADHERENCIA DE
Gardnerella vaginalis (ATCC 14018) EN CÉLULAS FIJADAS.**

Líneas celulares.	1h	3h	6h	24h
HeLa.	53 ± 6	95 ± 1	85 ± 3	45 ± 1
HEp-2	59 ± 6	94 ± 3	92 ± 3	16 ± 2
McCoy	55 ± 3	92 ± 2	93 ± 1	31 ± 1
PK15	0	44 ± 2	55 ± 1	0
J774	45 ± 2	72 ± 1	79 ± 3	0
L-929	0	26 ± 2	53 ± 1	11 ± 2

El patrón de adherencia observado para cada línea celular a los tiempos de incubación de 1,3,6 y 24 h se muestra la en tabla 4; El patrón de adherencia observado a 1 hora de incubación en la mayoría de las líneas celulares fue del tipo difuso, a excepción de células PK15 y L-929 en las cuales no se llevó a cabo la adherencia.

En cuanto a las 3 h de incubación se presento un patrón de adherencia de tipo difuso (DA) en células PK15, J774 y L929, mientras que para las líneas celulares HeLa, HEp-2 y McCoy se dio un patrón de adherencia del tipo agregativo (AggA), el cual se observó también a las 6 h de incubación. (figura 2 - 4)

En el caso de las líneas celulares PK15, J774 y L-929 el patrón de adherencia observado a las 6 h de incubación cambio del tipo difuso (DA) al tipo agregativo (AggA).

Finalmente a las 24 h de incubación se observó un cambio del patrón de adherencia de tipo agregativo (AggA) a difuso (DA) para las líneas celulares HeLa, HEp-2, McCoy y J774, mientras que para las líneas PK15 y L-929 no se observó ningún patrón de adherencia.

Tabla 4:

**PATRÓN DE ADHERENCIA DE
Gardnerella vaginalis (ATCC 14018) EN CÉLULAS FIJADAS.**

Línea celular.	1h	3h	6h	24h
HeLa.	DA	AggA	AggA	DA
HEp-2	DA	AggA	AggA	DA
McCoy	DA	AggA	AggA	DA
PK15	SD	DA	AggA	SD
J774	DA	DA	AggA	DA
L929	SD	DA	AggA	SD

(AggA) Agregativo.
(DA) Difuso.
(SD) Sin adherencia.

(A) →

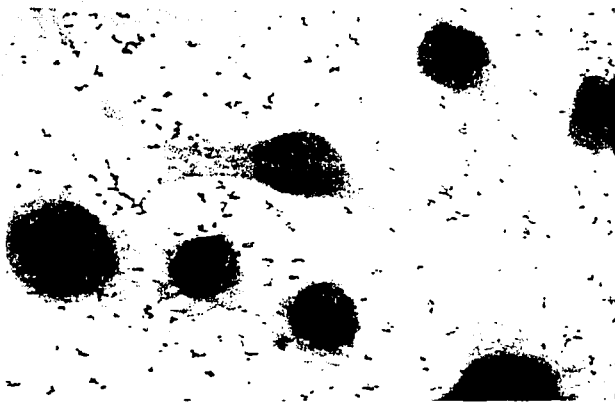


(B) →



Figura 2:
Adherencia de *Gardnerella vaginalis* (ATCC 14018)
a Células HeLa fijadas con metanol;
A) 3hrs. de incubación.
B) 6hrs. de incubación.

(A) →



(B) →

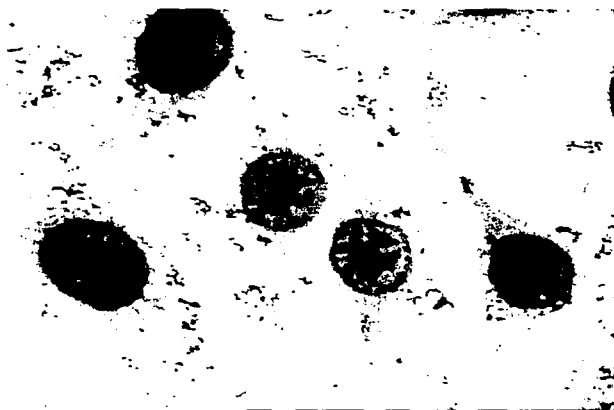


Figura 3:
Adherencia de *Gardnerella vaginalis* (ATCC 14018)
a Células HEp-2 fijadas con metanol;
A) 3hrs. de incubación.
B) 6hrs. de incubación.

(A) →



(B) →



Figura 4:
Adherencia de *Gardnerella vaginalis* (ATCC 14018)
a Células McCoy fijadas con metanol;
A) 3hrs. de incubación.
B) 6hrs. de incubación.

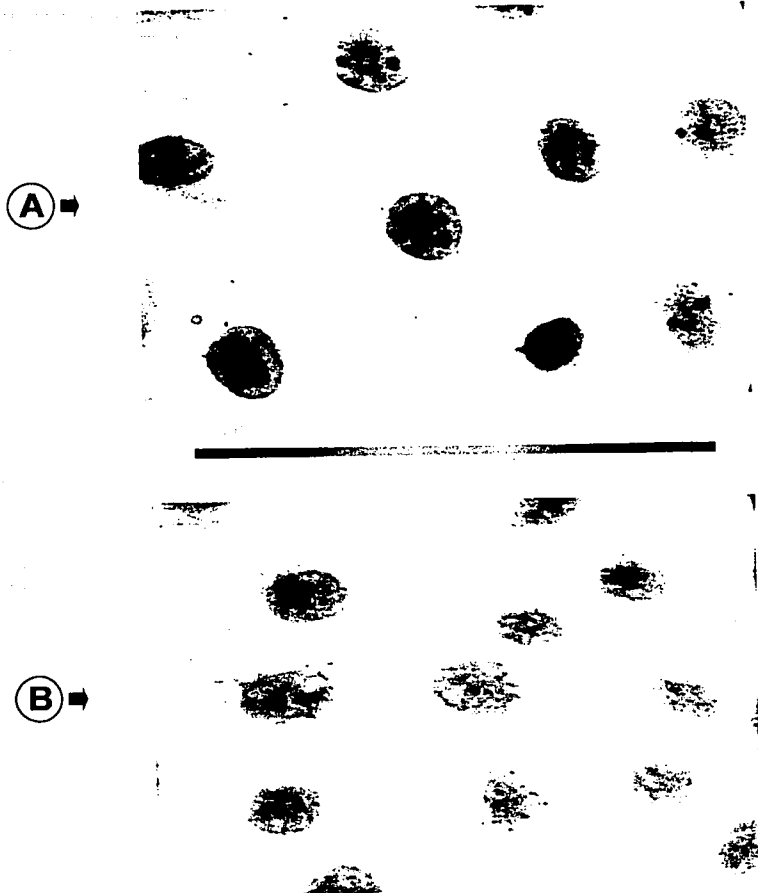


Figura 5:
Adherencia de *Gardnerella vaginalis* (ATCC 14018)
a Células PK 15 fijadas con metanol;
A) 3hrs. de incubación.
B) 6hrs. de incubación.

(A) →



(B) →



Figura 6:
Adherencia de *Gardnerella vaginalis* (ATCC 14018)
a Células J774 fijadas con metanol;
A) 3hrs. de incubación.
B) 6hrs. de incubación.

(A) →



(B) →

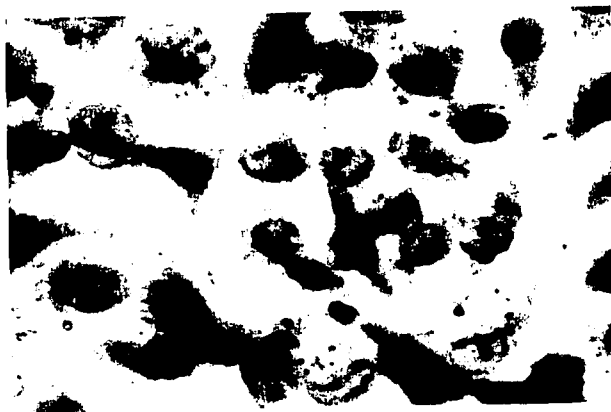


Figura 7:
Adherencia de *Gardnerella vaginalis* (ATCC 14018)
a Células L929 fijadas con metanol;
A) 3hrs. de incubación.
B) 6hrs. de incubación.

5.3 ENSAYO DE ADHERENCIA DE LA CEPA DE *Gardnerella vaginalis* (ATCC 14018) EN CÉLULAS NO FIJADAS.

Para este ensayo de adherencia se seleccionaron sólo 4 de las 6 líneas celulares empleadas en el estudio anterior. Las células seleccionadas fueron las líneas HeLa, HEP-2, McCoy y PK15. El tiempo de incubación empleado para este estudio fue de 3 h.

Los resultados de adherencia obtenidos en células no fijadas mostró que el porcentaje de adherencia no fue mayor al 40 %, y que la adherencia relativa fue de 6 a 10 bacterias adheridas por célula, excepto para células PK15 que fue de 0 % de adherencia. El patrón de adherencia observado en las células HeLa, HEP-2 y McCoy fue de tipo agregativo (AggA), como se puede observar en la tabla 5, además de observar un daño en la integridad de la membrana celular con disgregación parcial del citoplasma. (figuras 8 y 9)

C
A
P
I
T
U
L
O
V

Tabla 5:

ÍNDICE RELATIVO, PORCENTAJE Y PATRÓN DE ADHERENCIA DE *Gardnerella vaginalis* (ATCC 14018) A CÉLULAS NO FIJADAS.

LINEA CELULAR	INDICE RELATIVO DE ADHERENCIA	% ADHERENCIA.	PATRON DE ADHERENCIA.
HeLa	++	36 ± 3	AggA
HEp-2	++	31 ± 1	AggA
McCoy	++	34 ± 1	AggA
PK(15)	-	0	NA

- (++) 6 - 10 Bacterias adheridas por célula.
- (-) Ausencia de adherencia.
- (AggA) Agregativo.
- (NA) No adherente.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 8:
Adherencia de *Gardnerella vaginalis* (ATCC 14018);
A) Células HeLa no fijadas.
B) Células HEp-2 no fijadas.

A



B

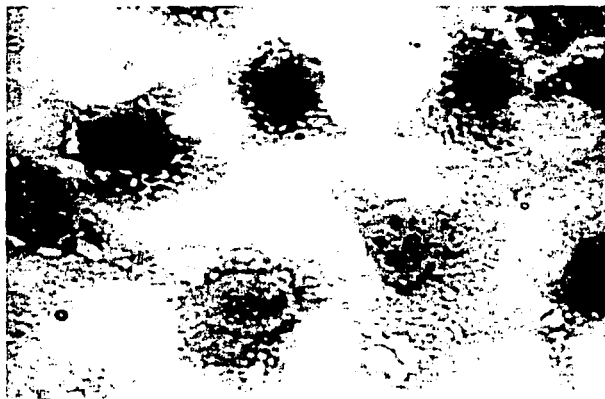


Figura 9:
Adherencia de *Gardnerella vaginalis* (ATCC 14018);
A) Células McCoy no fijadas
B) Células PK15 no fijadas

5.4 ADHERENCIA DE LAS CEPAS DE *Gardnerella vaginalis* AISLADA DE PACIENTES CON VAGINOSIS BACTERIANA EN CELULAS FIJADAS.

Para los ensayos de adherencia con cepas de *Gardnerella vaginalis* de pacientes con signos y síntomas de vaginosis bacteriana se emplearon células fijadas HeLa, HEP-2, McCoy y PK15, (tabla 6)

Los resultados mostraron que hay un porcentaje de adherencia entre 72 y 94 % en todas las líneas celulares, siendo las células PK15 las menos efectivas para la adherencia de estas cepas. En cuanto al índice relativo se observó que fue de entre 6 a 10 bacterias adheridas por célula en todas las cuatro líneas celulares empleadas.

El patrón de adherencia fue del tipo agregativo (AggA), excepto para las células PK15, el cual fue difuso (DA). (tabla 7)

Una observación importante fue que la cepa 3B presenta un patrón de adherencia del tipo difuso (DA) en células McCoy, a diferencia del resto de las cepas, el cual fue agregativo (AggA) y un menor porcentaje de adherencia en todas las líneas celulares en comparación con las diferentes cepas bacterianas 1B, 2B y 4B. (figura 10 - 11)

Tabla 6:

**ÍNDICE RELATIVO Y PORCENTAJE DE ADHERENCIA
DE LAS CEPAS DE *Gardnerella vaginalis*
AISLADAS DE PACIENTES CON VAGINOSIS BACTERIANA
EN CÉLULAS FIJADAS.**

Cepa	HELA		HEP-2		MCCOY		PK(15)	
	Índice relativo	%	Índice relativo	%	Índice relativo	%	Índice relativo	%
1B	+++	87 ± 1	+++	89 ± 3	++	84 ± 1	++	73 ± 4
2B	+++	90 ± 2	+++	85 ± 1	+++	91 ± 1	++	85 ± 1
3B	++	73 ± 2	++	84 ± 2	++	72 ± 1	++	73 ± 4
4B	++	90 ± 2	+++	91 ± 1	+++	94 ± 1	++	83 ± 3

(+++) 11 ó más bacterias adheridas por célula.
(++) 6 - 10 Bacterias adheridas por célula.

Tabla 7:

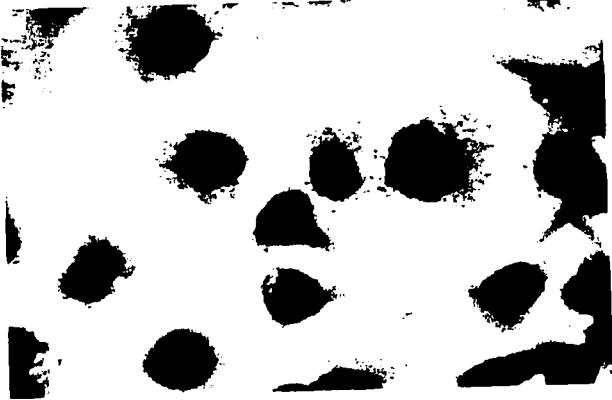
PATRÓN DE ADHERENCIA DE LAS CEPAS DE *Gardnerella vaginalis* AISLADAS DE PACIENTES CON VAGINOSIS BACTERIANA EN CÉLULAS FIJADAS

Cepa	HeLa	HEp-2	McCoy	PK15
1B	AggA	AggA	AggA	DA
2B	AggA	AggA	AggA	DA
3B	AggA	AggA	DA	DA
4B	AggA	AggA	AggA	DA

(AggA) Agregativo.

(DA) Difuso.

(A) →



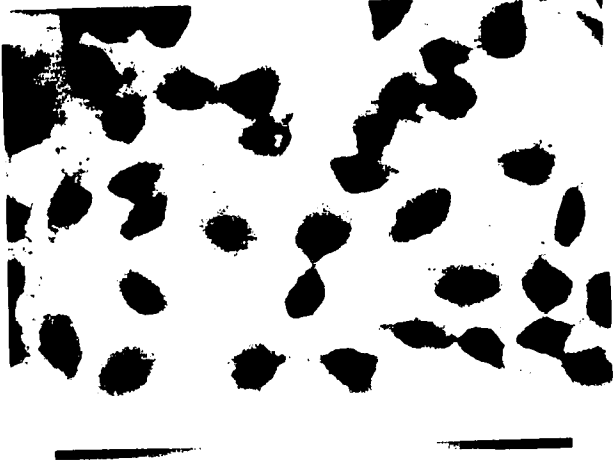
(B) →



Figura 10:
Adherencia de *Gardnerella vaginalis* Aisladas de pacientes con vaginosis bacteriana en Células McCoy fijadas.

- A) Cepa 1B.
- B) Cepa 2B.

C →



D →



Figura 11:
Adherencia de *Gardnerella vaginalis* Aisladas de pacientes con
vaginosis bacteriana en Celulas McCoy fijadas.

A) Cepa 3B.

B) Cepa 4B.

5.5 ADHERENCIA DE CEPAS DE *Gardnerella vaginalis* AISLADA DE PACIENTES CON VAGINOSIS BACTERIANA EN CELULAS NO FIJADAS.

Con respecto a los ensayos de adherencia realizados en células no fijadas se encontró que el porcentaje de adherencia de las cepas de *Gardnerella vaginalis* de pacientes con vaginosis bacteriana se observó entre el 5 y 58 %, el índice relativo fue diverso de acuerdo al tipo celular, por ejemplo para las células HeLa fue de 2 a 5 bacterias adheridas por célula para todas las cepas, para células HEp-2 fue de 6 a 10 bacterias adheridas para las cepas 2B y 3B, mientras que las cepas 1B y 4B fueron de 11 ó más bacterias adheridas.

En el caso de células McCoy fue de 6 a 10 bacterias adheridas por célula, excepto para la cepa 4B, la cual no presentó adherencia en esta línea celular.

En células PK15 se observó un índice relativo de adherencia entre 2 y 5 bacterias adheridas por célula para las cepas 2B y 4B; mientras que para las cepas 1B y 3B fue al menos de 2 bacterias adheridas por célula. (Tabla 8)

Por último cabe mencionar que en este ensayo se observó un daño a la integridad de la membrana celular con formación de vacuolas (figura 10) y en algunos casos con disgregación parcial de citoplasma. (figura 11)

Tabla 8:

ÍNDICE RELATIVO Y PORCENTAJE DE ADHERENCIA DE LAS CEPAS DE *Gardnerella vaginalis* AISLADAS DE PACIENTES CON VAGINOSIS BACTERIANA EN CÉLULAS NO FIJADAS

cepa	HeLa		HEp-2		McCoy		PK15	
	Índice relativo	%	Índice relativo	%	Índice relativo	%	Índice relativo	%
1B	+	32 ± 2	+++	47 ± 2	++	20 ± 1	-/+	5 ± 3
2B	+	38 ± 2	++	38 ± 1	++	21 ± 2	+	13 ± 4
3B	+	33 ± 4	++	42 ± 3	++	16 ± 4	-/+	8 ± 1
4B	++	48 ± 6	+++	58 ± 2	-	0	+	6 ± 2

- (+++)
 - (++)
 - (+)
 - (-/+)
 - (-)
- 11 ó más bacterias adheridas por célula.
 6 - 10 Bacterias adheridas por célula.
 2 - 5 Bacterias adheridas por célula.
 La mayoría con menos de 2 bacterias adheridas por célula.
 Ausencia de adherencia.

En cuanto al patrón de adherencia observado para las cuatro cepas de *Gardnerella vaginalis* en las líneas celulares HeLa y HEp-2 fue del tipo agregativo (AggA), lo mismo para la línea McCoy con las cepas 1B y 3B, ya que la cepa 4B no presentó adherencia; en cambio para la línea celular PK15 la adherencia fue de tipo difuso con las cepas 2B y 4B (DA), ya que con las cepas 1B y 3B no fue posible el determinar un patrón de adherencia.

Una observación interesante fue que la cepa 2B mostró un patrón de adherencia del tipo difuso (DA) en células McCoy a diferencia de las otras cepas.

Tabla 9:

PATRONES DE ADHERENCIA DE CEPAS DE *Gardnerella vaginalis* AISLADAS DE PACIENTES CON VAGINOSIS BACTERIANA EN CÉLULAS NO FIJADAS.

Cepa	HeLa.	HEp-2	McCoy	PK15
1B	AggA	AggA	AggA	ND
2B	AggA	AggA	DA	DA
3B	AggA	AggA	AggA	ND
4B	AggA	AggA	NA	DA

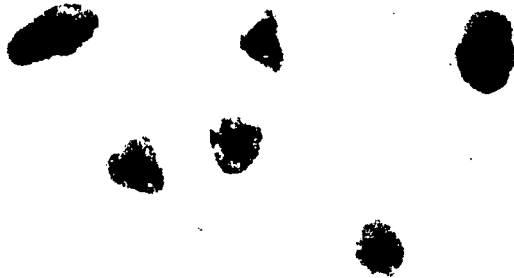
(AggA) Agregativo.

(DA) Difuso.

(NA) No adherente.

(ND) No se puede determinar un patrón de adherencia.

A →



B →

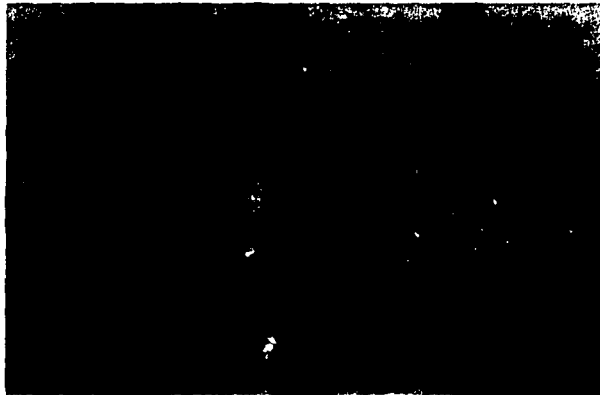
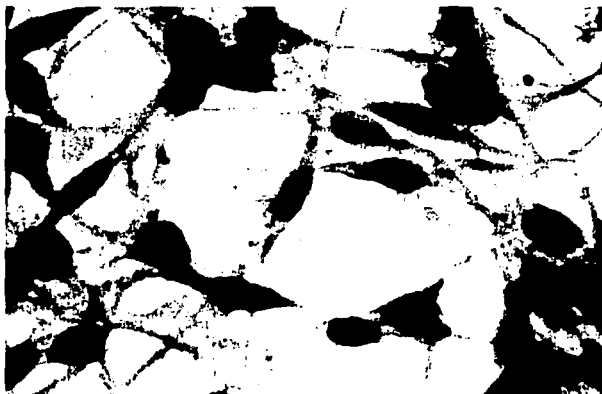


Figura 12:
Adherencia de *Gardnerella vaginalis* Aisladas de pacientes con vaginosis bacteriana en Células McCoy no fijadas.

A) Cepa 1B.

B) Cepa 2B.

C →



D →



Figura 13:
Adherencia de *Gardnerella vaginalis* Aisladas de pacientes con vaginosis bacteriana en Células McCoy no fijadas.

C) Cepa 3B.

D) Cepa 4B.

5.6 ADHERENCIA DE CEPAS DE *Gardnerella vaginalis* AISLADA DE PACIENTES SIN SIGNOS Y SÍNTOMAS DE VAGINOSIS BACTERIANA EN CÉLULAS FIJADAS.

Para el caso de cepas de *Gardnerella vaginalis* de pacientes sin signos y síntomas de vaginosis bacteriana, se encontró que estas tienden a presentar un índice de adherencia de al menos 2 bacterias adheridas por célula para la línea HEp-2, y de ausencia de adherencia para la línea PK15; en el caso de las cepas 3A y 4A en células McCoy se observó que estas muestran un índice relativo de adherencia de 2 a 5 bacterias, la cepa 1A de al menos 2 bacterias, mientras que la cepa 2A no presentó adherencia. (tabla 10)

En cuanto al porcentaje de adherencia fue entre un 0 y 18 % dependiendo del tipo de la cepa y del tipo de la línea celular empleada. (tabla 10)

Tabla 10:

ÍNDICE RELATIVO Y PORCENTAJE DE ADHERENCIA DE CEPAS DE *Gardnerella vaginalis* AISLADAS DE PACIENTES SIN VAGINOSIS BACTERIANA EN CÉLULAS FIJADAS.

Cepa	HEp-2		McCoy		PK(15)	
	Índice relativo	Porcentaje de adh.	Índice relativo	Porcentaje de adh.	Índice relativo	Porcentaje de adh.
1A	-/+	18 ± 3	-/+	10 ± 2	-	0
2A	-	0	-	0	-	0
3A	-/+	14 ± 3	+	17 ± 2	-	0
4A	-/+	12 ± 4	+	12 ± 3	-	0

- (+) 2 - 5 Bacterias adheridas por célula.
- (-/+) La mayoría con menos de 2 bacterias adheridas por célula.
- (-) Ausencia de adherencia.

Con respecto a los patrones de adherencia sólo fue posible reconocerlo en células McCoy con las cepas 3A y 4A el cual presentó un patrón de adherencia del tipo difuso (DA), en cambio en las células HEp-2 el patrón de adherencia de las cuatro cepas no se logró determinar, ya que el número de bacterias fue escasamente de 2 bacterias adheridas por célula.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las células fijadas, se decidió no realizar el estudio de adherencia en células no fijadas, ya que al emplear la cepa de referencia de *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018 con células no fijadas se observó una disminución en los índices relativos y porcentajes de adherencia, el cual fue menor a un 40 %.

Tabla 11:

**PATRÓN DE ADHERENCIA DE
Gardnerella vaginalis AISLADA DE PACIENTES SIN
VAGINOSIS BACTERIANA A CÉLULAS FIJADAS.**

Cepa	HEp-2	McCoy	PK(15)
1A	ND	ND	NA
2A	NA	NA	NA
3A	ND	DA	NA
4A	ND	DA	NA

- (DA) Adherencia difusa.
- (NA) No adherente.
- (ND) No se puede determinar un patrón de adherencia.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Capítulo
VI
Discusión

VI. DISCUSIÓN.

La adherencia es una propiedad de un gran número de bacterias que le permite fijarse a la superficie de las células huésped. Constituye uno de los factores más importantes para la colonización de la piel y mucosas tanto por la flora nativa, como por microorganismos patógenos que pondrán en marcha la infección y la enfermedad infecciosa. (11 - 12)

El evento de adherencia se ha investigado y descrito más ampliamente en estudios realizados con *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC),⁽¹³⁾ *Neisseria meningitidis* ⁽²⁰⁾ y *Haemophilus influenzae* ⁽²¹⁾ entre otros, empleando modelos celulares in vitro. (6, 8, 10, 13, 22,23)

Las adhesinas bacterianas pueden estar situadas en el glucocalix o en estructuras superficiales como las fimbrias o pilis (5, 7, 9, 10, 11, 12) lo que les permite aproximarse a distancias cortas con los receptores celulares y combinarse en forma específica, formando numerosos enlaces independientes que aumentan la fortaleza de su unión. (2, 11, 24)

Los ensayos de adherencia en este estudio fueron realizados en base a los antecedentes de adherencia con cepas de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) en modelos celulares in vitro.⁽¹³⁾ Los métodos de adherencia, se adaptaron y estandarizaron con los mismos fines para demostrar la capacidad de *Gardnerella vaginalis* para unirse a células fijadas con metanol.

Esta investigación difiere de los ensayos de adherencia realizados por Peeters y Cols,⁽⁶⁾ Scott y Cols.^(8, 9) quienes emplearon cepas de *Gardnerella vaginalis* y cultivo de células de epitelio vaginal y McCoy en suspensión, dando tratamientos físicos y químicos tanto a las bacterias como a las células empleadas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los ensayos de adherencia los realizaron con 1 h de incubación, sin describir algún patrón de adherencia dado por la bacteria al interactuar con la célula, aunque hicieron mención de un índice relativo de adherencia al observar 4 o más bacterias adheridas por célula.

En el presente estudio empleando una cepa de *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018 se observó que las células HeLa, HEp-2, McCoy y J774 siguieron un índice relativo de adherencia semejante a lo reportado por Peeters y Cols,⁽⁶⁾ Scott y Cols.^(8,9) a una hora de incubación, mostrando un patrón de adherencia del tipo difuso (DA), mientras que en PK15 y L-929 la adherencia no se observó. En un tiempo de incubación de 3 horas se observaron pequeñas colonias adheridas sobre células HeLa, HEp-2 y McCoy; conformadas de once o más bacterias, siguiendo un patrón de adherencia de tipo agregativo (AggA), mientras que en células PK15, J774 y L-929 la adherencia fue menor y del tipo difuso (DA). A las 6 horas de incubación el tamaño y patrón de adherencia de las colonias se mantuvo en células HeLa, HEp-2, McCoy, mientras que para PK15, J774 y L-929 esta aumentó hasta diez bacterias adheridas por célula siguiendo un patrón de tipo (AggA).

Sin embargo a un tiempo de incubación de 24 h dicho evento disminuyó, observándose de 2 a 5 bacterias adheridas por célula en HeLa, HEp-2 y McCoy, e inhibiéndose en PK15, J774 y L-929.

En este trabajo se demostró que *Gardnerella vaginalis* presenta la capacidad de unirse a diferentes líneas celulares fijadas. Además, sigue un patrón de adherencia del tipo agregativo (AggA) principalmente en células HeLa, HEp-2 y McCoy con un índice relativo y porcentaje de adherencia semejante a lo presentado en células de descamación del epitelio vaginal, a un tiempo de incubación de 3 h a 37° C. Aunque en esta investigación no se dio tratamiento físico y/o químico a cepas bacterianas ni a líneas celulares como lo realizado por Peeters y Cols,⁽⁶⁾ Scott y Cols.^(8,9) se logró demostrar que *Gardnerella vaginalis* tiene capacidad de adherirse sobre estas células.

Por otro lado en las células PK15, J774 y L-929 fijadas con metanol se observó un patrón de adherencia del tipo difuso (DA) con índices relativos y porcentajes de adherencia menores a los encontrados en células HeLa, HEp-2 y McCoy, lo que sugiere que puede existir la ausencia de receptores celulares específicos para la unión de la bacteria a estas líneas celulares.

En la adherencia bacteriana el tiempo de incubación así como el reconocimiento específico entre las adhesinas bacterianas y los receptores celulares son un factor importante para que dicho evento se de, además de las condiciones requeridas para ello.

En cuanto a la adherencia en células no fijadas se encontró que *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018 presenta un patrón de adherencia del tipo agregativo en células HeLa, HEp-2 y McCoy, tal como se observa en células clave; aunque los índices relativos de adherencia tendieron a disminuir al igual que el porcentaje de adherencia o en su caso no darse dicho evento, como sucedió con células PK15.

Además en los ensayos de adherencia con células no fijadas se observó que la célula tiende a sufrir un daño en la membrana con disgregación parcial del citoplasma, como se ha observado en células clave, las cuales van perdiendo parcialmente los bordes celulares.⁽²⁵⁾ Esta destrucción de la membrana celular posiblemente es debido a que *Gardnerella vaginalis* dentro de su actividad metabólica libera sustancias que tienden a actuar de manera citotóxica. De ahí que al realizar ensayos de adherencia en células no fijadas no fueron de gran utilidad, ya que se observó que éste es un método no apropiado, debido a que la pérdida parcial de la membrana celular no permitió observar claramente el evento de adherencia y por ende determinar índices relativos y patrones de adherencia.

En cuanto a los índices relativos, porcentajes y patrones de adherencia obtenidos de cepas de *Gardnerella vaginalis* aisladas de pacientes con signos y síntomas de vaginosis bacteriana fueron semejantes a los observados con cepa de *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018 tanto en células no fijadas como en células fijadas con metanol. En el caso de las cepas de *Gardnerella vaginalis* aisladas de pacientes sin signos y síntomas de vaginosis bacteriana, se encontró que estas presentaron índices relativos y porcentajes de adherencia muy por debajo de los observados en células fijadas, o en alguno de los casos dicho evento no se presentó.

Por otro lado diversos investigadores han propuesto la existencia de diferentes biotipos de *Gardnerella vaginalis*, en los cuales se han caracterizado las variaciones fenotípicas de esta bacteria que pudieran estar asociados con el desarrollo o no de los signos y síntomas de la vaginosis bacteriana. (15, 26, 27)

Con respecto a las líneas celulares cabe señalar que las células HeLa, HEp-2 y McCoy podrían ser utilizadas en el estudio de adherencia de *Gardnerella vaginalis*.

Las células HeLa son células epiteliales de un adenocarcinoma de cervix de una mujer negra de 31 años de edad, las cuales son muy empleadas en el diagnóstico y crecimiento de poliovirus tipo 1 y adenovirus tipo 3. Las células HEp-2 son células de epitelio de carcinoma de laringe humano, de un hombre caucásico de 56 años de edad, las cuales ha sido empleadas en el diagnóstico y crecimiento de Arvovirus, sarampión, virus sincicial respiratorio y poliovirus, y en estudios de adherencia de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). (13)

En cuanto a células McCoy son fibroblastos de ratón que representan un marcador cromosómico característico de la línea celular L de ratón, ésta línea es muy empleada en el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*. (28)

Otras líneas celulares que fueron empleadas y que no tuvieron una buena evaluación sobre la adherencia de *Gardnerella vaginalis* fueron PK15, J774 y L-929. Las células PK15 son células de riñón de un cerdo adulto, éstas células han sido empleadas para el diagnóstico y propagación de diversos virus de cerdo tales como exantema vesicular y fiebre porcina africana, y en la última década se ha descubierto que esta línea celular esta infectada de origen por un circovirus. ⁽²⁹⁾

En el caso de las células J774, son células provenientes de una línea de monocitos y macrófagos de ratón que producen IL-1 y que muestra receptores para el complemento y fracción Fc de los anticuerpos, ésta línea ha sido utilizada para estudios sobre fagocitosis empleando diversos agentes patógenos. ⁽³⁰⁾

Las células L-929 son fibroblastos de tejido conectivo de ratón, son parientes de cepa L que fue establecida en 1940; las células L fueron una de las primeras líneas celulares y la clona 929 fue la primera cepa clonada de las células L, ésta línea ha sido empleada en el diagnóstico y propagación de virus tales como pseudorabia, estomatitis vesicular y herpes simples, además, ha sido empleada en la detección de la citosina denominada como factor de necrosis tumoral. ⁽³¹⁾

Una observación importante es que las células McCoy son susceptibles a la adherencia de *Gardnerella vaginalis* a diferencia de las células L-929 las cuales no son susceptibles, ambas líneas celulares provienen de una línea común de células, lo que sugiere que existan diferencias entre los receptores de las dos diferentes líneas celulares que podrían estar involucrados en el reconocimiento de la bacteria.

Finalmente cabe señalar que la unión de la bacteria a la célula huésped tiende a estar dada por diversos mecanismos que condicionan la interacción, entre ellos el reconocimiento y afinidad de receptores tanto de la bacteria como en las diferentes líneas celulares estudiadas.

Capitulo

VII

Conclusiones

VII. CONCLUSIONES.

Gardnerella vaginalis ATCC 14018 presenta la capacidad de adherirse a diferentes líneas celulares tales como HeLa, HEP-2 y McCoy fijadas con metanol.

La adherencia es mayor en células HeLa, HEP-2 y McCoy; mostrando un índice de relativo de 11 ó más bacterias adheridas, así como un porcentaje de adherencia mayor a 92 % a un tiempo de incubación de 3 h a 37 °C.

El patrón de adherencia que expresa *Gardnerella vaginalis* es de tipo agregativo (AggA) sobre células HeLa, HEP-2 y McCoy.

Las cepas de *Gardnerella vaginalis* procedentes de pacientes con signos y síntomas de vaginosis bacteriana presentan un comportamiento de adherencia semejante a cepa de *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018 sobre células HeLa, HEP-2 y McCoy.

Las cepas de *Gardnerella vaginalis* aisladas de pacientes sin signos y síntomas de vaginosis bacteriana, no muestran un índice relativo, porcentaje y patrón de adherencia al observado con la cepa de *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018 y cepas procedentes de pacientes con signos y síntomas de vaginosis bacteriana.

El empleo de células no fijadas no es un método adecuado para los estudios de adherencia, ya que estas sufren daño en su membrana celular, debido a que posiblemente la bacteria tiende a producir sustancias citotóxicas dentro de su actividad metabólica.

VIII. PROPUESTAS DE ESTE TRABAJO.

Con base al daño observado en células no fijadas por la acción de *Gardnerella vaginalis* se despertó el interés por la búsqueda de productos del metabolismo que actúan de manera citotóxica, diferente a la hemolisina ya conocida y producidas por éste microorganismo.

En este trabajo también se propone el realizar estudios epidemiológicos de cepas de *Gardnerella vaginalis* aisladas de pacientes con y sin signos y síntomas de vaginosis bacteriana en el que además de realizar pruebas de adherencia se de la búsqueda de DNA plasmídico o extracromosomal que pudiera estar asociado al fenómeno de adherencia y por ende ligado a los signos y síntomas de la vaginosis bacteriana causada por *Gardnerella vaginalis*.

C
A
P
I
T
U
L
O

VIII

Capitulo

IX

Apéndice

IX. APENDICE

9.1 MEDIOS DE CULTIVO.

• BASE DE AGAR CASMAN (BIOXON) SANGRE HUMANA.

Fórmula para 1000 mL en agua destilada.

Extracto de levadura	3.5 g
Peptona de caseína	11.3 g
Peptona de carne	5.0 g
Extracto de carne	3.0 g
Nicotinamida	0.05 g
Ácido p-aminobenzoico	0.05 g
Dextrosa	0.50 g
Almidón de maíz	1.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	13.5 g

PREPARACIÓN: suspender 43 g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar perfectamente, calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto hasta disolución completa; esterilizar en autoclave a 121° C por 15 minutos.

Enfriar a 45 - 50° C, agregar 5 % de sangre humana desfibrinada en condiciones de esterilidad y envasar en cajas de Petri estériles. Debe hacerse prueba de esterilidad incubando a 37° C durante 24 h antes de usarse este medio y determinar su funcionalidad con cultivo de microorganismos típicos.

• BASE DE AGAR CASMAN (BIOXON) SUERO FETAL DE TERNERA.

PREPARACIÓN: suspender 43 g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar perfectamente, calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto hasta disolución completa; esterilizar en autoclave a 121° C por 15 minutos.

Enfriar a 45 - 50° C, agregar 10 mL de suero fetal de ternera en condiciones de asépticas y envasar en cajas de Petri estériles. Debe hacerse prueba de esterilidad incubando a 37° C durante 24 h antes de usarse este medio y determinar su funcionalidad con cultivo de microorganismos típicos.

• CALDO DE INFUSIÓN CEREBRO - CORAZÓN (BHI) ENRIQUECIDO CON 0,5 % DE SUERO FETAL DE TERNERA.

Formula para 1000 mL en agua destilada.

Infusión deshidratada de cerebro y corazón de ternera	17.5 g
Proteosa peptona	10.0 g
Dextrosa	2.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato disódico	2.5 g

PREPARACIÓN: disolver el medio deshidratado y envasar 5 mL de éste en tubos con tapón de rosca de 13 X 100 mm y esterilizar en autoclave a 121° C por 15 minutos. Dejar a enfriar a temperatura ambiente y agregar 50 µL de suero a cada tubo o en su caso medio de enriquecimiento requerido.

Debe hacerse prueba de esterilidad incubando a 37° C durante 24 h antes de usarse.

• CALDO TODD HEWITT

Fórmula para 1000 mL en agua destilada.

Infusión de corazón de ternera	500 g
Neopeptona	20 g
Dextrosa	2.0 g
Cloruro de sodio	2.0 g
Fosfato de sodio	0.4 g
Carbonato de sodio	2.5 g

PREPARACIÓN: disolver el medio deshidratado y envasar 5 mL de éste en tubos con tapón de rosca de 13 X 100 mm y esterilizar en autoclave a 121° C por 15 minutos. Dejar a enfriar a temperatura ambiente y agregar medio de enriquecimiento requerido.

Debe hacerse prueba de esterilidad incubando a 37° C durante 24 h antes de usarse.

• CALDO COLUMBIA.

Fórmula para 1000 mL en agua destilada.

Almidón de maíz	500 g
Cloruro de sodio	2.0 g
Peptona biotriptasa	10.0 g
Peptona de músculo cardíaco	3.0 g
Polipeptona	10.0 g

PREPARACIÓN: rehidratar 42.5 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada y envasar 5 mL de éste en tubos con tapón de rosca de 13 X 100 mm y esterilizar en autoclave a 121° C por 15 minutos.

Dejar a enfriar a temperatura ambiente y agregar medio de enriquecimiento requerido.

Debe hacerse prueba de esterilidad incubando a 37° C durante 24 h antes de usarse.

• MEDIOS DE CULTIVO CELULARES

- Medio - 199 con base de sales Earle al 90 % y adicionado con 10 % de suero fetal de ternera para líneas celulares HeLa y HEp-2.
- Medio Mínimo Esencial (MEM) con base de sales Earle al 95 %, Piruvato de Sodio y adicionado con 5 % de suero de carnero para células PK15 y McCoy.
- Medio Dulbecco Modificado con base de sales Earle al 90 % y adicionado con 10 % de suero fetal de ternera para células J774.
- Medio RPMI - 1640 con base de sales Earle al 90 % y adicionado con 10 % de suero fetal de ternera para línea celular L-929.

9.2 PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN

PRUEBA DE LA CATALASA:

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua.

Se realiza cuando se coloca una porción de una colonia perfectamente aislada de un cultivo de 18-24 h. (excepto de colonias de agar sangre) en un portaobjetos y se le añade 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 10 % (importante no invertir el orden de aplicación ya que pueden dar resultados falsos positivos).

INTERPRETACIÓN:

- Positiva: Formación inmediata de burbujas visibles.
- Negativa: No hay formación de burbujas.

***Nota:** No realizar la prueba en cultivos de más de 24 h. ya que la enzima sólo está presente en cultivos viables.

PRUEBA DE OXIDASA:

Está basada en la producción bacteriana de la enzima oxidasa, ésta reacción se debe a la presencia de un sistema citocromo-oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones.

La prueba de oxidasa utiliza ciertos reactivos colorantes, como el diclorhidrato de p-fenilendiamina, que actúa como receptor artificial de electrones sustituyendo al oxígeno, la p-fenilendiamina, es incolora en estado reducido pero en presencia de citocromo oxidasa y oxígeno atmosférico se oxida formando azul de indofenol.

TÉCNICA:

Se realiza colocando una asada de la colonia sospechosa depositándola sobre papel filtro que previamente se agregó una gota de reactivo de diclorhidrato de p-fenilendiamina.

INTERPRETACIÓN:

- Positiva: las colonias con actividad citocromo oxidasa desarrollan en segundos un intenso color azul en el sitio de inoculación (*Pseudomona aeruginosa*).
- Negativa: no hay desarrollo de color en el sitio de inoculación. Para esta prueba no se debe emplear alambre de acero inoxidable, dado que puede producir reacción falsas positivas.

HIDRÓLISIS DEL HIPURATO:

Los microorganismos que poseen la enzima hipuricaza, las cuales hidrolizan el hipurato de sodio formando benzoato de sodio y glicina. Para el revelado de la prueba se emplea reactivo de ninhidrina, el cual reacciona con la glicina liberando grupos NH_3 y CO_2 , los cuales reaccionan con la ninhidrina residual formando un compuesto de color púrpura.

PROCEDIMIENTO:

En tubo serológico agregar 0.5 mL de solución de hipurato de sodio al 1 % en agua destilada, y se coloca una asada de un cultivo puro de *Gardnerella vaginalis* y se incuba a 37° C durante 2 h.

Agregar 0.2 mL de ninhidrina de sodio al 3.5 % y volver a incubar durante 30 minutos.

INTERPRETACIÓN:

- Positiva: Desarrollo de coloración púrpura.
- Negativo: Sin cambio de color.

UTILIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS:

El Medio Base de Agar Semisólido-Cistina-Digerido (CTA) con 1 % de hidratos de carbono se usa fundamentalmente para la detección del ácido producido por microorganismos fermentadores.

Fórmula para 1000 mL en agua destilada.

L-Cistina	0.50 g
Peptona de caseína	20.0 g
Agar	2.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Rojo de fenol	0.017 g
Sulfito de sodio	0.5 g

PREPARACIÓN:

Suspende 28.5 g de polvo deshidratado en un litro de agua destilada, si se desea, agregar de 0.5 al 1 % de carbohidratos para pruebas específicas de fermentación.

Homogenizar y calentar a ebullición durante 1 minuto, trasvasar a tubos con tapón de rosca y esterilizar en autoclave a 115 - 118° C durante 15 minutos, o en su caso preparar soluciones al 20 % (p/v) del o los carbohidratos a usar, pesando 0.5 g del mismo y suspendiéndolo en 2.5 mL de agua.

Dejar enfriar a 45 - 50° C el medio estéril y agregar a cada matraz en condiciones de esterilidad la solución de carbohidratos correspondiente, la cual se ha esterilizado previamente por filtración de membrana de 0.45 μ de poro, suplementando este con 5 % de suero fetal de ternera.

Agitar y pasar 5 mL a tubos de 13 X 100 mm de tapón de rosca estériles, rotular los tubos con el carbohidrato correspondiente. Una vez a temperatura ambiente se incuban a 37° C por 24 h, para comprobar su esterilidad.

Los medios CTA se siembran con una asa recta hasta profundidad con inóculo denso de la bacteria, se incuban a 37° C por 24 h; Sin embargo, algunas cepas pueden necesitar de 24 a 72 h para producir el ácido suficiente como para hacer virar el indicador.

cepa	almidón	rafinosa	glucosa	maltosa	sacarosa
<i>Gardnerella vaginalis</i>	+	+	+	+	+

9.3 SOLUCIONES Y COLORANTES

• SOLUCIÓN BUFFER DE FOSFATOS pH 7.2 (PBS)

Cloruro de sodio	8.0 g
Fosfato dibásico de potasio	0.2 g
Fosfato básico de sodio 12 H ₂ O	2.9 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Agua destilada	1000 mL

Pesar las cantidades indicadas anteriormente y disolver en pequeñas porciones de agua destilada hasta disolución total; si es requerida ajustar pH a 7.2 con solución de HCl 0.01 M, o en su caso NaOH 0.01 M.

• COLORANTE DE GIEMSA.

Formula para 100 mL en solución 1:1 metanol - glicerol.

Eosina	3.0 g
Azur II	0.80 g
Metanol	50 mL
Glicerol	50 mL

Disolver colorantes en metanol y posteriormente agregar glicerol, mezclando uniformemente y dejando reposar a la oscuridad hasta maduración.

TÉCNICA:

Se fija el extendido celular con metanol durante 3 a 5 minutos, posteriormente se cubre con solución de Giemsa, dejando actuar de 20 a 30 minutos, y posteriormente se lava el preparado con agua corriente y se deja secar en posición vertical.

9.4 DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERIANA CON LA TURBIEDAD EXPRESADA EN UNIDADES KLETT-SUMMERSON (UK).

La determinación de la turbiedad puede efectuarse debido a que las bacterias absorben y desvían cierta cantidad de luz, permitiendo de esta forma medir la turbiedad del cultivo. Esto se realiza con la ayuda de un foto colorímetro o un espectrofotómetro con luz roja o azul y la lectura se expresa en unidades de absorbancia. Para organismos unicelulares la absorbancia es proporcional al número de células.

TÉCNICA:

Como inóculo se utiliza un cultivo de *Gardnerella vaginalis* de 24 h de incubación en caldo BHI enriquecido con 0.5 % de suero fetal de ternera.

Añadir a un matraz nefelométrico con 25 mL de caldo BHI enriquecido con 0.5 % de suero fetal de ternera el volumen necesario de inóculo para llevar el fotocolorímetro a una lectura de entre 10 - 15 unidades Klett (UK). Esta será la lectura al tiempo inicial del experimento.

El cero del fotocolorímetro se ajusta con caldo BHI enriquecido con 0.5 % de suero fetal de ternera sin inocular.

Incubar el matraz a 37° C y repetir las lecturas cada 60 minutos durante 12 horas, manteniendo el cultivo a 37° C, anotando los datos arrojados de acuerdo a la siguiente tabla y graficar UK. vs tiempo.

TIEMPO (HORAS)	UNIDADES KLETT
0.0	
1.0	
2.0	
3.0	

REFERENCIAS:

1. Koneman EW, Bacteriología Básica, Conceptos de Virulencia y Avances Tecnológicos en Microbiología Clínica. En Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenber PC, Winn WC (Eds). Diagnóstico Microbiológico. 5a.ed, Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1999: 26-29.
2. Arp Laurence H. Bacterial infection of mucosal surfaces: an overview of cellular and molecular mechanisms. In: Roth JA (Eds). Virulence mechanisms of bacterial pathogens. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1988:3-26.
3. Morales Espinosa, González Pedraza, Ortiz Zaragoza, Palomeque Ramírez, Barajas Calderón. Estudio comparativo de cinco diferentes regímenes de metronidazol en el tratamiento de las vaginosis por *Gardnerella vaginalis*. Rev. Lat-amer. Microbiol., 1992;34:157-164.
4. Wesley Catlyn. *Gardnerella vaginalis*: characteristics clinical considerations, and controversies. Clin. Microbiol. Rev.1992;5:213-237.
5. Johnson AP, Davies HD. Demonstration by electron microscopy of pili on *Gardnerella vaginalis*. Br J Vener Dis 1984;60:396-397.
6. Peeters M. Piot P. Adhesion of *Gardnerella vaginalis* to vaginal epithelial cells: variables affecting adhesion and inhibition by metronidazole. Genitourin Med. 1985;61:391-395.
7. Boustouller YL, Johnson AP. Pili on *Gardnerella vaginalis* studied by electron microscopy. J Med Microbiol. 1987; 23: 327-329.

REFERENCIAS:

8. Scott G, Smyth J. Haemagglutination and tissue culture adhesion of *Gardnerella vaginalis*. J Gen Microbiol. 1987;133:1999-2005.
9. Scott G, Curran B, Smyth J. Electron microscopy of adhesive interaction between *Gardnerella vaginalis* and vaginal epithelial cells, McCoy and human red cells. J Gen Microbiol. 1989;135:475-480.
10. Villegas Castrejón H, González Jiménez MA, Fuentes García S, Casanova Román G, Beltrán Zúñiga M, Flores Rivera E. Infecciones por *Gardnerella vaginalis* en parejas heterosexuales. Estudio ultraestructural en células de descamación del epitelio estratificado. Ginecol Obstet Méx.1995;63:139-146.
11. Fletcher Madilyn. Bacterial attachment in aquatic environments: a diversity of surfaces and adhesion strategies. In bacterial Adhesion, Molecular and ecological diversity. John Wiley and sons. Inc, publication, USA 1996: 1-23.
12. Pumarola A. Relación huésped-bacteria (I) y (II). En: Pumarola A, Rodríguez-Torres, García-Rodríguez JA, Piedrola-Angulo G. (Eds). Microbiología y Parasitología Médica. Barcelona: Masón-Salvat Medicina.1994:153-164.
13. Zepeda López H. González-Lugo G. *Escherichia coli* adherence to HEp-2 cells with prefixed cells; J Clin Microbiol 1995; 33:1414-1417.
14. Méndez Ramírez I, Namihira Guerrero D, Moreno Altamirano L, Sosa de Martínez C. El protocolo de investigación. 2ª.ed. México: Editorial Trillas, 2000:11-13, 25-27, 29-32, 62-70.

REFERENCIAS:

15. Peter P, Van Dyck E. Isolation and identification of *Gardnerella vaginalis*. Scand J Infect Dis. 1983;40:15-18.
16. Yong CT, Thompson JS. Rapid microbiobiochemical method for identification of *Gardnerella (Haemophilus) vaginalis*. J Clin Microbiol 1982; 16:30-33.
17. Taylor E, Phillips I. The identification of *Gardnerella vaginalis*. J Med Microbiol. 1983;16: 83-92.
18. Barrón-Romero BL. Manual de prácticas de laboratorio de virología, 2ª. Ed. México: I.P.N. 1997: 20 - 24.
19. Ortigoza-Ferado J, Ruiloba de León S. Microbiología Práctica. 2ª. Ed. México: I.P.N, 1998: 115-126.
20. Acanda P, Leiva S, Bolaños Q. Quintero M, Sotolongo P. Adherencia de *Neisseria meningitidis* a células epiteliales. Enf infec y microbiol. 1997; 17: 149-152.
21. Sosa Iglesias E, Portillo Gómez L. Adherencia de *H. Influenzae*. Enf infec y microbiol. 1998; 18: 63-69.
22. Ison CA, Easmon CSF. Studies on the mechanism of adhesión of *Gardnerella vaginalis* to human erythrocytes. Scan J Urol Nephrol. 1984; 86:191-193.
23. Finlay B, Stanley Falkow. Common themes in microbial pathogenicity revised. Microbiol Mol Boil Rev. 1997; 61: 136-169.

REFERENCIAS:

- 24. Soto E, Hultegren SJ. Bacterial adhesins: Common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacter.* 1999; 181: 1059-1071.
- 25. Sobel JD. Bacterial vaginosis. *Annu Rev Med* 2000;51:349-356.
- 26. González Pedraza A, Izunza Montiel, Ortiz Zaragoza, Morales Espinoza, Ponce Rosas. Biotipos de *Gardnerella vaginalis*: Modificación de un sistema propuesto. *Rev Lat-Amer Microbiol.* 1995;37:19-26.
- 27. Greenwood JR. Current taxonomic status of *Gardnerella vaginalis*. *Scan J Infect Dis:* 1983;40:11-14.
- 28. Guerra-Infante FM, Flores-Medina S, López-Hurtado M, Sosa-González I, Arredondo-García J. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de tres reactivos de inmunofluorescencia directa para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*. *Ginecol Obstet Méx.* 1994;62:368-373.
- 29. Allan GM, McNeilly F, Foster JC, Adair BM. Infection of leucocyte cell cultures derived from differentes species with pig circovirus. *Veter Microbiol.* 1994;41:267-279.
- 30. Guerra-Infante FM, Davila-Mendoza R. Efecto de *Chlamydia trachomatis* sobre la actividad fagocítica de las células J774. *Ana Esc. Nat. Cien. Biol.* 2001;47-En Prensa.
- 31. Guerra-Infante FM, Zamora-Ruiz A, López-Hurtado M, Flores-Medina S. Induction of tumor necrosis factor- α by cefodizime in U-937 cells. *Rev Inv Clin.* 2001;5362:335-339.